

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
 (DvSnf7, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
 (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書	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
和名、英名及び学名	4
宿主の品種名又は系統名	4
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
国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
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	6
ニ 繁殖又は増殖の様式	6
種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	6
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
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	7
花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	7
ホ 病原性	8
ヘ 有害物質の産生性	8
ト その他の情報	8
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	9
イ 構成及び構成要素の由来	9
ロ 構成要素の機能	10
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 他の供与核酸の構成要素それぞれの機能	10

	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
	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	50
(2)	ベクターに関する情報.....	52
	イ 名称及び由来.....	52
	ロ 特性.....	52
	ベクターの塩基数及び塩基配列.....	52
	特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	52
	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.....	52
(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法.....	52
	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	52
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	52
八	遺伝子組換え生物等の育成の経過.....	53
	核酸が移入された細胞の選抜の方法.....	53
	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.....	53
	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.....	53
(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.....	55
	移入された核酸の複製物が存在する場所.....	55
	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.....	56
	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.....	56
	(6)の 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.....	56
	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.....	61
(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.....	61
(6)	宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	61
	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	61
	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	61
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	64
(1)	使用等の内容	64
(2)	使用等の方法	64
(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	65
(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	65
(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	65
(6)	国外における使用等に関する情報	65
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	67
1	競争における優位性	67
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	67
(2)	影響の具体的な内容の評価	67
(3)	影響の生じやすさの評価	67
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	68
2	有害物質の産生性	68
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	68
(2)	影響の具体的な内容の評価	71
(3)	影響の生じやすさの評価	71
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	72
3	交雑性	72
(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	72
(2)	影響の具体的な内容の評価	72
(3)	影響の生じやすさの評価	72
(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	72
4	その他の性質	73
第三	生物多様性影響の総合的評価	74
	引用文献	77
	緊急措置計画書	93
	隔離ほ場試験計画書	95
	別添資料リスト	111

第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 3 月 1 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。

<p>遺伝子組換え生物等の種類 の名称</p>	<p>コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (DvSnf7, 改変 <i>cry3Bb1</i>, 改変 <i>cp4 epsps</i>, <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9)</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容</p>	<p>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</p>
<p>遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法</p>	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 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 30 年 5 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業</p>

	<p>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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p>
--	--

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

10

和名、英名及び学名

和名：トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は LH244 である。

20

国内及び国外の自然環境における自生地域

トウモロコシはイネ科トウモロコシ属に属する。原産地については、米国の南西部、メキシコ、中米及び南米にかけての複数地域がそれぞれ独立した起源であるとする説と、メキシコ南部単独を起源とする説がある (OECD, 2003)。しかし、現在ではメキシコ南部が原産地であり、トウモロコシ多様性の中心であるとの説が有力である (Matsuoka et al., 2002; Doebley, 2004; Doebley et al., 2006)。なお、わが国における自然分布の報告はない。

25

(2) 使用等の歴史及び現状

30

国内及び国外における第一種使用等の歴史

トウモロコシの栽培起源は今から 9,000 年前とされている (OECD, 2003)。その後、人類の手により育種、品種改良が行われ、紀元前 1500 年~200 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが出現し、メキシコ、メソアメリカの地から南北アメリカ大陸の各地に伝播した。長い栽培の歴史の中でフリント、デント、ポップ、スイート種などの多数の変異種が生じたと考えられて

35

いる。わが国へは天正 7 年 (1579 年) に長崎か四国に伝来したのが最初であるとされ、栽培の歴史は長い (菊池, 1987)。

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

現在、飼料としての利用が主流であるが、食用、食用油、澱粉などの食品としての用途も多岐にわたる (菊池, 1987; OECD, 2003)。現在、トウモロコシは世界で最も広く栽培されている穀物で、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、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲

10

国連食糧農業機関 (FAO) の統計情報に基づくと、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、上位国を挙げると米国が 3,320 万 ha、中国が 3,252 万 ha、ブラジルが 1,268 万 ha、メキシコが 720

15

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のスイートコーンがあり、2011 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 2,200ha で、収穫量は約 471 万トンであり (農林水産省, 2012a)、2011 年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 5,000 ha で、収穫量は約 24 万 300 トンである (農林水産省, 2012b)。

20

わが国は 2011 年に海外から約 1,528 万トンのトウモロコシを飼料用、食品・工業用、そして栽培用として輸入している。その内訳は、飼料用として約 1,076 万トン、食品・工業用として約 452 万トン、そして栽培用として約 2,021 トンである。なお、栽培用として輸入している上位 3 カ国を挙げるとフランスが 872 トン、ニュージーランドが 221 トン、米国が 183 トンとなっている (財務省, 2012)。

25

30

わが国での飼料用トウモロコシの慣行栽培法は以下のとおりである。北海道から九州に至る慣行播種期は、4 月中~下旬から 5 月中~下旬が最も多い。適正栽植密度は 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、

35

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、一般に栽培

用として市販されているトウモロコシのほとんどは一代雑種品種 (F1) であるため、収穫種子が翌年に栽培用として播種されることは一般的でない。

(3) 生理学的及び生態学的特性

5

イ 基本的特性

10 ㊦ 生息又は生育可能な環境の条件

15 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, 2001a)。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される一年生の作物である (瀧澤, 2001)。また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性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には腐植に富む土壌が適し、pH5.5~8.0 の範囲で栽培可能である (千葉, 1980)。

現在のトウモロコシは長期の栽培作物化により作られた作物であるため、自然条件下における自生能力を失っている (OECD, 2003)。

25 ㊧ 捕食性又は寄生性

30 ㊨ 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

35 完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒性はない。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である (OECD, 2003)。種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、温度、子実水分、遺伝子型、苞皮による保護の状態、生育段階によって左右される (Rossman,

1949)。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)。

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, 2001a)。また、仮に発芽しても生長点が地上に出た後は6~8時間以上0°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, 2001a; OECD, 2003)。

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

トウモロコシは栄養繁殖はせず、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。

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

トウモロコシは雌雄同株植物の一年生作物で、典型的な風媒花であり、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、自家受粉も可能である (西牧, 1987; 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 *Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis の亜種として分類される一年生のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*) 及び *Tripsacum* 属である。トウモロコシとテオシントは近接している場合に自由に交雑するが、*Tripsacum* 属との交雑は非常に稀である (OECD, 2003)。テオシントはメキシコからグアテマラにかけて分布しており、*Tripsacum* 属の分布地域は北アメリカ東南部、コロンビアからボリビアにかけてのアンデス東側の低地、この属の中心地と考えられるメキシコ、グアテマラに大きく三分されている (柿本, 1981)。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。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

トウモロコシの一本の雄穂には1,200~2,000個の小穂があり、1,600万~3,000万個の花粉粒を形成する (柿本ら, 2001; 中村, 2001b)。花粉の寿命は盛夏のほ場条件下では24時間以内であるが、環境により大きく異なる (中村, 2001b)。

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力を 100% 失うという報告もある (Luna et al., 2001)。花粉の 1 粒当たりの重量は約 $3.4 \times 10^{-7} \text{g}$ であり (松井ら, 2003)、球形で直径は 90~100 μm である (Raynor et al., 1972)。トウモロコシは風媒による受粉が主であり、雄穂の開花によって飛散した花粉は、雌穂から抽出した絹糸に付着して 30 分以内に花粉管の伸長を観察することができ、24 時間以内に受精を完了する (Kiesselbach, 1999; OECD, 2003)。また、トウモロコシの花粉は風により飛散するが、隔離距離は、林、高層建築物などの遮蔽物の有無などにより異なり、200~400m とされている (千藤, 2001)。

10 ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

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

ト その他の情報

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。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 米国では、現在 1,760 万 ha のトウモロコシがコーンルートワーム属種 (corn rootworm; *Diabrotica spp.*) (以下、「CRW」という。) によって被害を受けている。CRW によるトウモロコシへの食害は甚大な経済損失を与えており、毎年 CRW 防除のために 10 億ドルを超える費用が発生している (Marra et al., 2012)。

10 モンサント・カンパニーは RNA 干渉 (RNAi) 技術及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によりコウチュウ目害虫抵抗性並びに改変 CP4 EPSPS 蛋白質により除草剤グリホサート耐性を付与したトウモロコシ MON87411 (DvSnf7, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) (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に導入された遺伝子は、ウエスタンコーンルートワーム
15 (*Diabrotica virgifera virgifera*) (以下、「WCRW」という。) の細胞機能の維持に必要不可欠である Snf7 遺伝子 (以下、「DvSnf7 遺伝子」という。) に由来し、当該遺伝子の一部を逆方向反復の形で導入することによって二本鎖 RNA (dsRNA) を発現するように調製した部分配列 (以下、「DvSnf7 遺伝子断片」という。) である。当該 dsRNA は本組換えトウモロコシの経口摂食を通じて
20 CRW の細胞内に取り込まれた後、RNAi を誘導し、DvSnf7 遺伝子の発現を抑制することで殺虫活性を示す。

なお、本組換えトウモロコシは、前述した RNAi に加えて改変 Cry3Bb1 蛋白質をコードする改変 *cry3Bb1* 遺伝子を発現させることで、同じコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与されている。このように異なる作用機作を持つ
25 RNAi と Bt 蛋白質を用いて CRW に対する殺虫活性を付与することで、CRW が本組換えトウモロコシに対して抵抗性を獲得するリスクを軽減することが期待されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

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 (p11) 及び表 1 (p12~15) に示した。

35 本組換えトウモロコシに導入された *cry3Bb1* 遺伝子から発現する Cry3Bb1

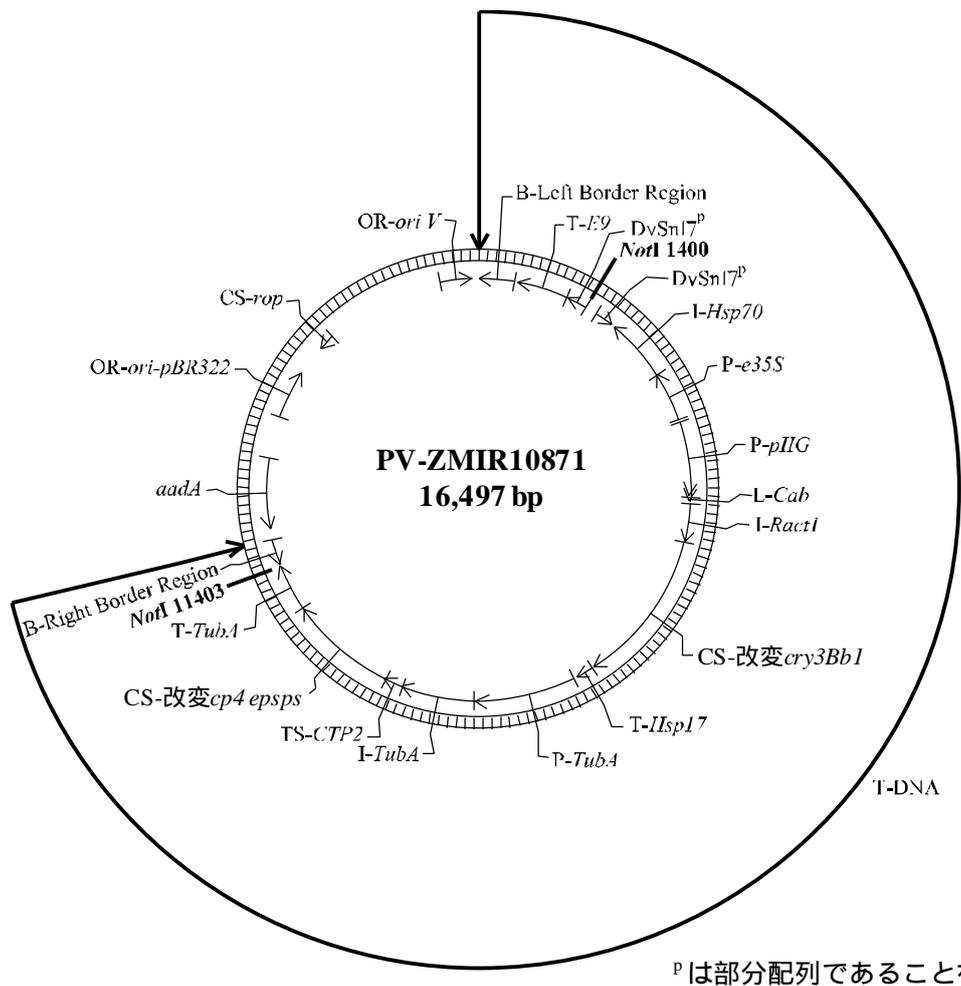
蛋白質は野生型 Cry3Bb1 蛋白質と比較して、6 ヲ所のアミノ酸が置換されている。そのうち 1 ヲ所はクローニングの際に制限酵素切断部位を付加する目的で、他の 5 ヲ所は殺虫活性を増強する目的で改変された。また、*cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

したがって、本組換えトウモロコシに導入された *cry3Bb1* 遺伝子及び *cp4 epsps* 遺伝子を、それぞれ「改変 *cry3Bb1* 遺伝子」及び「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する蛋白質もそれぞれ「改変 Cry3Bb1 蛋白質」及び「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。なお、本組換えトウモロコシにおいて発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列は、それぞれ別添資料 1 及び別添資料 2 に示した。

□ 構成要素の機能

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

本組換えトウモロコシの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1 (p12~15) に示した。



5 図 1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた PV-ZMIR10871 のプラスミドマップ¹

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。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 の各構成要素の由来及び機能²

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} - Left Border Region	1-442	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界領域を含む配列 (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	443-485	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注2} - E9	486-1,118	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ) のリブローズ-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
Intervening Sequence	1,119-1,147	DNA クローニングの際に利用された配列。
DvSnf7^p ^{注3}	1,148-1,387	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> 由来の Snf7 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の Snf7 サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。
Intervening Sequence	1,388-1537	DNA クローニングの際に利用された配列。
DvSnf7^p	1,538-1,777	<i>D. virgifera virgifera</i> 由来の Snf7 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の Snf7 サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。
Intervening Sequence	1,778-1,813	DNA クローニングの際に利用された配列。
I ^{注4} - Hsp70	1,814-2,617	<i>Zea mays</i> (トウモロコシ) の熱ショック蛋白質遺伝子 (<i>hsp70</i>) の 1 番目のイントロンとその近傍エクソンの一部 (Brown and Santino, 1997)。目的遺伝子の発現箇所での発現活性を高める (Brown and Santino, 1997)。

²表 1 (p12~15) 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-ZMIR10871 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
P^{注5}-e35S	2,618-3,238	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA のプロモーター (Odell et al., 1985)。2重のエンハンサー領域 (Kay et al., 1987) を有しており、植物細胞における転写を誘導する。
Intervening Sequence	3,239-3,264	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-pIIIG	3,265-4,213	<i>Z. mays</i> (トウモロコシ) の物理的インピーダンス誘導蛋白質をコードする <i>pIIIG</i> 遺伝子配列のプロモーター領域 (Huang et al., 1998)。植物細胞における転写を誘導する。
Intervening Sequence	4,214-4,219	DNA クローニングの際に利用された配列。
L^{注6}-Cab	4,220-4,280	<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	4,281-4,296	DNA クローニングの際に利用された配列。
I-Ract1	4,297-4,776	<i>Oryza 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	4,777-4,785	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS^{注7}-改変 cry3Bb1	4,786-6,747	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の Cry3Bb1 蛋白質をコードする遺伝子 (Donovan et al., 1992; English et al., 2000; Beazley et al., 2008)。
Intervening Sequence	6,748-6,766	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-Hsp17	6,767-6,976	<i>T. aestivum</i> (コムギ) の熱ショック蛋白質 17 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (McElwain and Spiker, 1989)。
Intervening Sequence	6,977-7,024	DNA クローニングの際に利用された配列。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 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
P-TubA	7,025-8,309	<i>O. sativa</i> (イネ) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーの 5' 末端非翻訳プロモーター領域 (Qin et al., 1997; Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
I-TubA	8,310-9,205	<i>O. sativa</i> (イネ) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのイントロン (Qin et al., 1997; Jeon et al., 2000)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる。
Intervening Sequence	9,206-9,209	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS^{注8}-CTP2	9,210-9,437	<i>Arabidopsis 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)。改変 CP4 EPSPS 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	9,438-10,805	<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	10,806-10,812	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-TubA	10,813-11,394	<i>O. sativa</i> (イネ) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 5' 末端非翻訳リーダー領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Qin et al., 1997; Jeon et al., 2000)。
Intervening Sequence	11,395-11,412	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	11,413-11,743	<i>A. 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)。

表 1 本組換えトウモロコシの作出に用いた PV-ZMIR10871 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
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	11,744-11,879	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	11,880-12,768	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	12,769-13,298	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR^{注9}-ori-pBR322	13,299-13,887	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
Intervening Sequence	13,888-14,314	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-rop	14,315-14,506	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>E. coli</i> 中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	14,507-16,014	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-ori V	16,015-16,411	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	16,412-16,497	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 T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

5 注³ P- Partial sequence (部分配列)

注⁴ I-Intron (イントロン)

注⁵ P-Promoter (プロモーター)

注⁶ L-Leader (リーダー配列)

注⁷ CS-Coding Sequence (コード配列)

10 注⁸ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁹ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

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

【DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA】

i. 一般的な RNAi の機構

10 RNAi は真核生物において遺伝子発現調節のために一般的に起こる機構である (Dykxhoorn et al., 2003; Parrott et al., 2010)。RNAi が起こる過程では、まず、dsRNA がリボヌクレアーゼ III に分類される Dicer と呼ばれる酵素に切断され、21-25 塩基の低分子干渉 RNA (siRNA) が形成される (Hammond, 2005; Siomi and Siomi, 2009)。次に、siRNA が RNAi-induced silencing complex (RISC) と結合し、標的となる相補
15 的な配列を持つ mRNA と結合する。そして、RISC が持つエンドヌクレアーゼによって、siRNA と結合した mRNA が分解されることにより、その mRNA の蛋白質への翻訳が阻害されることとなる (Hammond, 2005; Siomi and Siomi, 2009)。RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制を効率的かつ安定して誘導できることから特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている (Kusaba, 2004)。

20 近年、dsRNA を発現する遺伝子組換え植物を昆虫に経口摂取させることで、昆虫の内在性遺伝子の発現を RNAi により抑制することが可能であることが確認され、RNAi が有望な害虫防除法として利用しうることが提言されている (Baum et al., 2007b (添付文献 1); Whyard et al., 2009 (添付文献 2))。具体的には、特定の昆虫の必須機能に関わる蛋白質をコードする遺伝子の発現を特異的に抑制することによって、特異的な殺虫活性を付与することができる (Baum et al., 2007b (添付文献 1);
25 Whyard et al., 2009 (添付文献 2))。

ii. DvSnf7 遺伝子断片を導入した本組換えトウモロコシの作用機作

30 1. 経口摂取された dsRNA が DvSnf7 遺伝子の発現を抑制する作用機作

本組換えトウモロコシには、WCRW の細胞機能の維持に必要不可欠である DvSnf7 遺伝子のエクソンの部分配列 240 塩基を逆方向反復の形で導入している。そして、この逆方向反復配列からは DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA が形成されている
35 ことが確認されている (別添資料 3 の Figure 1, p4)。

また、人工的に合成した当該 dsRNA を WCRW に経口摂取させた場合、当該 dsRNA が WCRW の RNAi 機構に認識され、DvSnf7 遺伝子から発現する mRNA を分解し、蛋白質の発現を抑制することが Real-Time RT-PCR 法及びウエスタンブロット分析により確認されている (図 2, p18; 図 3, p19; Bolognesi et al., 2012 (添付文

献 3), Figure 3)。

このことから、本組換えトウモロコシで発現する当該 dsRNA は、WCRW によって摂食された後、中腸細胞内に取り込まれ DvSnf7 遺伝子の発現を抑制して WCRW に殺虫活性をもたらすと考えられる (図 2, p18)。

5 因みに、当該 dsRNA のみを発現する別の遺伝子組換えトウモロコシ系統が WCRW に対して抵抗性を示すことも確認されている (別添資料 4 の Figure 1, p4)。

なお、本組換えトウモロコシ中には、当該 dsRNA に加えて、その dsRNA に由来する siRNA も産生されていることが確認されている (別添資料 5 の Table 1, p6)。

10 WCRW の中腸細胞には塩基長によって取り込む RNA の選別機構が存在しているとされ、60 塩基対 (bp) 以上の dsRNA のみを効率的に中腸細胞に取り込むことが明らかになっている (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))。

本組換えトウモロコシ中で産生されている siRNA についても、当該遺伝子断片由来の 21bp の siRNA を高濃度で投与した WCRW の生物検定及び中腸細胞蛍光イメージングにより、WCRW の中腸細胞に効率的に取り込まれる可能性が低いこと及び WCRW に対して殺虫活性を示さないことが確認されている (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))。このことから、本組換えトウモロコシ中で産生されている dsRNA 由来の siRNA は WCRW の殺虫活性には関与していないと考えられた。

15 20 因みに、siRNA のような低分子 RNA は植物中ではメチル化修飾され、安定性が高まることが報告されている (Ji and Chen, 2012)。しかし、メチル化修飾した siRNA を用いて上記と同様の試験を行った結果、同様の結果が得られた (別添資料 6 の Figure 1, p6 及び Figure 3, p8)。

25 なお、経口摂取された当該 dsRNA は、WCRW の中腸細胞だけでなくその他の体組織でも DvSnf7 遺伝子の発現抑制を誘導し、全身へ伝搬している現象が観察されている (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))。このように細胞が細胞外から RNA を取り込み、取り込んだ RNA を近隣の細胞へと拡散する全身への伝搬 (systemic spread) と呼ばれる機構が存在することは以前から知られている (Huvenne and Smaghe, 2010 (添付文献 4))。

30 35 全身的伝搬は線虫の一種である *Caenorhabditis elegans* で 1998 年に報告された機構で (Fire et al., 1998)、*C. elegans* 以外にも、コウチュウ目、チョウ目、ハエ目及びバッタ目に属する様々な昆虫で全身的伝搬は dsRNA の細胞内への注入又は dsRNA の経口摂取によって引き起こされることが報告されている (Bucher et al., 2002; Tomoyasu and Denell, 2004; Dong and Friedrich, 2005; Turner et al., 2006; Tian et al., 2009; Alves et al., 2010; Li et al., 2011)。しかしながら、この全身への伝搬のメカニズムに関しては、エンドサイトーシス又は SID-2 蛋白質 (膜貫通蛋白質) が関連しているとする仮説が立てられているものの、いまだ解明に至っていない (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))。

また、dsRNA の長さ及び RNAi の全身的伝搬 (systemic spread) の他にも、標的とする遺伝子の選択、dsRNA 配列、摂取する dsRNA 量、遺伝子発現抑制の持続性に関わる機構、昆虫の生育段階等の様々な要因が経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導に影響を及ぼしていることが知られている (Huvenne and Smagge, 2010 (添付文献 4))。

5

以上をまとめると、本組換えトウモロコシ中では、標的昆虫である WCRW の細胞機能の維持に必要不可欠な役割を果たしている DvSnf7 遺伝子由来の dsRNA が発現している。当該 dsRNA は WCRW が本組換えトウモロコシを摂食した後、中腸細胞内に取り込まれ、RNAi の機構を通じて内在性の DvSnf7 遺伝子の発現を抑制することにより、WCRW に殺虫活性をもたらすと考えられる (図 2, p18)。

10

なお、本組換えトウモロコシ中には、当該 dsRNA に由来する siRNA も産生されているが、当該 siRNA は WCRW の中腸細胞の RNA の選別機構の存在によって取り込まれる可能性は低く、当該 siRNA が WCRW に対して殺虫活性を有するとは考え難い。

15

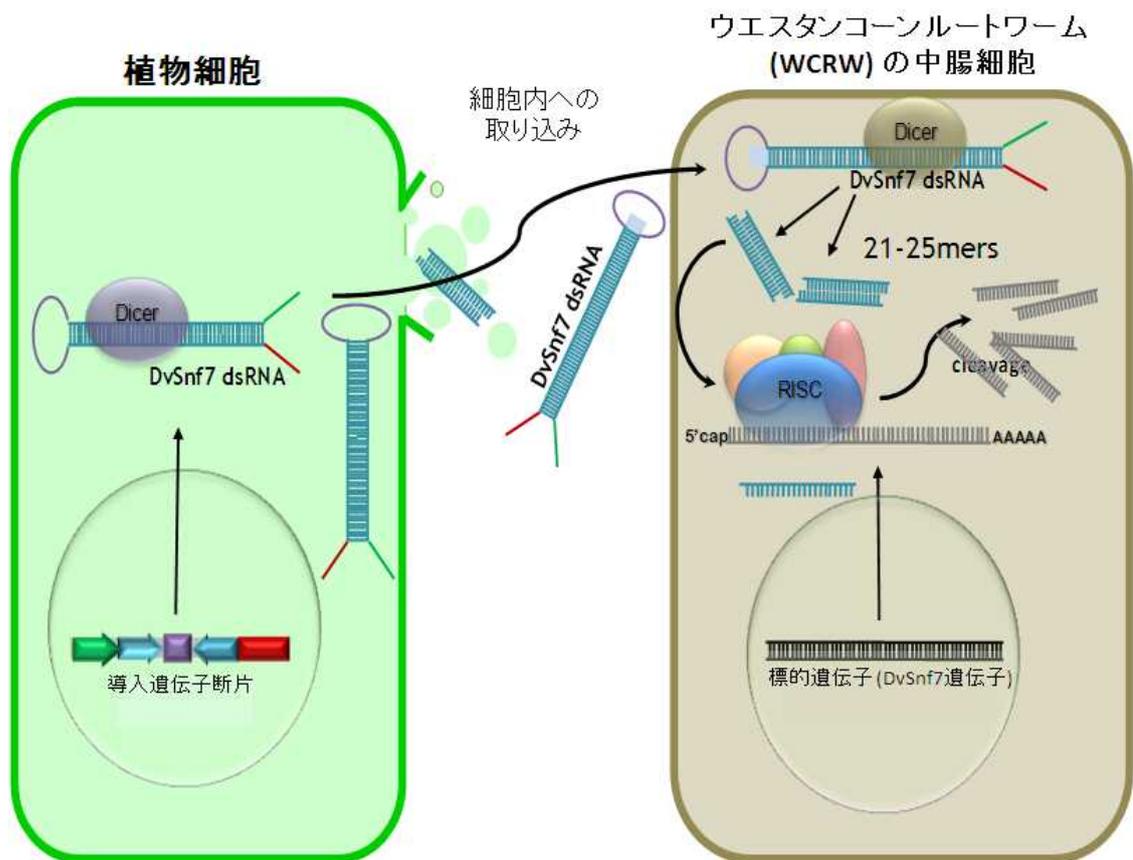
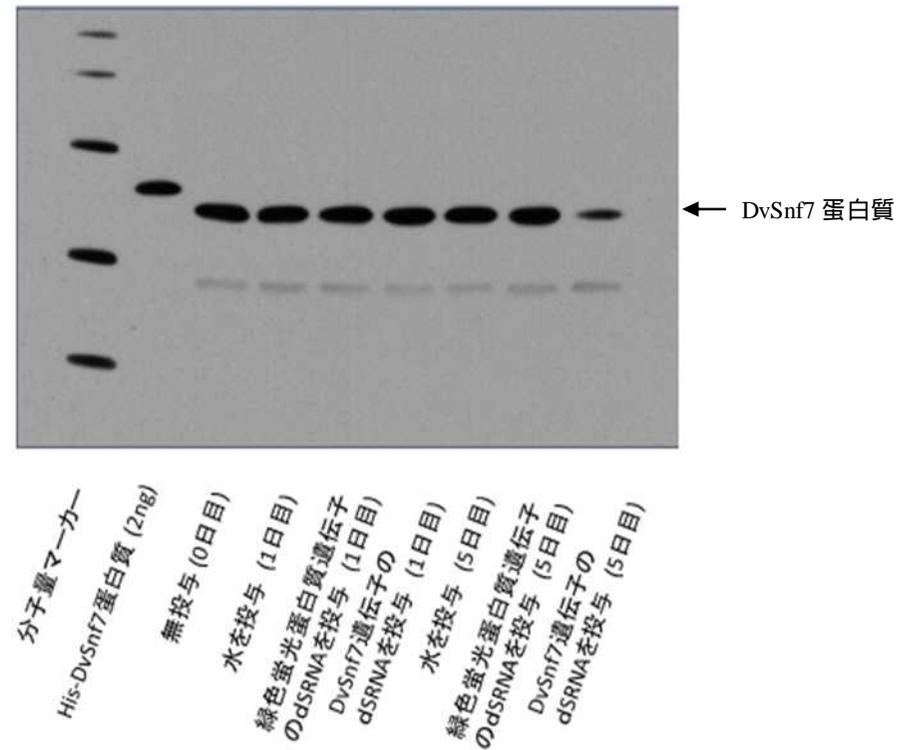
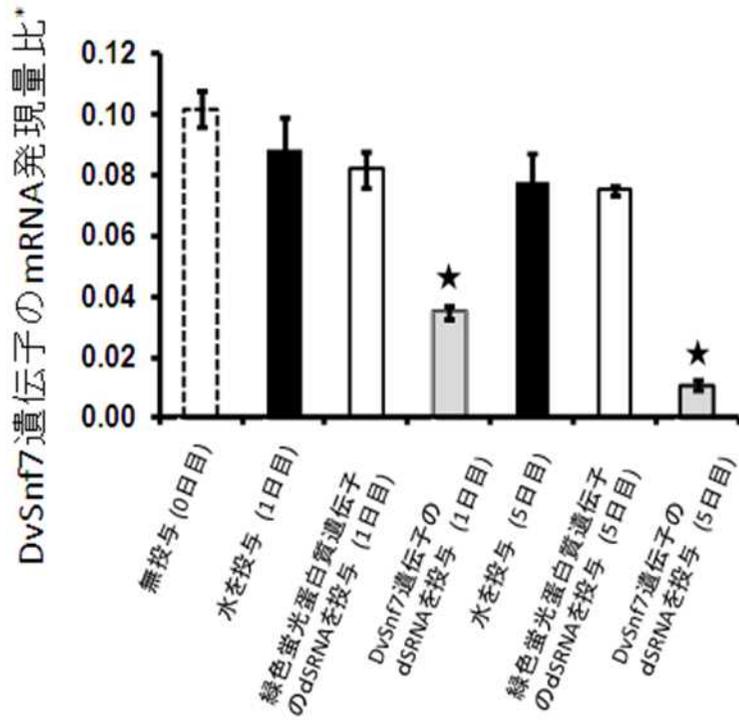


図 2 経口摂取された dsRNA による WCRW の中腸細胞中での遺伝子発現の抑制 (模式図)³

20

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。



*DvSnf7 遺伝子の発現量を WCRW 由来の標準遺伝子の発現量で補正した比
 コントロールと比較して統計学的有意差あり (t検定; $p < 0.05$)

5

図 3 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA を経口摂取した WCRW の全身組織での DvSnf7 遺伝子の mRNA レベル (左: Real-Time RT-PCR 法) 及び DvSnf7 蛋白質の発現抑制 (右: ウェスタンブロット分析) (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))⁴

⁴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. 真核生物の細胞内でのオートファジー経路におけるSnf7遺伝子の働き

一般的に真核生物の細胞では、不要になった細胞小器官及び蛋白質を分解する自食作用（オートファジー）が存在しており、エンドソームを通じて不要となった蛋白質の細胞内への取り込み、輸送、選別及び分解を行うことで細胞恒常性を保っている (Fader and Colombo, 2009)。

Snf7遺伝子がコードするSnf7蛋白質は、中性のN末端及び酸性のC末端と共に、 α ヘリックスがコイル状に巻きついているコイルドコイル構造ドメインを有している (Peck et al., 2004)。また、上記オートファジー経路において細胞膜中の受容体蛋白質等をリソソームで分解するか否かの選別に関する ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-III 複合体の構成蛋白質である (Kim et al., 2011; Teis et al., 2008; Vaccari et al., 2009)。

因みに、酵母、ショウジョウバエ属昆虫、*C. elegans* (線虫の一種)、シロイヌナズナ、イネ及びヒトにもSnf7蛋白質に分類される蛋白質が同定されている (Winter and Hauser, 2006)。これらSnf7蛋白質の生物間での相同性に関しては、植物とヒトではSnf7蛋白質アミノ酸配列が30%から57%程度の相同性を有し、酵母とヒトでは約50%程度の相同性が報告されている。また、二次構造分析によってSnf7蛋白質の基本構造及び機能は、真核生物間で保存されていることが示唆されている (Winter and Hauser, 2006; Peck et al., 2004)。このようにSnf7蛋白質は多くの生物に存在しており (Tu et al., 1993; Gao et al., 1999; Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006; Lee et al., 2007; Kim et al., 2011)、細胞機能の維持に必要な不可欠な蛋白質となっている。

上記のように、Snf7蛋白質はオートファジー経路に関するESCRT-III 複合体の一部を構成している蛋白質として知られている。図4のA (p22) では通常の昆虫細胞におけるオートファジー経路を示している (図4のA, p22; Ramaseshadri et al., 2013 (添付文献5), Figure 5)。以下に図4のA (p22) の図中の番号に沿ってオートファジー経路を説明する。

1. 細胞膜上でユビキチンが結合した蛋白質 (ユビキチン化蛋白質) のエンドサイトーシスが起り、被膜小胞によりそれらの蛋白質は初期エンドソームへと輸送される (Raiborg and Stenmark, 2009)。
2. 初期エンドソームで、ユビキチン化蛋白質はESCRT経路 (ESCRT-0、I、II及びIII複合体) を経ることにより脱ユビキチン化が行われ、遊離したユビキチンは再び細胞膜中の蛋白質へと運ばれる (Raiborg and Stenmark, 2009)。

3. 脱ユビキチン化された蛋白質を内包する初期エンドソームの一部が出芽し、多小胞体 (MVB) となり、続いて後期エンドソームを形成する (Fader and Colombo, 2009)。この後、後期エンドソームがリソソームと融合した場合はリソソームでの分解が行われる。
- 5 4. 昆虫細胞内には細胞小器官又は不要になった蛋白質などを内包する自食作用胞 (オートファゴソーム) が形成されている。
5. 後期エンドソーム、リソソーム及びオートファゴソームの3つが融合することでオートファジーを誘導する。なお、オートファジーは細胞が飢餓の状態の場合に起こりやすい (Fader and Colombo, 2009)。

10

多くの高等生物において、上記のようなオートファジー経路による不要となった細胞小器官及び蛋白質の分解は、様々な生理及び病理的状态を制御するために重要なプロセスである (Ramaseshadri et al., 2013 (添付文献5))。また、一般的に真核細胞にとって受容体蛋白質はシグナル伝達を制御していること

15 からは、細胞膜中の受容体蛋白質をエンドサイトーシスにより選別していくことは、恒常性を保つために必須の機能である。細胞の増殖や成長を制御する Notchシグナル伝達及び上皮成長因子シグナル伝達などを含むいくつかの経路に関わる受容体はESCRT経路により選別されていることも報告されている (Ramaseshadri et al., 2013 (添付文献5))。

20

DvSnf7遺伝子がコードするDvSnf7蛋白質は、上記の一般的なSnf7蛋白質と同様に、WCRWの細胞においてもESCRT-III複合体の一部を構成している蛋白質であり、WCRWのESCRT-III複合体も初期エンドソームでのユビキチン化蛋白質の脱ユビキチン化を行っているとされている (Ramaseshadri et al., 2013 (添付文献5))。このことから、図4のB (p22) で示すように経口摂取された DvSnf7遺伝子断片のdsRNA によってDvSnf7遺伝子の発現が抑制された場合、脱ユビキチン化が起こらず、本来オートファジーにより分解されるべき不要

25 となった蛋白質が細胞に蓄積される (図4のB, p22; Ramaseshadri et al., 2013 (添付文献5), Figure 5)。

30

以上をまとめると、DvSnf7遺伝子がコードするDvSnf7蛋白質の働きは一般的なSnf7蛋白質と同様で、WCRWの細胞機能の維持に必要不可欠である。本組換えトウモロコシの摂食を通じて摂取された当該dsRNAによって、WCRW中の当該遺伝子の発現が抑制された場合、細胞の恒常性が損なわれ、WCRW

35 は死に至ると推察された。

iii. DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異性

1. DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトル

5

DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトルを調べるため、WCRW との分類学的関連性を基に選んだ昆虫に対する殺虫活性を試験した (別添資料 7)。

10 コウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目 10 科で代表的な 14 種の昆虫 (表 2, p24) に対して、当該 dsRNA の混餌投与による生物検定を行った。試験ではコウチュウ目内での当該 dsRNA の特異性を明確にするために、コウチュウ目で 4 科に属する 7 種を供試した。その中には、標的害虫の WCRW 及び WCRW の近縁種であるサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (以下、「SCRW」という。) も含まれており、それらの昆虫に対する殺虫活性は 12 日間の混餌投与による生物検定で確認された。

15 混餌投与に供試したのは *in vitro* で合成した当該 dsRNA で、これを 5,000ng/mL diet までの濃度範囲で試験した。この濃度は、本組換えトウモロコシ中で発現される当該 dsRNA の濃度と比べて最大で 3000 倍の高濃度となっている (表 11, p58)。このように、本生物検定は、当該 dsRNA が非標的害虫の成長、発育及び生存に影響を及ぼす可能性があるかを評価するために十分な投与期間で継続的に当該 dsRNA を投与するように設計された。

20 その結果、非標的昆虫と考えられるコロラドポテトビートル (*Leptinotarsa decemlineata*) (以下、「CPB」という。) を含むコウチュウ目 5 種、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目について、当該 dsRNA による成長、発育及び生存への悪影響は認められず、当該 dsRNA はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科 (Galerucinae) に属する WCRW 及び SCRW に対してのみ活性を示すことが確認された。WCRW および SCRW の LC₅₀ (半数致死濃度) は、それぞれ 4.4ng/mL diet 及び 1.2ng/mL diet となっている (表 2, p24; 別添資料 7 の Table 3, p39)。なお、ハムシ科にはヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科を含む計 12 亜科が存在しているが、WCRW が属するヒゲナガハムシ亜科は、系統学的にはハムシ科の亜科の中で最もハムシ亜科と近縁であることが知られている (Gomez-Zurita et al., 2007 (添付文献 14))。

25 これらの結果から、当該 dsRNA の殺虫活性スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されていると考えられた。なお、今回生物検定を行ったコウチュウ目、チョウ目、ハチ目、カメムシ目の 4 目 10 科で代表的な 14 種の昆虫のうち、10 種は同種又は同属種がわが国に生息している (表 2, p24) が、標的昆虫である CRW はわが国に生息していないことは文献調査により示されている (中根ら, 1963)。

35

表2 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫スペクトル (様々な昆虫の当該 dsRNA への感受性)⁶

目	科	亜科	学名	LC ₅₀ ^a 又は 最大濃度 ^b (ng/mL diet)	殺虫活性*	日本での 生息の有無
Hemiptera (カメムシ目)	Anthocoridae (ハナカメムシ科)	Anthocorinae (ハナカメムシ亜科)	<i>Orius insidiosus</i>	5,000 ^b	無	同属種は生息
Hymenoptera (ハチ目)	Eulophidae (ヒメコバチ科)	Entedoninae	<i>Pediobius foveolatus</i>	3,000 ^b	無	同属種は生息
	Pteromalidae (コガネコバチ科)	Pteromalinae (コガネコバチ亜科)	<i>Nasonia vitripennis</i> (キョウソヤドリコバチ)	5,000 ^b	無	生息
Lepidoptera (チョウ目)	Noctuidae (ヤガ科)	Noctuidae (モンヤガ亜科)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	500 ^b	無	同属種は生息
		Heliethinae (タバコガ亜科)	<i>Helicoverpa zea</i>	5,000 ^b	無	同属種は生息
	Crambidae (ツトガ科)	Pyraustinae (ノメイガ亜科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	5,000 ^b	無	同属種は生息
	Bombycidae (カイコガ科)	Bombycinae (カイコガ亜科)	<i>Bombyx mori</i> (カイコ)	5,000 ^b	無	生息
Coleoptera (コウチュウ目)	Carabidae (オサムシ科)	Harpalinae (ゴモクムシ亜科)	<i>Poecilus chalcites</i>	5,000 ^b	無	同属種は生息
	Coccinellidae (テントウムシ科)	Coccinellinae (テントウムシ亜科)	<i>Coleomegilla maculata</i>	3,000 ^b	無	×
		Epilachninae (マダラテントウムシ亜科)	<i>Epilachna varivestis</i> (インゲンテントウ)	3,000 ^b	無	同属種は生息
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	Tenebrioninae (ゴミムシダマシ亜科)	<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ)	5,000 ^b	無	生息
	Chrysomelidae (ハムシ科)	Chrysomelinae (ハムシ亜科)	CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	5,000 ^b	無	×
		Galerucinae (ヒゲナガハムシ亜科)	SCRW (<i>Diabrotica undecimpunctata howardi</i>)	1.2 ^a	有	×
		WCRW (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>)	4.4 ^a	有	×	

*当該 dsRNA に対する各昆虫の感受性を 12 日間の混餌投与による生物検定で調査した。コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する種だけに殺虫活性を示した (別添資料 7)。

^a LC₅₀=半数致死濃度; ^b 投与された最大濃度

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。

さらに、上記のように当該 dsRNA の直接混餌投与による生物検定を行った 14 種の昆虫以外にも、WCRW に近縁のヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科に属する 5 種 (*Acalymma vittatum*、*Ceratoma trifurcate*、*Galerucella calamriensis*、*Microtheca ochroloma* 及び *Chrysolina quadrigemina*; 表 3, p27) への当該 dsRNA の殺虫活性を間接的に調査することで、より詳細な殺虫スペクトルの検討を行った (Bachman et al., 2013 (添付文献 6))。

これらの 5 種については、生物検定を行うための飼育方法が確立していないため、直接混餌投与による生物検定を行うことができない。そのため、当該 dsRNA を直接これら 5 種に与える代わりに、これら 5 種由来の Snf7 遺伝子断片の dsRNA を、飼育方法が確立している WCRW に与え、WCRW への殺虫活性の有無を観察することで、当該 dsRNA のこれら 5 種に対する殺虫活性の可能性を検討した。もし当該 dsRNA が WCRW 以外の種に殺虫活性を示す場合、それらの種の Snf7 遺伝子と WCRW の DvSnf7 遺伝子配列間では 21 塩基長の一致を含む相同性が存在すると考えられ、それらの種由来の Snf7 遺伝子配列断片の dsRNA も WCRW に対して殺虫活性を示すものと考えられる。このことから、上記の 5 種に関しても、5 種由来の Snf7 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に与えることによって、間接的に当該 dsRNA のこれら 5 種に対する殺虫活性を調べることが可能であると考えられる。

このように飼育方法が確立していない昆虫種に対する殺虫活性を予測するための間接的な影響評価手法については既の実験で用いられている事例がある (Baum et al. 2007b (添付文献 1); Burand and Hunter, 2012 (添付文献 13))。実際に WCRW 及び CPB にお互いの Snf7 遺伝子断片の dsRNA を与えて、間接的な影響評価を行い、この手法の検証を行った (Bachman et al., 2013 (添付文献 6))。なお、表 2 (p22) に示すように当該 dsRNA は WCRW に対しては殺虫活性を示すが、CPB に対しては殺虫活性を示さないことが、直接混餌投与試験により既に確認されている。間接混餌投与試験の結果、WCRW に当該 dsRNA を与えた場合に殺虫活性が認められたが、CPB 由来の Snf7 遺伝子断片 (LdSnf7 遺伝子断片) の dsRNA を与えた場合には殺虫活性は認められなかった (Bachman et al., 2013 (添付文献 6), Fig. 1)。一方で、CPB に LdSnf7 遺伝子断片の dsRNA を与えた場合に殺虫活性が認められたが、WCRW 由来の当該 dsRNA を与えた場合には殺虫活性は認められなかった (Bachman et al., 2013 (添付文献 6), Fig. 1)。この結果は直接混餌投与試験の結果と一致していることから、飼育方法が確立していない昆虫に関してはこの間接的な影響評価を用いれば当該 dsRNA の殺虫活性を調べることが可能であると考えられた。

本試験の混餌投与に供試した Snf7 遺伝子断片の dsRNA は、*A. vittatum*、*C.*

trifurcate、*M. ochroloma*、*G. calamriensis* 及び *C. quadrigemina* から DvSnf7 遺伝子断片に相当する配列を *in vitro* で合成したものである。この dsRNA を最大 5,000 ng/mL diet までの濃度で WCRW に 12 日間混餌投与した。

5 試験の結果、ヒゲナガハムシ亜科に属する *A. vittatum*、*C. trifurcate* 及び *G. calamriensis* 由来の Snf7 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に与えたところ、生存率がそれぞれ 8%、15% 及び 13% であり、WCRW に対して殺虫活性を示すことが確認された (表 3, p27; Bachman et al., 2013 (添付文献 6), Table 3)。一方、ハムシ亜科に属する *M. ochroloma* 及び *C. quadrigemina* 由来の Snf7 遺伝子断片の dsRNA を WCRW に与えたところ、生存率は 72% 及び 88% であり、10 WCRW に対して殺虫活性を示さなかった (表 3, p27; Bachman et al., 2013 (添付文献 6), Table 3)。これらの結果から、当該 dsRNA は WCRW と同じハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する *A. vittatum*、*C. trifurcate* 及び *G. calamriensis* に殺虫活性を示すと考えられた。しかし、同じハムシ科であっても、ハムシ亜科に属する *M. ochroloma* 及び *C. quadrigemina* に対しては殺虫活性を示さないと考えられた。15

表 3 ヒゲナガハムシ亜科及びハムシ亜科に属する 5 種の DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA に対する感受性を間接的に調査した結果⁷

Snf7 遺伝子断片の合成 に用いた昆虫種名 (亜科名)	投与濃度 (ng/mL)	Control ¹ 生存率(%)	dsRNA treatment ² 生存率(%)	有意差	殺虫活性	21 塩基長の 一致の有無 ³
<i>Acalymma vittatum</i> (ヒゲナガハムシ亜科)	1,000	90	8	p < 0.05	有	有
<i>Ceratoma trifurcata</i> (ヒゲナガハムシ亜科)	500	76	15	p < 0.05	有	有
<i>Galerucella calamriensis</i> (ヒゲナガハムシ亜科)	5,000	89	13	p < 0.05	有	有
<i>Microtheca ochroloma</i> (ハムシ亜科)	500	76	72	p > 0.05	無	無
<i>Chrysolina quadrigemina</i> (ハムシ亜科)	5,000	94	88	p > 0.05	無	無

¹ dsRNA を含まない餌を与えた WCRW

² 各種の Snf7 遺伝子断片の dsRNA を与えた WCRW

5 ³ 表中の 5 種由来の Snf7 遺伝子断片配列中で、DvSnf7 遺伝子断片配列と 21 塩基の長さで一致した配列の有無

⁷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. DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の標的昆虫に対する特異的な殺虫活性を決定する要因

5 a. DvSnf7 遺伝子断片の標的昆虫内の遺伝子に対する配列特異性

前述したように DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫にのみ殺虫活性を示すことが明らかになった。この dsRNA の標的昆虫に対する特異性を決定する要因の 1 つとしては、標的昆虫内の内在性遺伝子に対する配列の特異性が挙げられる。今回、標的とした内在性遺伝子である Snf7 遺伝子は、真核生物間に幅広く保存されているが (Tu et al., 1993; Gao et al., 1999; Peck et al., 2004; Winter and Hauser, 2006; Lee et al., 2007; Kim et al., 2011)、多くの種間で保存されている遺伝子を標的とした場合でも、配列の多様性に着目して dsRNA の配列を設計することにより、標的昆虫への特異的な殺虫活性を発揮することが可能である (Whyard et al., 2009 (添付文献2))。

DvSnf7 遺伝子の構成及び DvSnf7 遺伝子断片の作成に用いた領域に関する情報は、別添資料8に記載した⁸。

さらに、この配列はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫の Snf7 遺伝子間では高い相同性を有するが、それ以外の生物の Snf7 遺伝子とは相同性が低いことが確認されている。

具体的には、バイオインフォマティクス解析により、DvSnf7 遺伝子断片の配列と WCRW と系統学的に近縁の昆虫種の Snf7 遺伝子の配列を比較したところ、一致する塩基数と殺虫活性の間に相関関係が認められ、連続する 21 塩基長以上の一致が殺虫活性を及ぼすために必要であることが明らかになった (表4, p30; 別添資料9; Bachman et al., 2013 (添付文献6))。以下に詳細を記載する。

コウチュウ目に属する昆虫の中で WCRW に系統学的に近縁の昆虫 9 種を選び、これらの昆虫に内在する Snf7 遺伝子中で WCRW 由来の DvSnf7 遺伝子断片に相当する配列を塩基配列解析により特定した (Bachman et al., 2013 (添付文献6))。そして、これらの配列と DvSnf7 遺伝子断片の配列の間の相同性を調査した (Bachman et al., 2013 (添付文献6))。その結果、近縁の昆虫 9 種から特定した配列は、WCRW と系統学的に離れれば離れるほど DvSnf7 遺伝子断片の配列との相同性が低くなり、

⁸社外秘情報を含むため、評価書中の文章とは異なる記載を用いている。

5
10
15
20
25

コウチュウ目ハムシ科に属する昆虫でさえも亜科間では明確な差異があることが明らかになった (表4, p30; Bachman et al., 2013 (添付文献6), Table 2)。また、ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫において経口摂取されたdsRNAがRNAiを誘導するには連続した21塩基以上の配列の相同性が必要であることが知られているが (Bolognesi et al., 2012 (添付文献3); Bachman et al., 2013 (添付文献6))、コウチュウ目ハムシ科ハムシ亜科の昆虫のSnf7遺伝子であっても、DvSnf7遺伝子断片と21塩基長で一致する配列は存在しないことも確認された (表4, p30; Bachman et al., 2013 (添付文献6))。これらの結果は、前述した当該dsRNAの殺虫活性を調べるための生物検定の結果と一致している (表4, p30; 別添資料7; Bachman et al., 2013 (添付文献6))。

15
20
25

なお、表4 (p30) に記載のとおり、DvSnf7遺伝子断片とWCRWに系統学的に近縁である昆虫のSnf7遺伝子との21塩基長の一致を調べたところ、19塩基以下の一致では当該dsRNAは殺虫活性を示さなかった。また、現在のところ文献を含め、20塩基長の一致に関しては殺虫活性を示すか否かを証明するためのデータはない。しかしながら、Bachmanら (2013 (添付文献6)) の生物検定及びバイオインフォマティクス解析によって、WCRWが属するヒゲナガハムシ亜科に系統学的に最も近縁であるハムシ亜科に属する昆虫種ですら (Gomez-Zurita et al., 2007 (添付文献14))、当該dsRNAは殺虫活性を示さず、これら昆虫種のSnf7遺伝子はDvSnf7遺伝子断片と比較して20塩基以上の相同性を示さないことが確認されている (表4, p30)。このハムシ科に属する亜科の分類は、ほとんどの生物間で高度に保存されているリボソーム小ユニットのrRNA配列を比較する分子系統解析を用いて決定されており (Gomez-Zurita et al., 2007 (添付文献14))、この分類に従うと、系統的にWCRWから遠縁になればなるほど、Snf7遺伝子のDvSnf7遺伝子との相同性も低下していくと考えられる。

表 4 DvSnf7 遺伝子断片の配列とコウチュウ目ハムシ科及びゴミムシダマシ科に属する昆虫種の内在の Snf7 遺伝子断片の配列を比較した結果及び生物検定による殺虫活性の有無⁹

目名、科名及び亜科名	Snf7 遺伝子断片の配列を特定した昆虫種名	DvSnf7 遺伝子断片配列との相同性 (%)	21 塩基長の一致 ¹	殺虫活性 ²
コウチュウ目 ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科	WCRW	100.0	221	有
	SCRW	98.8	186	有
	<i>A. vittatum</i>	95.0	69	有 ⁴
	<i>C. trifurcata</i>	90.8	18	有 ⁴
	<i>G. calamriensis</i>	90.8	3	有 ⁴
コウチュウ目 ハムシ科ハムシ亜科	CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	78.3	0, (14 塩基) ³	無
	<i>C. quadrigemina</i>	82.1	0, (19 塩基) ³	無 ⁴
	<i>M. ochroloma</i>	79.6	0, (19 塩基) ³	無 ⁴
コウチュウ目 ゴミムシダマシ科 ゴミムシダマシ亜科	<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ)	72.1	0, (11 塩基) ³	無

¹表中の各種由来の Snf7 遺伝子断片配列中で、DvSnf7 遺伝子断片配列と 21 塩基の長さで一致した配列の数

5 ²生物検定 (表 2, p24; 別添資料 7) において DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を調べた昆虫に関しては、殺虫活性の有無も参考として記載した。

³表中の種の Snf7 遺伝子配列が DvSnf7 遺伝子断片配列と 21 塩基長以上の完全一致を含まない場合は、バイオインフォマティクス解析により得られた最長の配列の長さを記載した。なお、Bachman ら (2013 (添付文献 6)) は、20 塩基長の一致が昆虫に対して殺虫活性を示すか否かの検証を行っていないが、表中の種の Snf7 遺伝子配列には 20 塩基長の一致はなかった。

10 ⁴これらの昆虫種については実験室内における飼育方法が確立していないため、dsRNA の混餌投与による生物検定を行なうことは困難である。そのため、間接的な生物検定により、これら昆虫種の当該 dsRNA への感受性の有無を調べた (表 3, p27; Bachman et al., 2013 (添付文献 6), Table 3a, p42)。

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。

次に、コウチュウ目ハムシ科以外にも、コウチュウ目ゴミムシダマシ科、また系統学的にコウチュウ目に近縁であるチョウ目、ハチ目、ハエ目、カメムシ目及びバッタ目 (Savard et al., 2006) 並びにミジンコ目の各目の代表的な節足動物18種を選び、これらの昆虫種に内在するSnf7遺伝子中においてもWCRW由来のDvSnf7遺伝子断片に相当する配列を一般に公開されているゲノムデータベース情報¹⁰を基に特定した (別添資料9)。そして、これらの配列とDvSnf7遺伝子断片の配列の間の相同性を調査した (別添資料9)。その結果、これらの昆虫種のSnf7遺伝子断片の配列はDvSnf7遺伝子断片の配列と73%を超える相同性を示すことはなく、DvSnf7遺伝子断片と21塩基長での一致もないことが確認された (表5, p32; 別添資料9)。また、ハエ目の*Drosophila pseudoobscura*のSnf7遺伝子のみがDvSnf7遺伝子断片配列と20塩基長の一致を示した。しかし、ハエ目ショウジョウバエ属の昆虫 (*Drosophila* spp.) は経口摂取されたdsRNAに対して感受性を示さないことが知られているため (Whyard et al., 2009 (添付文献2))、当該dsRNAが*D. pseudoobscura*に殺虫活性を示す可能性は低いと考えられた。

したがって、これら昆虫種に対して当該dsRNAが殺虫活性を示す可能性は低く、18種全ての昆虫種に関して当該dsRNAの殺虫活性を調べる必要性は低いと考えられた。

なお、本調査に用いた18種のうち3種 (*Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*及び*Nasonia vitripennis*) はコウチュウ目、チョウ目及びハチ目の各目の代表的な昆虫種であるが (Savard et al., 2006)、これらの3種は前述した生物検定により当該dsRNAに対して感受性を示さないことが確認されている (表2, p24; 表5, p32)。また、前述した生物検定の場合と同じく、ハエ目の昆虫に関しては、dsRNAの経口摂取によるRNAiの誘導が難しいため、生物検定による当該dsRNAの殺虫活性の調査は行っていない。

¹⁰2012年11月の時点で National Center for Biotechnology Information (NCBI) が公開している Whole Genome Shotgun (WGS) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/wgs/>) 及び UniGene (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/UniGene/>) の配列データベースから得られた塩基配列情報である。

表5 DvSnf7 遺伝子断片の配列とコウチュウ目ハムシ科以外の7つの目に属する昆虫18種の内在のSnf7 遺伝子断片の配列を比較した結果及び生物検定による殺虫活性の有無¹¹

目名	Snf7 遺伝子断片の配列を特定した種名	DvSnf7 遺伝子断片の配列との相同性 (%)	21 塩基長の一致 ^{1,6}	殺虫活性 ²
コウチュウ目	<i>Tribolium castaneum</i> ³ (コクヌストモドキ)	72.4 ⁴	0, (11 塩基)	無
チョウ目	<i>Bombyx mori</i> ³ (カイコ)	66.0	0, (15 塩基)	無
チョウ目	<i>Danaus plexippus</i> (オオカバマダラ)	65.7	0, (10 塩基)	-
チョウ目	<i>Manduca sexta</i> (タバコスズメ)	61.9	0, (8 塩基)	-
ハチ目	<i>Apis mellifera</i> ³ (セイヨウミツバチ)	72.5	0, (13 塩基)	-
ハチ目	<i>Bombus terrestris</i> (セイヨウオオマルハナバチ)	72.9	0, (12 塩基)	-
ハチ目	<i>Megachile rotundata</i>	65.1	0, (11 塩基)	-
ハチ目	<i>Nasonia vitripennis</i> ³ (キョウソヤドリコバチ)	71.2	0, (14 塩基)	無
ハチ目	<i>Solenopsis invicta</i> (ヒアリ)	66.9	0, (18 塩基)	-
ハエ目	<i>Aedes aegypti</i> (ネツタイシマカ)	68.4	0, (11 塩基)	- ⁵
ハエ目	<i>Anopheles gambiae</i> ³ (ガンビエハマダラカ)	67.5	0, (12 塩基)	- ⁵
ハエ目	<i>Drosophila melanogaster</i> ³ (キイロショウジョウバエ)	72.6	0, (9 塩基)	- ⁵
ハエ目	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	70.5	0, (20 塩基)	- ⁵
ハエ目	<i>Drosophila sechellia</i>	70.4	0, (12 塩基)	- ⁵
ハエ目	<i>Drosophila yakuba</i>	59.1	0, (8 塩基)	- ⁵
カメムシ目	<i>Acyrtosiphon pisum</i> ³ (エンドウヒゲナガアブラムシ)	72.5	0, (12 塩基)	-
バッタ目	<i>Locusta migratoria</i> ³ (トノサマバッタ)	70.9	0, (12 塩基)	-
ミジンコ目	<i>Daphnia pulex</i> (ミジンコ)	67.5	0, (14 塩基)	-

¹表中の各種由来のSnf7 遺伝子断片配列中で、DvSnf7 遺伝子断片配列と21塩基の長さで一致した配列の数

²生物検定(表2, p24; 別添資料7)においてDvSnf7 遺伝子断片のdsRNAの殺虫活性を調べた昆虫に関しては、殺虫活性の有無も参考として記載した。また、生物検定を行っていないものに関しては、「-」と表記した。

³Savardら(2006)が系統学的関係性を研究するために用いたモデル昆虫種(Savard et al., 2006)

⁴一般に公開されているデータベースを用いて算出した相同性のため、表4(p30; Bachman et al., 2013(添付文献6), Table 2)に記載の値と若干の差異がある。

⁵ハエ目の昆虫に関しては、dsRNAの経口摂取によるRNAiの誘導が難しいため、生物検定による当該dsRNAの殺虫活性の調査は行っていない。また、ハエ目ショウジョウバエ属の昆虫(*Drosophila* spp.)はdsRNAのみを経口摂取した場合にはdsRNAに対して感受性を示さず、幼虫を陽イオンリボソームに内包されたdsRNAを含む溶液に浸した場合にdsRNAに対し感受性を示すことが知られている(Whyard et al., 2009(添付文献2))。

⁶表中の種のSnf7 遺伝子配列がDvSnf7 遺伝子断片配列と21塩基以上の完全一致を含まない場合は、最長の配列の長さを記載した。なお、現在のところ文献を含め、連続した20塩基の一致の殺虫活性に関するデータはない。

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。

5 以上の2つのバイオインフォマティクス解析の結果 (表4, p30; 表5, p32) から、WCRW由来のDvSnf7遺伝子断片の配列は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫のSnf7遺伝子間では極めて高い相同性を有しているが、それ以外の昆虫のSnf7遺伝子とは相同性が低いことが確認された。さらに、バイオインフォマティクス解析の結果は、
10 前述した生物検定で示された「DvSnf7遺伝子断片のdsRNAは、標的昆虫であるWCRWと同じハムシ科に属する一部の昆虫にのみ特異的な殺虫活性を示す。」という結果を支持するものであった。

10 b. 経口摂取された dsRNA が昆虫に対して殺虫活性を示すためのその他の条件

15 経口摂取されたdsRNAが昆虫に対して殺虫活性を示すためには、その他にもいくつかの条件が必要である (表 6, p34~35)。まず、経口摂取されたdsRNAが細胞に取り込まれる前に分解されないことが重要である (Whyard et al., 2009 (添付文献2))。例えば、カメムシ目のミドリメクラガメ (*Lygus lineolaris*) に関する近年の研究で、唾液中に存在するリボヌクレアーゼはdsRNAを短時間で分解するため、ミドリメクラガメが
20 dsRNAを経口摂取しても遺伝子発現が抑制されることはないと報告されている (Allen and Walker, 2012 (添付文献7))。また、経口摂取されたdsRNAに元来感受性があるか否かも重要である。dsRNAの経口摂取に対してコウチュウ目昆虫が高い感受性を示す事例は既に報告されているが (Huvenne and Smagghe, 2010 (添付文献4))、
25 チョウ目昆虫のdsRNAへの感受性についてはばらつきがあり、チョウ目昆虫で殺虫活性を示すためにはコウチュウ目と比べてより高濃度のdsRNAの経口摂取が必要とされることが報告されている (Huvenne and Smagghe, 2010 (添付文献4); Terenius et al., 2011 (添付文献8))。さらに、前述したとおり、ハエ目ショウジョウバエ属の昆虫 (*Drosophila* spp.) はdsRNAのみを経口摂取した
30 場合にはdsRNAに対して感受性を示さず、幼虫を陽イオンリポソームに内包されたdsRNAを含む溶液に浸した場合にdsRNAに対し感受性を示すことが知られている (Whyard et al., 2009 (添付文献2))。

表 6 昆虫における dsRNA の殺虫活性を報告している文献情報のまとめ¹²

文献	種名及び目名	曝露方法	試験に用いられた dsRNA	曝露量又は濃度	曝露期間	結果	備考
Whyard et al. (2009)	<i>Drosophila melanogaster</i> (キイロショウジョウバエ): ハエ目	経口及び経皮 (幼虫をトランスフェクション試薬と共に dsRNA を含む溶液に浸している)	dsRNA; ATP 合成酵素のサブユニット E 構成蛋白質をコードする遺伝子の部分配列 (約 185bp) 又は <i>gus</i> 遺伝子断片 (約 400bp)	0.0-0.5 mg/ml	2 時間	LC ₅₀ (mg/g diet) (95% C.L.): 0.23 (0.17-0.30)	経口又は経皮摂取を通じての RNAi の誘導にはトランスフェクション試薬が必要; LC ₅₀ の値が高い理由は、曝露時間が短かったこと又は中腸細胞によっての取り込みが効率的ではなかったことが考えられる。
	<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ): コウチュウ目	経口 (小麦粉又は酵母に混ぜて与えている)	dsRNA; ATP 合成酵素のサブユニット E 構成蛋白質をコードする遺伝子の部分配列 (約 185bp) 又は <i>gus</i> 遺伝子断片 (約 400bp)	0.0-5.0 mg/ml の濃度で 10 μ l を 10 mg diet に混餌	7 日間	LC ₅₀ (mg/g diet) (95% C.L.): 0.0025 (0.0019-0.0031)	殺虫活性は種特異的な dsRNA を与えた時にのみ認められ、他の種に特異的な dsRNA を投与しても殺虫活性は認められなかった。したがって、dsRNA は特定の昆虫を標的とするように設計することが可能であることが示唆されている。また、dsRNA が殺虫活性を示さない場合は、標的とした内在性遺伝子配列と dsRNA の間に 19~21 塩基長の一致がないことが示されている。
	<i>Acyrtosiphon pisum</i> (エンドウヒゲナガアブラムシ): カメムシ目	経口 (人工飼料に混ぜて与えている)	dsRNA; ATP 合成酵素のサブユニット E 構成蛋白質をコードする遺伝子の部分配列 (約 185bp) 又は <i>gus</i> 遺伝子断片 (約 400bp)	0.5ml の溶滴 (droplet) 中に 0.0-3.0 mg/ml	7 日間	LC ₅₀ (mg/g diet) (95% C.L.): 0.0034 (0.0028-0.0039)	
	<i>Manduca sexta</i> (タバコスズメガ): チョウ目	経口 (固形飼料の表面に dsRNA を加えて与えている)	dsRNA; ATP 合成酵素のサブユニット E 構成蛋白質をコードする遺伝子の部分配列 (約 185bp) 又は <i>gus</i> 遺伝子断片 (約 400bp)	0.0-5.0 mg/ml の濃度で 25 μ l (25 mg diet の表面に加えられた)	7 日間	LC ₅₀ (mg/g diet) (95% C.L.): 0.011 (0.008-0.013)	

¹²表 6 (p34~35) 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 6 昆虫における dsRNA の殺虫活性を報告している文献情報のまとめ (続き)

文献	種名; 目名	曝露方法	試験に用いられた dsRNA	曝露量又は濃度	曝露期間	結果	備考
Huvenne and Smaghe (2010) (総説論文)	15 種; コウチュウ目、ハエ目、カメムシ目、ハチ目、シロアリ目、チョウ目及びバッタ目	経口又は経皮	種によって様々な dsRNA を用いている	種によって異なる曝露量又は濃度を用いている	種によって異なる曝露時間を用いている	コウチュウ目昆虫の dsRNA に対する感受性の値の範囲が ng/cm^2 又は ng/ml の単位で報告されている。また、他の目については RNAi を誘導するために必要な量を μg の単位で報告している	総説論文-著者は RNAi を用いた害虫防除に関して、以下に示す 5 つの要因がその殺虫効果に大きく影響を与えると結論している: dsRNA の濃度、塩基配列、dsRNA のサイズ、遺伝子抑制効果の持続性及び標的昆虫の成長段階
Terenius et al. (2011) (総説論文)	複数のチョウ目昆虫	経口、経皮又は注射	種によって様々な dsRNA を用いている	種によって異なる曝露量又は濃度を用いている	種によって異なる曝露時間を用いている	チョウ目昆虫において経口摂取した dsRNA が RNAi を誘導するためには、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ 以上の投与量が必要であると報告されている	総説論文-著者は、チョウ目昆虫における RNAi による殺虫効果について報告されている 150 以上の実験を調査し、チョウ目昆虫における RNAi による殺虫効果は大きなばらつきがあることを発見している。また、経口摂取の場合、効率的な殺虫効果を得るためには比較的高濃度の dsRNA が必要であると論じている。なお、著者が調査した実験報告の中には、混餌又は注射による投与などの実験データ、また非公開のデータも含まれている。
Allen and Walker (2012)	<i>Lygus lineolaris</i> (ミドリメクラガメ); カメムシ目	経口(小袋に入れた人工飼料に混ぜて与えている)	dsRNA; IAP 及び GFP 蛋白質をコードする遺伝子を標的としている	カプセルに $10\text{-}1,000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ の濃度で封入	24 時間; 投与 12 日後に LC_{50} を確認	平均生存比率 \pm 標準偏差: $1,000 \text{ ng}/\mu\text{l}$ で 0.73 ± 0.25 、 $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ で 0.66 ± 0.18 及び $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ で 0.80 ± 0.21	dsRNA を経口摂取したミドリメクラガメでは、標的とした内在性遺伝子のはっきりとした抑制効果は認められず、dsRNA を体内に注射したときのみ、殺虫活性が認められ、ミドリメクラガメの唾液が dsRNA を短時間で分解することがわかった。

3. まとめ

DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性スペクトルを調べるため、WCRW
との分類学的関連性を基に選んだ 14 種の昆虫に対する殺虫活性を試験した結
果、当該 dsRNA は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫
にのみ活性を示すことが確認された (第一-2-(1)-口- -iii-1, p23~27)。

経口摂取された DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA が WCRW に対して特異的な
殺虫活性を示すまでの経路を図 5 (p37) にまとめた。

当該 dsRNA は、本組換えトウモロコシの経口摂取を通じて、WCRW の
消化器官内に入り、中腸に到達する (図 5, p37; 第一-2-(1)-口- -ii, p16~22)。
次に、WCRW の中腸細胞に効率的に取り込まれる (図 5, p37; 第一-2-(1)-
口- -ii, p16~22)。そして、配列特異的な RNAi 機構を通じて、標的である
DvSnf7 遺伝子の発現を抑制し、WCRW に対して殺虫活性を示す (図 5, p37;
第一-2-(1)-口- -iii-2-a, p28~33)。この段階では、当該 dsRNA を構成する
配列は、ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する標的昆虫の Snf7 遺伝子と連続
する 21 塩基長の一致を含むほどの相同性を有するため、RNAi 機構を通じて
これらの Snf7 遺伝子発現を抑制する (第一-2-(1)-口- -iii-2-a, p28~33)。

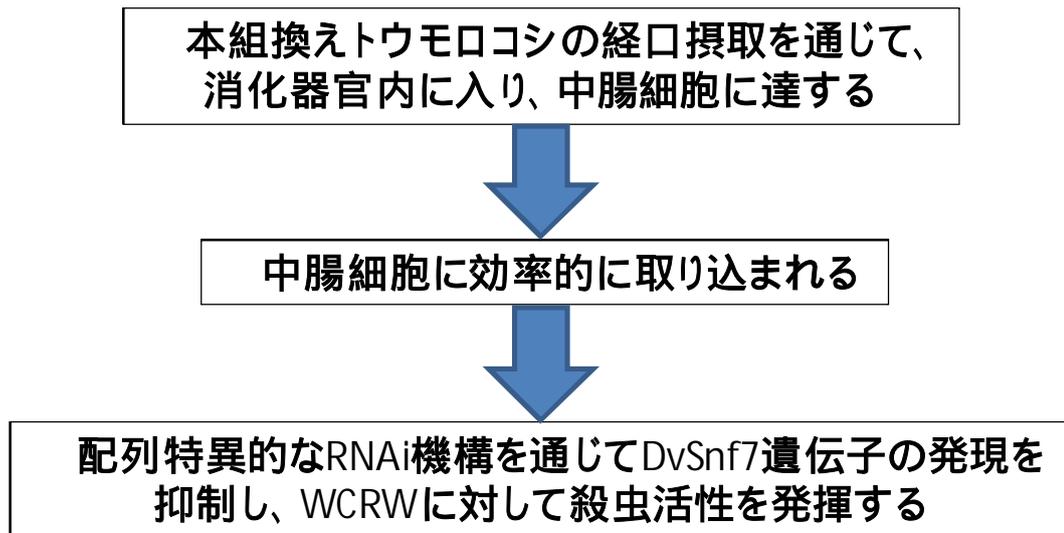
ハムシ科以外の非標的昆虫に関しては、及び の段階で、当該 dsRNA が
中腸細胞に達する前に分解される又は中腸細胞内に効率的に取り込まれない
などの障壁 (第一-2-(1)-口- -iii-2-b, p33~35) があり、当該 dsRNA が殺虫活性
を示す可能性は低いと考えられる。

また、仮に 及び の条件を満たしたとしても、 の段階において、当該
dsRNA はハムシ科以外の非標的昆虫の Snf7 遺伝子配列と殺虫活性を示すほ
どの相同性を有している可能性は低く (第一-2-(1)-口- -iii-2-a, p28~33)、これ
らの Snf7 遺伝子の発現を抑制するとは考えにくい。

さらに、経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導に関しては、dsRNA
のサイズ、RNAi の全身的伝搬、標的とする遺伝子の選択、dsRNA 配列、摂
取する dsRNA 量、遺伝子発現抑制の持続性に関わる機構、昆虫の生育段階等
の様々な要因も影響を及ぼすと考えられる (第一-2-(1)-口- -ii, p16~22)。

なお、第二の 2-(1) 有害物質の産生性 (p68~70) に記載しているように、ハ
ムシ科以外の非標的昆虫が、本組換えトウモロコシ中で発現している当該
dsRNA によって影響を受けるには、本組換えトウモロコシの経口摂取を通じ
て当該 dsRNA に曝露される必要がある。

5 以上のことから、本組換えトウモロコシ中で発現している当該 dsRNA の殺虫活性スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。



10 図 5 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA が WCRW に対して特異的な殺虫活性を示すまでの経路¹³

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。

iv. DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の土壤微生物に対する影響

5 前述したように本組換えトウモロコシ中で発現しているDvSnf7遺伝子断片のdsRNAの殺虫活性スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。

10 実際は当該dsRNAが、土壤に生息する真核生物に対して非意図的な活性を示さないことを確認するため、1. DvSnf7遺伝子断片の配列と土壤に生息する代表的な真核生物7種の遺伝子配列との相同性検索、及び2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壤における土壤微生物相試験を行った。

1. DvSnf7 遺伝子断片の配列と土壤に生息する代表的な真核生物 7 種の遺伝子配列との相同性検索

15

本解析を行うにあたって、分類学及び土壤生態系での役割を基に、土壤中に生息する真核生物7種 (表 7, p39; 別添資料9のTable 1, p4) を選んだ。これらの真核生物7種はそれぞれ系統的に離れており、土壤に生息する真核生物の中でも大部分を占めているアメーバ、藻類又は菌類の代表的な種となっている。また、これら7種は表 7 (p39) に記載しているように、土壤生態系で重要かつ多様な役割を担っている。

20 本解析では、まず真核生物7種の内在性のSnf7遺伝子中においてDvSnf7遺伝子断片に相当する配列を一般に公開されているゲノムデータベース情報¹を基に特定した。そして、これらの配列とDvSnf7遺伝子断片の配列の間の相同性を調査した (別添資料10)。その結果、これら真核生物7種のSnf7遺伝子断片の配列はDvSnf7遺伝子断片の配列と最長の262塩基でも53.8%を超える相同性を示すことはなかった。また、同じデータベース中でDvSnf7遺伝子断片と21塩基の長さで一致する配列がないことも確認された (表 7, p39; 別添資料10のTable 5, p9)。

30 したがって、これら真核生物7種においてDvSnf7遺伝子断片のdsRNAがRNAiを誘導するとはないと考えられた。

2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壤における土壤微生物相試験

35 本組換えトウモロコシによる土壤微生物への影響を調べるために、2012年に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MPA640B及び従来商業品種6品種を供試して土壤微生物相試験を行った (別添資料11)。

40 本試験では、植物体を温室でポット栽培し、約5葉期から6葉期頃にポット内の土壤に存在する細菌、糸状菌及び放線菌の菌数を計測した。

その結果、細菌、糸状菌及び放線菌の菌数に関して、本組換えトウモロコシ土壤及び対照の非組換えトウモロコシ土壤の間で統計学的有意差は認められなかった（別添資料 11 の Table 3, p29）。

したがって、本組換えトウモロコシが土壤微生物に影響を与える可能性は低いと考えられた。

以上の1. DvSnf7遺伝子断片の配列と土壤に生息する代表的な真核生物7種の遺伝子配列を比較する相同性検索、及び2. 本組換えトウモロコシを栽培した土壤における土壤微生物相試験の結果から、当該dsRNAは土壤に生息する生物に対して非意図的な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

表 7 DvSnf7 遺伝子断片の配列と土壤に生息する代表的な真核生物 7 種の遺伝子配列との相同性検索のまとめ¹⁴

種名	分類	土壤生態系での役割	21 塩基長の一致 ¹
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	アメーバゾア	バクテリア食真菌	0
<i>Blumeria graminis</i>	子囊菌 (病原性真菌)	植物病原菌	0
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	緑藻植物	光合成生物	0
<i>Laccaria bicolor</i>	担子菌	外生菌根菌	0
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	担子菌 (病原性真菌)	白腐病菌 リグニンの分解者	0
<i>Rhodotorula glutinis</i>	担子菌 (酵母)	鉄を含む 有機物の生産者	0
<i>Tetrahymena thermophila</i>	繊毛虫	バクテリア食真菌	0

¹表中の真核生物7種の塩基配列データベース中で、DvSnf7遺伝子断片配列（240塩基）と21塩基の長さで一致した配列の数

¹⁴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。

v. DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の脊椎動物に対する影響

5 前述したように本組換えトウモロコシ中で発現しているDvSnf7遺伝子断片のdsRNAの殺虫活性スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されると結論された。しかし、念のため当該dsRNAが、ヒトを含む脊椎動物に対して非意図的な活性を示さないことを、1. 経口摂取したdsRNAによるRNAiの誘導を妨げる様々な障壁、2. RNAを含む作物を安全に食してきた歴史、3. 本組換えトウモロコシ中の当該
10 dsRNAの発現量の3つの観点から考察した。

1. 経口摂取した dsRNA による RNAi の誘導を妨げる様々な障壁

15 脊椎動物は、以下に示すように経口摂取された dsRNA による RNAi の誘導を妨げる様々な障壁を有することから、当該 dsRNA が遺伝子の発現に影響を及ぼすことはないと考えられる。

a. 唾液、胃液、腸液、膵臓分泌液及び血管中に存在する核酸分解酵素

20 元来ヒトを含めた脊椎動物が摂取する食物中にはdsRNAなどの核酸が遍在しているため、ヒトを含めた脊椎動物は経口摂取されたdsRNAの活性を妨げる障壁を持っているものと考えられる。一般的にそれらの障壁は、核酸の塩基配列に関わらず、体内に入る全ての核酸に対しての障壁として機能していると考えられる。ヒトを含む哺乳類に関しても経口摂取されたdsRNAは、まず唾液中に存在するリボヌクレアーゼによって分解され (Park et al., 2006)、その後も胃中の酸性条件下で分解されることが知られている (Loretz et al., 2006; Akhtar, 2009; O'Neill et al., 2011)。また胃腸管腔及び消化液中のリボヌクレアーゼ並びに膵臓分泌液中の核酸分解酵素及び胆汁塩も経口摂取されたdsRNAによるRNAiの誘導を妨げる障壁
25 になっていると考えられる (Loretz et al., 2006; O'Neill et al., 2011)。さらに血管中にもリボヌクレアーゼが存在している (Houck, 1958)。

30 なお、消化に関わる酵素の構造や機能に関しては、全ての脊椎動物で共通している。哺乳類と同じように魚類、両生類、爬虫類及び鳥類も核酸を分解するリボヌクレアーゼを有している (Stevens and Hume, 2004)。したがって、哺乳類に存在する経口摂取された RNA に対する障壁が同じように魚類、両生類、爬虫類及び鳥類を含む脊椎動物にも存在している
35 と考えられる。

b. 細胞内へのdsRNAの取り込みを妨げる障壁

仮に dsRNA が唾液、胃液、腸液及び血管中で分解されなかったとしても、細胞内に取り込まれない限りは標的とする遺伝子の発現を抑制することはできない。一般的に dsRNA のような分子量が大きく、親水性の物質は腸上皮組織の細胞膜を透過することができず、それも経口摂取された dsRNA による RNAi 誘導を妨げる物理的な障壁となっている (Sioud, 2005; Akhtar, 2009; O'Neill et al., 2011)。250 nM の高い濃度で siRNA を培養細胞中に導入する実験では、トランスフェクション試薬などを用いなければ siRNA を培養細胞内へ導入することは出来ないことが報告されている (Lingor et al., 2004)。さらに外来の RNA は細胞のエンドサイトーシス及びリソソームによって隔離・分解されることも知られている (Gilmore et al., 2004; Sioud, 2005)。

c. RNAの細胞内への運搬に関する数多くの研究

細胞内へのRNAの取り込みに関しては、その高い特異性からRNAオリゴヌクレオチドなどのRNAiメカニズムを通して効果を発揮する核酸医薬品の開発に関心が集まり、核酸医薬品の開発のため数多くの研究がなされているが、全身組織へRNAを運搬することが未だに課題として残っている (Behlke, 2006; Nguyen et al., 2008; Vaishnaw et al., 2010; O'Neill et al., 2011)。RNAオリゴヌクレオチドの全身組織への運搬は難しく、核酸医薬品の開発を妨げる大きな要因の1つとなっており、オリゴヌクレオチドを用いた治療では、化学修飾により安定な状態に保つための徹底した処置を施した場合、特殊な脂溶性の運搬体を用いて製剤化した場合又はその両方を用いた場合にのみ効能が認められている (Behlke, 2006)。例えば、マウスのアポ蛋白質の遺伝子を標的とし、薬品で安定化させたsiRNAを静脈注射で50mg/kg投与した場合でも、抑制効果は認められなかった (Soutschek et al., 2004)。この50mg/kgという量は、本組換えトウモロコシの摂食を通じて摂取するdsRNA量と比べると非常に多い量である。この報告以外にも細胞内へのRNAの取り込みに関する数多くの研究がなされているが、これまでのところ特殊な条件下以外で脊椎動物の細胞が効率的にRNAを取り込んだという報告はなく、細胞内へのRNAの取り込みがRNAiメカニズムにおける大きな障壁であることが知られている。よって、本組換えトウモロコシを摂食することでヒトを始めとする脊椎動物を含めた標的とする昆虫以外の動物等への影響は考えにくい。

2. dsRNAを含む作物を安全に食してきた歴史

RNAのような核酸は動植物中には普遍的に存在している。ヒトや家畜の遺
5 伝子と高い相同性を有するRNAがイネ子実中には何千と存在することが報告
されており、イネ子実中に存在する21bpの短いRNAの一部はヒトの重要な遺
伝子配列と100%の相同性を示している (Ivashuta et al., 2009)。また、多くの真
核生物中ではRNAiを誘導するsiRNAの前駆体であるdsRNAも存在している
10 (Ivashuta, et al., 2009; Parrott et al., 2010)。さらに、植物細胞には多数の内在性
dsRNA、miRNA及びsiRNAなどが存在すると同時に、細胞中に蓄積された外
来ウイルス由来のdsRNAも存在する (Gould and Francki, 1981; Fukuhara et al.,
1993; Cock et al., 1997; Heisel et al., 2008; Ivashuta et al., 2009; Petrick et al., 2013
(添付文献9); Jensen et al., 2013 (添付文献10))。これらのことは脊椎動物が様々
なRNAを安全に食してきた長い歴史があることを示している。

15
なお、動物に関して、Zhangら (2012a) は経口摂取されたRNAによるRNAi
の誘導を報告している。Zhangら (2012a) は、マウスに未調理のイネ子実を大
量 (ヒトの摂取量に換算すると調理したイネ子実を約33kg/day摂取した場合
と同程度) に摂取させた後、マウスの血清及び肝臓中でイネ由来の複数の
20 miRNAを検出し、検出されたmiRNAの1つであるmiR168aと相同性を示す遺伝
子の蛋白質発現量がマウス体内で減少し、血漿中のLDLコレステロールが増
加したと報告している (Zhang et al., 2012a)。

しかしながら、Zhangら (2012a) とは別のグループであるZhangら (2012b)¹⁵
の報告によると、Zhangら (2012a) の報告中にあるマウスから検出された
25 miRNAは塩基配列解析の際に生じた本来存在しないはずの配列である可能性
が示唆されている。また、Zhangら (2012a) がマウスに与えた大量のイネ子実
を含む食事は、通常摂取する食事と比べると脂質、コレステロール及び炭水
化物が低く栄養学的に偏っている。マウスの血漿中のLDLコレステロール量
は、絶食後の短時間に栄養学的に偏った食事を摂取することで影響を受ける
30 ことが知られている (Ryu et al., 2005)。このことから、Zhangら (2012a) が報
告している血漿中のLDLコレステロールの増加に関しても、絶食後に短時間
で大量のイネ子実を与えるという試験条件によって引き起こされた可能性が
考えられる。さらに、その他の文献及び英国政府の諮問機関である新開発食
品諮問委員会 (The Advisory Committee on Novel Foods and Processes, ACNFP)
35 及び遺伝子組換え作物の環境への放出についての諮問委員会 (Advisory

¹⁵(Zhang et al., 2012a) の著者と (Zhang et al., 2012b) の著者は同姓だが、まったくの別人である。

Committee on Releases to the Environment, ACRE) もZhangら (2012a) の報告について検討を行ったが、報告にある実験結果の確証を得ることはできず、実験の再現性及び実験データの解釈について疑問を呈している (ACNFP, 2011; ACRE, 2011; Snow et al., 2013; Witwer et al., 2013)。

5 以上のように、Zhangら (2012a) が報告しているマウス体内での経口摂取されたRNAによるRNAiの誘導に関しては試験結果の妥当性に疑問が生じている。

3. 本組換えトウモロコシにおけるDvSnf7遺伝子断片のRNAの発現量

10

前述したようにRNAのような核酸は植物中には普遍的に存在しており、例えばダイズの種子に含まれる総RNA量は平均407.3 μ g/g 乾燥重 (範囲: 274.7-986.6 μ g/g) 及び21bp~24bpのsiRNA量は平均0.66 μ g/g 乾燥重と報告されている (Ivashuta et al., 2009)。一方、本組換えトウモロコシ穀粒中の当該RNA
15 の平均発現量は0.000012 μ g/g 乾燥重 (表11, p58) である。したがって、本組換えトウモロコシ穀粒における当該dsRNAの発現量は植物中に存在するsiRNA量と比較すると非常に低いといえる。

4. 結論

20

脊椎動物に関しては、経口摂取されたdsRNAによるRNAiの誘導を妨げる様々な障壁を有している。また、RNAのような核酸は動植物中には普遍的に存在しており、脊椎動物が様々なRNAを安全に食してきた長い歴史があるといえる。さらに、本組換えトウモロコシ穀粒中の当該dsRNAの平均発現量は
25 0.000012 μ g/g 乾燥重で、一般的に摂取する植物由来の食物に含まれるRNA量と比較して極微量である。したがって、脊椎動物が本組換えトウモロコシから当該dsRNAを摂取したとしても、様々な障壁によりdsRNAは速やかに分解され、摂取した脊椎動物の体内において当該dsRNAがRNAiを誘導する可能性は極めて低いと考えられる。

vi. アレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性

5 RNAがアレルギー性や毒性を持つという報告はなく、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品庁 (FDA) によりGRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている (FAO-WHO, 1991; FDA, 1992)。

10 **【改変 Cry3Bb1 蛋白質】**

改変 Cry3Bb1 蛋白質は米国のトウモロコシ栽培の主要コウチュウ目害虫であり、トウモロコシの根を食害する CRW に対する殺虫活性を示す (表 8, p45)。

15 改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科のそれぞれに属する CPB と CRW に対して殺虫活性を示し (Head et al., 2001; EPA, 2010)、その他の昆虫に殺虫活性を示すという報告はない。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していないことは文献調査により示されている (中根ら, 1963)。

20 なお、本組換えトウモロコシで産生される改変 Cry3Bb1 蛋白質は、すでに第一種使用規程の承認を受けた他の遺伝子組換えトウモロコシ (MON88017) においても導入されており、新規のものではない。

25 改変 Cry3Bb1 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どうか AD_2012¹⁶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、既知アレルゲンと類似性は認められなかった。

¹⁶AD_2012 : 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、2011 年 12 月の時点で 1,603 配列が含まれる。

表 8 改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトル (様々な昆虫の改変 Cry3Bb1 蛋白質への感受性)¹⁷

目	科	亜科	学名	LC ₅₀ ^a 又は 最大濃度 ^b (µg/mL diet)	殺虫活性*	日本での 生息の有無
Hemiptera (カメムシ目)	Anthocoridae (ハナカメムシ科)	Anthocorinae (ハナカメムシ亜科)	<i>Orius insidiosus</i>	930 ^b	無	同属種は生息
Collembola (トビムシ目)	Isotomidae (ツチトビムシ科)	Proisotominae (ヒメツチトビムシ亜科)	<i>Folsomia candida</i>	872.5 ^b	無	同属種は生息
Neuroptera (アミメカゲロウ目)	Chrysopidae (クサカゲロウ科)	Chrysopinae (クサカゲロウ亜科)	<i>Chrysopa carnea</i>	8,000 ^b	無	同属種は生息
Hymenoptera (ハチ目)	Apidae (ミツバチ科)	Apinae (ミツバチ亜科)	<i>Apis mellifera</i> (セイヨウミツバチ)	360 ^b	無	同属種は生息
	Pteromalidae (コガネコバチ科)	Pteromalinae (コガネコバチ亜科)	<i>Nasonia vitripennis</i> (キョウソヤドリコバチ)	400 ^b	無	生息
Lepidoptera (チョウ目)	Crambidae (ツトガ科)	Pyraustinae (ノメイガ亜科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	200 ^b	無	同属種は生息
	Noctuidae (ヤガ科)	Heliothinae (タバコガ亜科)	<i>Helicoverpa zea</i>	200 ^b	無	同属種は生息
Coleoptera (コウチュウ目)	Curculionidae (ゾウムシ科)	Dryophthorinae (キクイサビゾウムシ亜科)	<i>Sitophilus oryzae</i> (ココクゾウムシ)	200 ^b	無	生息
		Anthonominae (ハナゾウムシ亜科)	<i>Anthonomus eugeni</i>	200 ^b	無	同属種は生息
			<i>Anthonomus grandis</i>	50 ^b	無	同属種は生息
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	Tenebrioninae (ゴミムシダマシ亜科)	<i>Tribolium castaneum</i> (コクヌストモドキ)	200 ^b	無	生息
	Coccinellidae (テントウムシ科)	Coccinellinae (テントウムシ亜科)	<i>Hippodamia convergens</i>	8,000 ^b	無	同属種は生息
			<i>Coleomegilla maculata</i>	MON 863 Pollen at 93 µg/g pollen	無	×
	Carabidae (ゴミムシ科)	Harpalinae (ゴモクムシ亜科)	<i>Poecilus chalcites</i>	930 ^b	無	同属種は生息
	Bruchidae (マメゾウムシ科)	Bruchinae (マメゾウムシ亜科)	<i>Callosobruchus maculatus</i> (ヨツモンマメゾウムシ)	200 ^b	無	生息
	Chrysomelidae (ハムシ科)	Chrysomelinae (ハムシ亜科)	CPB (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	2.7 ^a	有	×
		Galerucinae (ヒゲナガハムシ亜科)	CRW (<i>Diabrotica virgifera</i>)	75 ^a	有	×

*コウチュウ目ハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科の2つの亜科に属する種に殺虫活性を示した。

^a LC₅₀=半数致死濃度; ^b 投与された最大濃度

¹⁷ 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。

【DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA + 改変 Cry3Bb1 蛋白質】

5 改変 Cry3Bb1 蛋白質のような Bt 蛋白質の作用機作については数多くの研究がなされている (OECD, 2007)。一般的に、Bt 蛋白質は昆虫体内で結晶封入体から蛋白質分解酵素により活性を持つ毒素へと変換され、中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン小孔を形成することにより、恒常性を失い、敗血症を引き起こすことで殺虫活性を示すことが知られている (Broderick et al., 2006)。一方、DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA は核酸レベルで作用し、RNAi 機構を通して殺虫活性を示すため、Bt 蛋白質とは全く異なった作用機作を有している。

10 このことから、改変 Cry3Bb1 蛋白質のような Bt 蛋白質と当該 dsRNA が相互作用を起こす可能性は低いと考えられたが、実際に WCRW を用いた生物検定 (別添資料 12) により、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質間の相互作用がないことを以下のように確認した。

15 なお、致死量の改変 Cry3Bb1 蛋白質は、標的昆虫に 1 日で全身毒性を誘導することができるという報告されており (James et al. 1999)、モンサント・カンパニーが行った生物検定でも、投与後 2 日又は 3 日で殺虫効果が認められている。一方、当該 dsRNA の場合、投与後 5 日又は 6 日目までは殺虫効果が認められなかった (Bolognesi et al., 2012 (添付文献 3))。つまり、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び当該 dsRNA を同時に WCRW に投与した場合、当該 dsRNA の殺虫効果が観察される前に改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫効果が現れてしまい、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質間の相互作用は観察できなくなってしまう。このような状況を避けるため、相互作用を調査する生物検定においては、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び当該 dsRNA 間の致死に至るまでの時間差も考慮に入れ、試験を設計した。

20 具体的には、生物検定の際に、当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫効果の区別がつかなくなる状況を避けるため、当該 dsRNA の投与濃度を $0\sim 50\text{ng}/\text{cm}^2$ diet の範囲で複数設定し、当該 dsRNA の各投与濃度における殺虫効果が確認できる条件を設定する一方で、改変 Cry3Bb1 蛋白質については、¹⁸ 亜致死濃度¹⁸で一定量加えることで生物検定を行った。このことにより、当該 dsRNA を単独で与えた場合の殺虫効果と比較した際に、仮に 2 つの条件間での LC_{50} 及び傾きに有意差が認められた場合は、その差異によって改変 Cry3Bb1 蛋白質と当該 dsRNA 間の相互作用を検出できると考えられる。

35 なお、本試験設計は 2 つの物質の相乗効果を評価するために、Tabashnik

¹⁸ $625\text{ng}/\text{cm}^2$ diet はモンサント・カンパニーで行った試験で推定された改変 Cry3Bb1 蛋白質の WCRW に対する LC_5 (5%致死濃度; 亜致死量) の数値となっている。

(1992) 及び Cassee ら (1998) で報告されている一般的な手法 (Tabashnik, 1992 (添付文献 11); Cassee et al., 1998 (添付文献 12)) に基づいたものとなっている。また、本試験と同様に異なる作用機構を持つ毒性物質間の相互作用の評価方法として、亜致死濃度の毒性物質を一定量加える手法は、Bt 蛋白質及びプロテアーゼインヒビターとの相互作用を評価する際に用いたことが Tabashnik (1992) によって報告されている (Tabashnik, 1992 (添付文献 11))。

WCRW を用いた試験では、人工的に合成した当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質を用いて、(i) 異なる濃度の当該 dsRNA のみを混餌した条件及び (ii) 異なる濃度の当該 dsRNA に一定量の改変 Cry3Bb1 蛋白質 (625ng/cm² diet) を加えて共に混餌した条件で試験を行い、投与後 7 日目に WCRW の生存率を調査した (別添資料 12)。因みに、この試験で用いられている改変 Cry3Bb1 蛋白質の濃度は、本組換えトウモロコシの花粉及び穀粒組織で発現している改変 Cry3Bb1 蛋白質と同程度にしている。

試験の結果、WCRW の投与された濃度に対する反応は、当該 dsRNA のみを混餌した条件及び当該 dsRNA に一定量の改変 Cry3Bb1 蛋白質を加えて共に混餌した条件の 2 つの条件下でほぼ同等であった。625ng/cm² diet の改変 Cry3Bb1 蛋白質のみを混餌した条件下では、WCRW の生存率は 100% だった。当該 dsRNA のみを混餌した条件及び当該 dsRNA に一定量の改変 Cry3Bb1 蛋白質を加えて混餌した条件の 2 つの条件下の LC₅₀ は、それぞれ 4.7 ng/cm² diet 及び 5.1 ng/cm² diet であり、統計学的有意差は認められなかった (表 9, p49)。また、これら 2 つの濃度反応から得た傾きもそれぞれ 1.7 及び 1.6 であり、統計学的有意差は認められなかった (表 9, p49; 図 6, p49; 別添資料 12; 別添資料 13 の Table 1, p8 及び Figure 1, p9)。したがって、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して働くことはないと考えられた。

上記の生物検定において、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質は相互作用を示さないことが明らかになったことから、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質に関しては、農薬の混合剤を評価する際と同様に個別評価の原則を適用をすることができる。個別評価の原則は毒性学の分野で用いられてきた長い歴史がある。混合物中に存在する物質それぞれが相互作用を示さず、なおかつそれらの物質への曝露量が最大無作用量を超えない場合は、それらの物質の個別のデータから混合物の評価をすることができる (EPA, 2009)。

改変 Cry3Bb1 蛋白質に関しては、コウチュウ目の 6 つの科に属する昆虫に対する殺虫活性を調べる生物検定が行われ、WCRW 及び CPB を含むハムシ

科の昆虫に対してのみ殺虫活性が認められた (EPA, 2010)。同じように DvSnf7 遺伝子断片に関しても、コウチュウ目の 4 つの科に属する昆虫に対する殺虫活性を調べる生物検定が行われたが、ハムシ科の中でも、経口摂取された dsRNA に感受性を示すことが報告されている CPB (Baum et al., 2007b) に対しては殺虫活性が認められず、同ハムシ科のヒゲナガハムシ亜科に属する CRW にのみ殺虫活性が認められた。したがって、当該 dsRNA の殺虫スペクトルは改変 Cry3Bb1 蛋白質よりも小さく、また、それらが相互作用を示すことはないということから、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質それぞれの殺虫活性は個別に評価した場合と変わらないと考えられる。

5

10

よって、本組換えトウモロコシ中で発現している当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトルはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には広がらないと結論された。

15

なお、殺虫スペクトルがある程度重複していて、独立した作用機作を有する 2 つの発現産物を同時に発現させることにより、非感受性害虫が発生する確率を、1 種類の発現産物を単独で発現するコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシと比べてより一層低くできると期待されている (Roush, 1998)。

表 9 7日間の WCRW への生物検定で、DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA のみを混餌した条件及び当該 dsRNA に一定量の改変 Cry3Bb1 蛋白質を加えて混餌した条件下で得られた LC₅₀¹⁹

条件	LC ₅₀		p 値	傾き	標準誤差		p 値
	(ng DvSnf7 遺伝子断片 の dsRNA/cm ² diet)	標準誤差			標準誤差	p 値	
DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA のみ	4.7	0.49		1.7	0.13		
DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA 及び 改変 Cry3Bb1 蛋白質 ¹	5.1	0.62	0.568	1.6	0.16	0.793	

5 ¹ 各 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA 量に改変 Cry3Bb1 蛋白質の一定量 (625 ng/cm² diet) が加えられた。

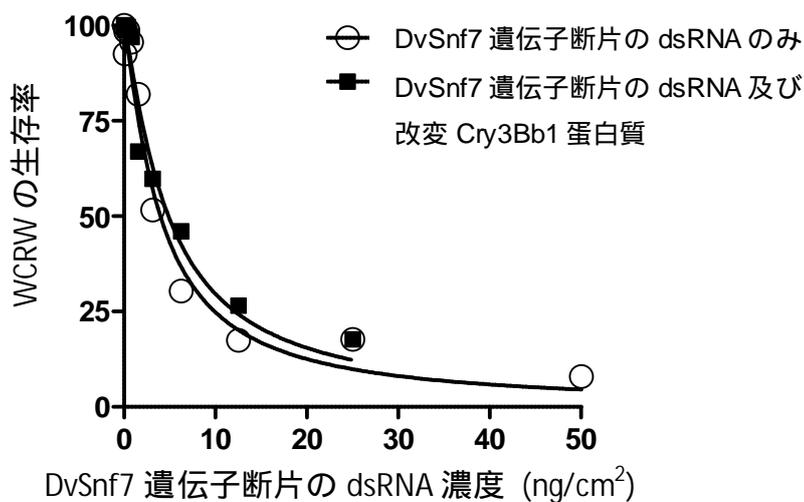


図 6 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA のみを混餌した条件及び当該 dsRNA に一定量 (625 ng/cm² diet) の改変 Cry3Bb1 蛋白質を加えて混餌した条件下での WCRW の生存率²⁰
2つの条件下の LC₅₀ 及び傾きにおいて、統計学的有意差は認められなかった (p>0.05)。

¹⁹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。

²⁰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。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

5 本組換えトウモロコシで発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium*
CP4 株より単離された遺伝子で、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成
酵素 (CP4 EPSPS) をコードしており、除草剤グリホサートに高い耐性を持つ
改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。植物はグリホサートを処理すると 5-エノ
10 ールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下
「EPSPS 蛋白質」という。) が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳
香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。しかし、改変 *cp4 epsps* 遺伝
子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活
性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキ
ミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

15 改変 CP4 EPSPS 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
するかどうか AD_2012 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、既知アレルゲンと類似性は認められなかった。

20 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA】

25 DvSnf7 遺伝子断片はトウモロコシの内在性遺伝子ではなく、コウチュウ目
ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝
子配列であるため、宿主の遺伝子の発現を抑制することはないと考えられる。
実際にトウモロコシの転写産物データベースを用いて、トウモロコシ中の転
写産物の配列と DvSnf7 遺伝子断片の配列の相同性検索の結果、DvSnf7 遺伝
子断片の配列は宿主であるトウモロコシ中で発現している mRNA と高い相同
性を有していないことが確認されている (別添資料 10)。また、dsRNA は構造
30 的にリボソームでの翻訳が阻害されるため (Kozak, 1989)、DvSnf7 遺伝子断片
の dsRNA が新たな蛋白質を発現する可能性は極めて低い。したがって、宿主
の代謝系を変化させることはないと考えられる。

【改変 Cry3Bb1 蛋白質】

35 改変 Cry3Bb1 蛋白質は *Bacillus thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質 (Bt 蛋白質) の 1 つである。Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムに
ついては数多くの研究がなされており (OECD, 2007)、これまでのところ Bt

蛋白質が他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下、「S3P」という。) と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

【DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA + 改変 Cry3Bb1 蛋白質 + 改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

上記のとおり、本組換えトウモロコシで発現している DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質はそれぞれ異なる作用機作を有していることから、独立して作用していると考えられる。また、当該 dsRNA 配列は、改変 *cry3Bb1* 遺伝子、改変 *cp4 epsps* 遺伝子及びトウモロコシ内在性の遺伝子の配列とは 21 塩基長の一致を有さないため、RNAi によりこれら遺伝子の発現を抑制するとは考えにくい。実際に、本組換えトウモロコシ中の改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現は確認されている (表 12~表 13, p59~60; 別添資料 19 の Table 1~2, p13~14)。さらに、これらの発現産物はそれぞれ、蛋白質を産生しない、酵素活性を持たない又は高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。したがって、当該 dsRNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が、植物体内において相互に影響する可能性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

5 本組換えトウモロコシの作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-ZMIR10871 は、*Escherichia coli* 由来のベクター pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

ロ 特性

10

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プラスミド・ベクター PV-ZMIR10871 の塩基数は 16,497bp である。

15

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20

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 *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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

25

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

30

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 (p12~15) 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と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p11) に示した。

35

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-ZMIR10871 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。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

5

従来トウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚をプラスミド・ベクター PV-ZMIR10871 を含む *Agrobacterium tumefaciens* ABI 株と共置培養した後、未成熟胚をグリホサート及び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選抜するために除草剤グリホサートを使用した。

10

核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

15

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。なお、本組換えトウモロコシにアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルベニシリン無添加の培地に本組換えトウモロコシを移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

20

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

25

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) を土壤に移植した。その後、合計 5 回の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。

30

本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の解析、導入遺伝子の発現の安定性及びわが国で隔離ほ場試験に供試する予定の世代については、図 7 (p54) の育成図に記載した。なお、本申請の対象は、LH244 R4 世代及び LH244 R4 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図7 本組換えトウモロコシの育成図

25

30

【社外秘につき非開示】

35

(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

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: BC2F1 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: BC2F1 世代 (図 7, p54) 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 Real-Time 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 DvSnf7 遺伝子断片、改変 *Cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子のいずれも持たない反復親と従来育種法を用いて交配し、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 End-Point TaqMan PCR 法により選抜し、再度戻し交配を行って TI: BC2F1 世代を作出した。この TI: BC2F1 世代において End-Point TaqMan PCR 法により T-DNA 領域の有無を確認し、分離比を出し、その分離比を用いて、カイ二乗検定を行った (別添資料 14)。

15

20

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法則に従い分離していることが確認された (表 10, p55; 別添資料 14 の Table 1, p7)。したがって、本組換えトウモロコシの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

表 10 本組換えトウモロコシにおける導入遺伝子の分離比²¹

世代	供試個体数 ¹	実測値 ²		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 ³
TI: BC2F1	2063	1027	1036	1031.50	1031.50	0.04	0.843

30

¹ BC2F1 世代の 2063 個体は、TI: BC1F1 世代と交雑した 6 つの非組換えトウモロコシ品種 (HCL301、HCL645、HCL4029、F1266Z、R6388Z 及び R2281Z) の 72 個体の親世代から得られた。

² 実測値は End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA 領域の有無を確認した。

³ BC2F1 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p \leq 0.05$)。

²¹ 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。

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 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えトウモロコシの核ゲノム中の1ヵ所に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(別添資料15のFigure 4~6, p32~34)。また、T-DNA領域以外の外側骨格領域は挿入されていないことが確認された(別添資料15のFigure 7~8, p35~36)。

10 さらに導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代(R4F1世代、R4世代及びR5世代)におけるサザンブロット分析により確認された(別添資料16のFigure 4, p15)。

15 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15のFigure 4~6, p32~34)。

20 (6)の 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

25 ウェ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(R4F1, 世代、R4及びR5世代)において改変Cry3Bb1蛋白質及び改変CP4 EPSPS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17のFigure 2~3, p11~12)。

30 2012年に米国で行った温室試験において、4反復で生育した本組換えトウモロコシの様々な組織のサンプルを採取し、DvSnf7遺伝子断片のRNAの発現量をQuantiGene Plex 2.0 Assay²²により分析した(別添資料18)。その結果、本組換えトウモロコシの葉、根、絹糸及び穀粒において、当該RNAの発現が確認された(表11, p58; 別添資料18のTable 1, p14)。しかしながら、花粉における当該RNAの発現量は、全てのサンプルで定量限界値(LOQ)未満であった(表11, p58; 別添資料18のTable 1, p14)。

35 2011年に米国で行った温室試験において、4反復で生育した本組換えトウ

²²Quantigene Plex 2.0 assayは、磁気ビーズ及び配列特異的なプローブなどを用いて標的のRNAを捉え、蛍光発光を検出することにより、その発現量を測定する手法である。

5 モロコシの様々な組織のサンプルを採取し、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 19)。その結果、本組換えトウモロコシの葉、根、絹糸、花粉及び穀粒において、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現が確認された (表 12~表 13, p59~60; 別添資料 19 の Table 1~2, p13~14)。

表 11 本組換えトウモロコシの葉、根、絹糸、花粉及び穀粒における DvSnf7 遺伝子断片の RNA レベル (2011 年、米国)²³

組織	生育段階 ¹	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ²	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ³	LOD/LOQ ⁴ ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
葉	6~8 葉期	0.001479 (0.000279) 0.001100 – 0.001761	0.013232 (0.002498) 0.009844 – 0.015760	0.000034/ 0.000141
根	6~8 葉期	0.000399 (0.000030) 0.000368 – 0.000436	0.009227 (0.000705) 0.008515 – 0.010102	0.000009/ 0.000039
絹糸	絹糸抽出期	0.000223 (0.000028) 0.000199 – 0.000263	0.002107 (0.000266) 0.001875 – 0.002485	0.000003/ 0.000012
花粉	雄穂抽出期	N/A ⁵ (N/A) <LOQ	N/A (N/A) <LOQ	0.000004/ 0.000018
穀粒 ⁶	成熟期	0.000011 (0.000005) <LOQ – 0.000015	0.000012 (0.000006) <LOQ – 0.000017	0.000001/ 0.000006

¹採取した各組織の生育段階

5 ² DvSnf7 遺伝子断片の RNA レベル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、dsRNA レベルは組織の新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。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 (1 サンプル/反復、4 反復)。なお、穀粒は 2 サンプルが定量限界値未満だったため、残りの 2 サンプルを用いて平均値等を計算した (1 サンプル/反復、2 反復)。また、花粉は全てのサンプルで定量限界値未満だったため、平均値等は計算されなかった。SD=標準偏差

10 ³ DvSnf7 遺伝子断片の RNA レベル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、dsRNA レベルは組織の乾燥重 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。SD=標準偏差

⁴LOD=検出限界; LOQ=定量限界

15 ⁵N/A=該当しない

⁶分析に用いられた穀粒は、収穫穀粒ではなく、試験で播種された穀粒と同じロットで生産された穀粒である。

²³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 12 本組換えトウモロコシの葉、根、花粉、絹糸及び穀粒における改変 Cry3Bb1 蛋白質の発現量 (2011 年、米国)²⁴

組織	生育段階 ¹	平均値 (SD) 範囲 (µg/g 新鮮重) ²	平均値 (SD) 範囲 (µg/g 乾燥重) ³	LOD/LOQ ⁴ (µg/g 新鮮重)
葉	6~8 葉期	44 (16) 33 – 68	400 (140) 290 – 610	0.006/0.035
根	6~8 葉期	42 (1.7) 40 – 44	980 (39) 930 – 1000	0.028/0.035
花粉	雄穂抽出期	30 (1.9) 28 – 32	53 (3.4) 50 – 58	0.018/0.035
絹糸	絹糸抽出期	11 (3.2) 8.8 – 15	110 (30) 83 – 140	0.010/0.035
穀粒 ⁵	成熟期	3.9 (0.65) 3.5 – 4.9	4.4 (0.73) 3.9 – 5.5	0.007/0.035

¹ 採取した各組織の生育段階

5 ² 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新鮮重 1g 当たりの µg で表されている。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 (1 サンプル/反復、4 反復)。SD=標準偏差

10 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。SD=標準偏差

⁴ LOD=検出限界; LOQ=定量限界

⁵ 分析に用いられた穀粒は、収穫穀粒ではなく、試験で播種された穀粒と同じロットで生産された穀粒である。

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。

表 13 本組換えトウモロコシの葉、根、花粉、絹糸及び穀粒における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量 (2011 年、米国)²⁵

組織	生育段階 ¹	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) ²	平均値 (SD) 範囲 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) ³	LOD/LOQ ⁴ ($\mu\text{g/g}$ 新鮮重)
葉	6~8 葉期	4.6 (0.49) 4.0 – 5.2	41 (4.4) 36 – 46	0.071/0.137
根	6~8 葉期	2.9 (0.77) 2.0 – 3.9	66 (18) 47 – 90	0.033/0.068
花粉	雄穂抽出期	15 (0.45) 14 – 15	26 (0.80) 25 – 27	0.099/0.137
絹糸	絹糸抽出期	4.5 (0.24) 4.2 – 4.8	43 (2.2) 40 – 45	0.121/0.137
穀粒 ⁵	成熟期	2.7 (0.13) 2.5 – 2.8	3.0 (0.14) 2.9 – 3.2	0.152/0.228

¹ 採取した各組織の生育段階

5 ² 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新鮮重 1g 当たりの μg で表されている。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 (1 サンプル/反復、4 反復)。SD=標準偏差

10 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。SD=標準偏差

⁴ LOD=検出限界; LOQ=定量限界

⁵ 分析に用いられた穀粒は、収穫穀粒ではなく、試験で播種された穀粒と同じロットで生産された穀粒である。

²⁵ 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。

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 Taq ManPCR 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 5~10ng 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

本法の再現精度については 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確認試験を行った (別添資料 20)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

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

本組換えトウモロコシへ導入された DvSnf7 遺伝子断片は、CRW に対して殺虫活性を示す DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA を発現し、CRW に対する抵抗性を付与する。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、それぞれ改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現することにより、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサート耐性を付与する。

30

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

35

本組換えトウモロコシの宿主は非組換えトウモロコシ品種 LH 244 であり、導入遺伝子は DvSnf7 遺伝子断片、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 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。

5 第一の 2-(1)-口- (p50) に記載のとおり、本組換えトウモロコシで発現する DvSnf7 遺伝子断片はトウモロコシの内在性遺伝子ではなく、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝子配列であるため、宿主の遺伝子発現を抑制するとは考えにくい。実際にトウモロコシの転写産物データベースを用いて、トウモロコシ中の転写産物の配列と DvSnf7 遺伝子断片の配列の相同性検索の結果、DvSnf7 遺伝子断片の配列は宿主であるトウモロコシ中で発現している mRNA と高い相同性を有していないことが確認されている (別添資料 10)。また、dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため (Kozak, 1989)、当該 dsRNA が新たな蛋白質が発現する可能性は極めて低い。したがって、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

15 本組換えトウモロコシ中では、発現する改変 Cry3Bb1 蛋白質は *B. thuringiensis* に由来する結晶体の殺虫性蛋白質 (Bt 蛋白質) である。これらの Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており (OECD, 2007)、これまでのところ Bt 蛋白質が他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

20 さらに、第一の 2-(1)-口- 及び (p46~51) に記載のとおり、本組換えトウモロコシ中で発現している当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して働くことはないと考えられた。

25 本組換えトウモロコシ中では、改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質である PEP と S3P と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 これらのことから、本組換えトウモロコシで発現する当該 dsRNA、改変 Cry3Bb1 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、それぞれ蛋白質を発現しない、酵素活性を持たない又は高い基質特異性を有することから、それぞれ異なる作用機作を有し、独立して作用していると考えられ、これらの発現産物が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。したがって、導入遺伝子である DvSnf7 遺伝子断片、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子による影響が、目的とした宿主の生理学的特性であるコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性以外に及ぶとは予想されない。

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

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

形態及び生育の特性、 生育初期における低温耐性、 成体の越冬性、
花粉の稔性及びサイズ、 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、
有害物質の産生性

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

5

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

10

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：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 30 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。

25

2. 隔離ほ場での作業要領

(1) 本組換えトウモロコシ及び比較対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。

30

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

(3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本組換えトウモロコシの栽培終了後は、当該トウモロコシ及び比較対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。

35

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

(5) 本組換えトウモロコシの花粉の飛散を防止するため、除雄又は雄穂

の袋がけを行う。

(6) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

(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。

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試験計画書の図 8(p103) 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

これまで本組換えトウモロコシについて 2010~2012 年の間に米国及びアルゼンチンにおいて延べ 151 カ所のほ場試験が行われているが (表 14, p66)、非組換えトウモロコシと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

30

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 15 (p66) のとおりである。

表 14 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²⁶

年	ほ場の数	国
2010	9	米国
2011	47	米国
2011	17	アルゼンチン
2012	78	米国

5 表 15 本組換えトウモロコシの海外における申請予定

10

【社外秘につき非開示】

²⁶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。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一-2-(6)- (p61~63) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

10 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

15 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には、DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害のみがトウモロコシがわが国の自然条件下において生育することを困難にさせる要因ではないことから、これらの形質の付与のみで栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。

20

また、本組換えトウモロコシは改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

25

以上のこと及び本組換えトウモロコシが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

30

(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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

5 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。

10 2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 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 第一の 2-(1)-口- (p50) に記載のとおり、DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA はト
ウモロコシ内在性遺伝子の mRNA との相同性は低く、トウモロコシ内在性遺
伝子の発現を抑制するとは考えにくいこと、また新たな蛋白質が発現するとは
考えにくいことから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはない
と考えられた。

25 本組換えトウモロコシ中では、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改
変 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと類似性のある配列を有
していないことが確認されている (第一の 2-(1)-口- , p44)。また、第一の 2-(1)-
口- (p50) に記載のとおり、改変 Cry3Bb1 蛋白質は、酵素活性を持たないた
め、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

30 本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに耐性を持つ改変 CP4
EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと類似性のある配
列を有さないことが確認されている (第一の 2-(1)-口- , p50)。また、第一の
2-(1)-口- (p51) に示したように、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を
生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路におけ
る律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物で
ある芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないことが確認されている。これま
35 までにモンサント・カンパニーが開発した除草剤グリホサート耐性作物 (トウモ
ロコシ、ダイズ、ナタネ、ワタ、アルファルファ、テンサイ) の食品及び飼料
の安全性の評価の過程で、芳香族アミノ酸含有量に対照の非組換え作物との間
で相違のないことが確認されている。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が

原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

5 本組換えトウモロコシで発現する当該 dsRNA は第一の 2-(1)-口- (p16~50) に記載のとおり、経口摂取した CRW に対して殺虫活性を示すが、その殺虫活性スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でもハムシ科に属する一部の昆虫に限定されていると考えられる。

10 また、改変 Cry3Bb1 蛋白質の殺虫スペクトルは極めて狭く、コウチュウ目昆虫種の中でハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科にそれぞれ属する CPB と CRW のみに対して殺虫活性を示し (Head et al., 2001; EPA, 2010)、その他の昆虫に殺虫活性を示すという報告はない。この 2 属の昆虫種との同属近縁種がわが国に生息していないことは文献調査により示されている (中根ら, 1963)。

15 さらに、第一の 2-(1)-口- (p46~50) に記載のとおり、本組換えトウモロコシ中で発現している当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して相乗的に殺虫活性を示したり、殺虫スペクトルを広げることはないと考えられた。

したがって、当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトルはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には広がらないと考えられた。

20 以上のことから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた。

25 環境省第 4 次レッドリスト (2012 年改訂版) に掲載された絶滅危惧種・準絶滅危惧種のコウチュウ目昆虫について、山本ら (2002) を参考にし、種の食性・生息場所・分布地域から、本組換えトウモロコシの花粉飛散又は鋤き込んだ植物体を食餌することにより影響を受ける可能性を検討した。その結果、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として、表 16 (p70) に示した 4 種を特定した。

表 16 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫²⁷

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

*環境省第 4 次レッドリスト昆虫類 (環境省, 2012) に掲載された絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫について、小島ら (1969); 上野ら (1984); 林ら (1984); 野尻湖昆虫グループ (1985); 福井県 (2002); 島根県 (2004); 栃木県 (2005); 日外アソシエーツ (2005); 林ら (2005); 環境省 (2006); 大林ら (2007); 中根ら (2007); 環境省 (2010); 日外アソシエーツ (2011); 環境省 (2012); 林ら (2012) を用い、1) 生息域が農耕地帯周辺で、2) トウモロコシの花粉又は鋤き込んだ植物体を食餌する可能性がある種、の 2 点から絞込みを行った。

²⁷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) 影響の具体的内容の評価

5 DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA の標的害虫である WCRW 及び WCRW の近縁種である SCRW に対する LC₅₀ 値は、それぞれ 4.4ng/ml 及び 1.2ng/ml である (表 2, p24; 別添資料 7)。また、改変 Cry3Bb1 蛋白質に対して最も高い感受性を示すことが知られている CPB に対する改変 Cry3Bb1 蛋白質の LC₅₀ は 2.7µg/ml である (表 8, p45; Head et al., 2001; EPA, 2010)。

10 (3) 影響の生じやすさの評価

本組換えトウモロコシから飛散した花粉を特定された 4 種のコウチュウ目昆虫が食餌する可能性について、トウモロコシほ場からの距離と周りに生育する植物の葉に実際に堆積する花粉量を文献情報を基に推定した。

15 わが国においてはヒマワリ (*Helianthus annuus*) とイヌホオズキ (*Solanum nigrum*) の葉を用いて、トウモロコシ畑周辺での花粉の堆積密度の調査が行われている (Shirai and Takahashi, 2005)。調査の結果、トウモロコシ畑の縁 (0m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm²、イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm² であった。しかし、畑から 5m 離れると花粉の最大堆積密度は、
20 それぞれ 19.6 粒/cm² と 22.2 粒/cm² に減少していた。さらに、ヒマワリについては 5m 以降も調査されているが、10m 離れると花粉堆積密度は全て 10 粒/cm² 以内であった。

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

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

したがって、トウモロコシのほ場周辺に蓄積する花粉量は、ほ場から 10m 離れると極めて低くなると考えられる。

35 このことに加えて、本隔離ほ場試験では、除雄又は雄穂の袋がけを行うことにより、花粉をほ場外に飛散させない措置をとる。また、播種時には防鳥網等の設置を行い、栽培終了後には鋤き込みを行うため、植物体及び種子が

ほ場外に漏出する可能性も低い。さらに本組換えトウモロコシの影響を受ける可能性があるとして特定されたコウチュウ目昆虫がほ場周辺に局所的に生息する又はトウモロコシを食べるとの報告はない。

5 以上のことから、本組換えトウモロコシの花粉やすき込まれた植物体の摂食により何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として特定された 4 種のコウチュウ目昆虫種が、本組換えトウモロコシによる影響を受ける可能性は極めて低いと考えられた。

10 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

15 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。

3 交雑性

20 (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。

25 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

30

(3) 影響の生じやすさの評価

35

(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、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

5

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一-2-(6)- (p61~63) に記載したとおり、本組換えトウモロコシの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えトウモロコシを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

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 本組換えトウモロコシには、当該 dsRNA 及び改変 Cry3Bb1 蛋白質によるコウチュウ目害虫抵抗性の形質が付与されているが、コウチュウ目害虫による食害のみがトウモロコシがわが国の自然条件下において生育することを困難にさせる要因ではないことから、これらの形質の付与のみで栽培作物であるトウモロコシが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。

20 本組換えトウモロコシは改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現による除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

25 したがって、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、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。

30 **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。

35 本組換えトウモロコシで発現する DvSnf7 遺伝子断片の dsRNA はトウモロコシ内在性遺伝子の mRNA との相同性は低く、トウモロコシ内在性遺伝子の発現を抑制するとは考えにくいこと、また蛋白質が発現するとは考えにくいことから、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

40 本組換えトウモロコシ中では、コウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry3Bb1 蛋白質が発現しているが、既知アレルゲンと類似性のある配列を有していないことが確認されている。また、改変 Cry3Bb1 蛋白質は、酵素

活性を持たないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。

5 本組換えトウモロコシ中では、除草剤グリホサートに耐性を持つ改変 CP4 EPSPS 蛋白質が発現しているが、本蛋白質は既知アレルゲンと類似性のある配列を有さないことが確認されている。また、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は高い基質特異性を有することから、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えトウモロコシ中に有害物質が産生されるとは考えにくい。

これらのことから、意図しない有害物質の産生性はないと考えられた。

10 本組換えトウモロコシ中で発現する当該 dsRNA はコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫に対して、また改変 Cry3Bb1 蛋白質はコウチュウ目ハムシ科のハムシ亜科及びヒゲナガハムシ亜科にそれぞれ属する CPB と CRW に対して殺虫活性を示すことが明らかとなっている。さらに当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質が相互に作用して相乗的に殺虫活性を示したり、殺虫スペクトルを拡げることはないと考えられた。

15 したがって、当該 dsRNA と改変 Cry3Bb1 蛋白質による殺虫スペクトルはコウチュウ目昆虫に限定され、それ以外には拡がらないと考えられた。

20 このことから、本組換えトウモロコシをわが国の隔離ほ場試験で栽培された場合、本組換えトウモロコシの花粉の摂食及び植物体の摂食により何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、「環境省第 4 次レッドリスト (2012)」を用いて、4 種のコウチュウ目昆虫を特定した。

25 しかし、トウモロコシのほ場周辺に蓄積する花粉量は、ほ場から 10m 離れると極めて低くなると考えられ、また本組換えトウモロコシの影響を受ける可能性があるとして特定されたコウチュウ目昆虫がほ場周辺に局所的に生息する又はトウモロコシを食べるとの報告はない。

30 本隔離ほ場試験では、除雄又は雄穂の袋がけを行うことにより、花粉をほ場外に飛散させない措置をとる。また、播種時には防鳥網等の設置を行い、栽培終了後には鋤き込みを行うため、植物体及び種子がほ場外に漏出する可能性も低い。

35 したがって、本組換えトウモロコシの花粉の摂食及び植物体の摂食により何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として特定された 4 種のコウチュウ目昆虫種が、本組換えトウモロコシによる影響を受ける可能性は低いと考えられた。

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。

- 5 **交雑性**：わが国ではトウモロコシと交雑が可能な近縁種であるテオシント及び *Tripsacum* 属の野生種は報告されていない。このことから、本組換えトウモロコシは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10

よって、総合的評価として、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、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

引用文献

- ACNFP. 2011. Minutes of the One Hundred and Fourth Meeting Held on 24 November
5 2011. ACNFP/104/Min, Advisory Committee on Novel Food and Processes, London,
UK, <http://acnfp.food.gov.uk/meetings/acnfpmeet2011/acnfpmeet241111/acnfp24nov>.
<http://acnfp.food.gov.uk/meetings/acnfpmeet2011/acnfpmeet241111/acnfp24nov>.
- ACRE. 2011. Pages 1-9 in Minutes of the 134th Meeting of ACRE at Nobel House,
10 London. ACRE, ACRE/11/M4, Advisory Committee on Releases to the Environment,
London, UK, www.defra.gov.uk/acre/files/ACREMINUTES20111201.pdf.
- Akhtar, S. 2009. Oral delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. *Journal of
15 Drug Targeting*17: 491-495.
- Allen, M.L. and W.B. Walker. 2012. Saliva of *Lygus lineolaris* digests double stranded
ribonucleic acids. *Journal of Insect Physiology* 58: 391-396.
- Alves A.P., M.D. Lorenzen, R.W. Beeman, J.E. Foster and B.D. Siegfried. 2010. RNA
20 interference as a method for target-site screening in the western corn rootworm,
Diabrotica virgifera virgifera. *Journal of Insect Science* 10, article 162: 1-16.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002.
25 ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for
MVB sorting. *Developmental Cell*3: 271-282.
- Bachman, P.M., R. Bolognesi, W.J. Moar, G.M. Mueller, M.S. Paradise, P.
Ramaseshadri, J. Tan, J.P. Uffman, J. Warren, B.E. Wiggins and S.L. Levine. Levine.
2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded
30 RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera*
virgifera LeConte). *Transgenic Research*: 1-16.
- 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.
35 *Plant Molecular Biology*2: 335-350.
- 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.

5 Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plactinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2007a. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US2007/0124836 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

10 Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007b. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.

15 Beazley, K.A., T.R. Coombe, M.E. Groth, T.R. Hinchey, J.C. Pershing, T.T. Vaughn and B. Zhang. 2008. Corn plant MON88017 and compositions and methods for detection thereof. Patent Application 2008/0028482 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

20 Behlke, M.A. 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* 13: 644-670.

Bolognesi, R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, C. Levine, W. Moar, G. Mueller, J. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G. Heck and G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA to control western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *PLoS ONE* 7: e47534. doi: 47510.41371/journal.pone.0047534.

30 Broderick, N.A., K.F. Raffa, and J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:15196-15199.

Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

35 Bucher G, J. Scholten, and M. Klingler. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology* 12(3): R85-86.

- Burand, J.P. and W.B. Hunter. 2013. RNAi: Future in insect management. *Journal of Invertebrate Pathology* 112, Supplement 1:S68-S74.
- 5 Cassee, F.R., J.P. Groten, P.J. van Bladeren and V.J. Feron. 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Critical Reviews in Toxicology* 28: 73-101.
- 10 Cock, J.M., R. Swarup and C. Dumas. 1997. Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in *Brassica oleracea*. *Mol Gen Genet* 255: 514-524.
- 15 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase. *EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 20 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.
- 25 Doebley, J. 2004. The genetics of maize evolution. *Annual Review of Genetics* 38: 37-59.
- 30 Doebley, J.F., B.S. Gaut and B.D. Smith. 2006. The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309-1321.
- 35 Dong, Y. and M. Friedrich. 2005. Nymphal RNAi: systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology* 5: 25.
- 40 Donovan, W.P., M.J. Rupa, A.C. Slaney, T. Malvar, M.C. Gawron-Burke and T.B. Johnson. 1992. Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to *Coleoptera* species. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3921-3927.
- 45 Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina and P.A. Sharp. 2003. Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 457-467.
- 50 English, L.H., S.M. Brussock, T.M. Malvar, J.W. Bryson, C.A. Kulesza, F.S. Walters,

- S.L. Slatin, M.A. Von Tersch and C. Romano. 2000. Nucleic acid segments encoding modified bacillus thuringiensis coleopteran-toxic crystal proteins Patent 6,060,594, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 5 EPA, U.S. 2009. Position Paper on Scientific Issues Associated with the Data Required to Register Plant-Incorporated Protectants Submitted to the FIFRA Scientific Advisory Panel For Review and Comment.
- EPA, U.S. 2010. Biopesticides Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis*
10 Cry3Bb1 protein and the genetic material necessary for its production (Vector PV-ZMIR13L) in MON 863 corn (OECD Unique Identifier: MON-ØØ863-5); and *Bacillus thuringiensis*.
- Fader, C. and M. Colombo. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely
15 related partners. *Cell Death Differ* 16: 70-78.
- FAO-WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology, report of joint FAO/WHO consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
20
- FAOSTAT. 2012. World corn production 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> [Accessed September 25, 2012].
25
- FDA, U.S. 1992. Pages Federal Register 57: 22984-23005 in Statement of policy: Foods derived from new plant varieties.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998.
30 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- 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.
35 *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- Fukuhara, T., H. Moriyama, J.Y. Pak, H. Hyakutake and T. Nitta. 1993. Enigmatic

double-stranded RNA in Japonica rice. *Plant Mol Biol*21: 1121-1130.

Gao, F., J. Brenman and L. Jan, Jan, YN. 1999. Genes regulating dendritic outgrowth, branching, and routing in *Drosophila*. *Genes Dev* 13: 2549-2561.

5

Gilmore, I.R., S.P. Fox, A.J. Hollins, M. Sohail and S. Akhtar. 2004. The design and exogenous delivery of siRNA for post-transcriptional gene silencing. *Journal of Drug Targeting*12: 315-340.

10 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.

Gómez-Zurita J, Hunt T, Koplaku F, Vogler AP. 2007. Recalibrated Tree of Leaf Beetles (Chrysomelidae) Indicates Independent Diversification of Angiosperms and
15 Their Insect Herbivores. *PLoS ONE* 2(4): e360. doi:10.1371/journal.pone.0000360.

Gould, A.R. and R.I. Francki. 1981. Immunochemical detection of ds-RNA in healthy and virus-infected plants and specific detection of viral ds-RNA by hybridization to labelled complementary DNA. *J Virol Methods*2: 277-286.

20

Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*31: 5534-5544.

25 Hammond, S.M. 2005. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Letters*579: 5822-5829.

Head, G., M. Pleau, S. Sivausupramanian and T. Vaughn. 2001. Insecticidal spectrum of activity for Cry3Bb protein *in vitro*. Monsanto Technical Report C3NTO. St. Louis,
30 Missouri. (社内報告書)

Heisel, S.E., Y. Zhang, E. Allen, L. Guo, T.L. Reynolds, X. Yang, D. Kovalic and J.K. Roberts. 2008. Characterization of unique small RNA populations from rice grain. *PLoS One*3: e2871.

35

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

- Houck, J.C. 1958. The Microdetermination of Ribonuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*73: 384-390.
- 5 Huang, Y.-F., W.R. Jordan, R.A. Wing and P.W. Morgan. 1998. Gene expression induced by physical impedance in maize roots. *Plant Molecular Biology*37: 921-930.
- Huvenne, H. and G. Smagghe. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* 56: 227-235.
- 10 Ivashuta, S.I., J.S. Petrick, S.E. Heisel, Y. Zhang, L. Guo, T.L. Reynolds, J.F. Rice, E. Allen and J.K. Roberts. 2009. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and Chemical Toxicology*47: 353-360.
- 15 James R.R., B.A. Croft, and S.H. Strauss. 1999. Susceptibility of the cottonwood leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to different strains and transgenic toxins of *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Entomology*. 28:108-115.
- 20 Jensen P., Zhang Y., Wiggins B., Petrick J., Zhu J., Kerstetter R., Heck G., Ivashuta S. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food: Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* 4(2): 1-8.
- 25 Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology*123: 1005-1014.
- Ji, L. and X., Chen. 2012. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Res* 22 (4): 624-636.
- 30 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.
- 35 Kiesselbach, T.A. 1999. Development of tassel and staminate spikelets. Pages 38-50 in *The Structure and Reproduction of Corn*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

- Kim, D., Sung, H., Shin, D., Shen, H., Ahnn, J., Lee, SK. and Lee, S. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cells*31: 585-592.
- 5
- 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.
- 10
- Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*9: 5134-5142.
- 15
- Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*15: 139-143.
- 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.
- 20
- Molecular and Cellular Biology*5: 1370-1378.
- Lee, J., A. Beigneux, S. Ahmad, S. Young and F. Gao. 2007. ESCRT-III dysfunction causes autophagosome accumulation and neurodegeneration. *Curr Biol*17: 1561-1567.
- 25
- Li X, M. Zhang and H. Zhang. 2011. RNA Interference of Four Genes in Adult *Bactrocera dorsalis* by Feeding Their dsRNAs. *PLoS ONE* 6(3): e17788. doi:10.1371/journal.pone.0017788
- Lingor, P., U. Michel, U. Scholl, M. Bahr and S. Kugler. 2004. Transfection of "naked" siRNA results in endosomal uptake and metabolic impairment in cultured neurons.
- 30
- Biochemical and Biophysical Research Communications*315: 1126-1133.
- Loretz, B., F. Foger, M. Werle and A. Bernkop-Schnurch. 2006. Oral gene delivery: Strategies to improve stability of pDNA towards intestinal digestion. *Journal of Drug*
- 35
- Targeting*14: 311-319.
- 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.
- 5 Marra, M.C., N.E. Piggott and B.K. Goodwin. 2012. The impact of Corn Rootworm Protected Biotechnology Traits in the United States. *AgBioForum*15: 217-230.
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M.M. Goodman, J. Sanchez G., E. Buckler and J. Doebley. 2002. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*99: 6.
- 10 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 15 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Research*17: 1764.
- Nguyen, T., E.M. Menocal, J. Harborth and J.H. Fruehauf. 2008. RNAi therapeutics: An update on delivery. *Curr Opin Mol Ther*10: 158-167.
- 20 O'Neill, M.J., L. Bourre, S. Melgar and C.M. O'Driscoll. 2011. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: physiological barriers and preclinical models. *Drug Discov Today*16: 203-218.
- Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required 25 for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*313: 810-812.
- 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, 30 France.
- OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in 35 Biotechnology No. 42. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- 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 Ready™ 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.
- 5
- Park, N.J., Y. Li, T. Yu, B.M. Brinkman and D.T. Wong. 2006. Characterization of RNA in saliva. *Clinical Chemistry*52: 988-994.
- 10 Parrott, W., B. Chassy, J. Ligon, L. Meyer, J. Petrick, J. Zhou, R. Herman, B. Delaney and M. Levine. 2010. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food and Chemical Toxicology*48: 1773-1790.
- 15 Peck, J., E. Bowden and P. Burbelo. 2004. Structure and function of human Vps20 and Snf7 proteins. *Biochem J*377: 693-700.
- Petrick, J.S., B. Brower-Toland, A.L. Jackson and L.D. Kier. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66 (2): 167-176.
- 20
- 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*98: 11919-11924.
- 25
- Qin, X., S. Gianì and D. Breviario. 1997. Molecular cloning of three rice α -tubulin isotypes: Differential expression in tissues and during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta*1354: 19-23.
- 30
- Raiborg, C. and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*458: 445-452.
- 35 Ramaseshadri, P., G. Segers, R. Flannagan, E. Wiggins, W. Clinton, O. Ilagan, B. McNulty, T. Clark and R. Bolognesi. 2013. Physiological and Cellular Responses Caused by RNAi-Mediated Suppression of Snf7 Orthologue in Western Corn

- Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) Larvae. PLoS ONE 8(1): e54270. doi:10.1371/journal.pone.0054270.
- Raynor, G.S., E.C. Ogden and J.V. Hayes. 1972. Dispersion and deposition of corn pollen from experimental sources. *Agronomy Journal*64: 420-427.
- Rossman, E.C. 1949. Freezing injury of inbred and hybrid maize seed. *Agronomy Journal*41: 574-583.
- 10 Roush, R.T. 1998. Two-toxin strategies for management of insecticidal transgenic crops: Can pyramiding succeed where pesticide mixtures have not? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*353: 1777-1786.
- Ryu, M.H., H.S. Sohn, Y.R. Heo, N. Moustaid-Moussa and Y.S. Cha. 2005. Differential regulation of hepatic gene expression by starvation versus refeeding following a high-sucrose or high-fat diet. *Nutrition*21: 543-552.
- 15 Savard J, Tautz D, Richards S, Weinstock GM, Gibbs RA, Werren JH, Tettelin H and MJ Lercher. 2006. Phylogenomic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of Holometabolous insects. *Genomic Res*16:1334-1338.
- 20 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.
- 25 Shirai, Y. and M. Takahashi. 2005. Effects of transgenic Bt corn pollen on a non-target lycaenid butterfly, *Pseudozizeeria maha*. *Applied Entomology and Zoology*40: 151-159.
- 30 Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*457: 396-404.
- Sioud, M. 2005. On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells. *Expert Opin Drug Deliv*2: 639-651.
- 35 Snow, J. W. Andrew E. Hale. Stephanie K. Isaacs. Aaron L. Baggish and Stephen Y. Chan. 2013. Ineffective delivery of diet-derived microRNAs to recipient animal

organisms. *RNA Biology* 10:6, 1–10.

- Soutschek, J., A. Akinc, B. Bramlage, K. Charisse, R. Constien, M. Donoghue, S. Elbashir, A. Geick, P. Hadwiger, J. Harborth, M. John, V. Kesavan, G. Lavine, R.K. Pandey, T. Racie, K.G. Rajeev, I. Rohl, I. Toudjarska, G. Wang, S. Wuschko, D. Bumcrot, V. Koteliansky, S. Limmer, M. Manoharan and H.P. Vornlocher. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- 10 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- Stevens, C.E. and Hume, I.D. 2004. *Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive system*. 1st paperback edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- 15
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor, New York.
- 20
- Tabashnik, B. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3343–3346.
- Teis, D., S. Saksena and S. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Dev Cell* 15: 578-589.
- 25
- Terenius, O., A. Papanicolaou, J.S. Garbutt, I. Eleftherianos, H. Huvenne, S. Kanginakudru, M. Albrechtsen, C. An, J.-L. Aymeric, A. Barthel, P. Bebas, K. Bitra, A. Bravo, F. Chevalier, D.P. Collinge, C.M. Crava, R.A. de Maagd, B. Duvic, M. Erlandson, I. Faye, G. Felfoldi, H. Fujiwara, R. Futahashi, A.S. Gandhe, H.S. Gatehouse, L.N. Gatehouse, J.M. Giebultowicz, I. Gomez, C.J.P. Grimmelikhuijzen, A.T. Groot, F. Hauser, D.G. Heckel, D.D. Hegedus, S. Hrycaj, L. Huang, J.J. Hull, K. Iatrou, M. Iga, M.R. Kanost, J. Kotwica, C. Li, J. Li, J. Liu, M. Lundmark, S. Matsumoto, M. Meyering-Vos, P.J. Millichap, A. Monteiro, N. Mrinal, T. Niimi, D. Nowara, A. Ohnishi, V. Oostra, K. Ozaki, M. Papakonstantinou, A. Popadic, M.V. Rajam, S. Saenko, R.M. Simpson, M. Soberon, M.R. Strand, S. Tomita, U. Toprak, P. Wang, C.W. Wee, S. Whyard, W. Zhang, J. Nagaraju, R.H. French-Constant, S. Herrero, K. Gordon, L.
- 30
- 35

- Swevers and G. Smaghe. 2011. RNA interference in Lepidoptera: An overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology* 57: 231-245.
- 5 Tian H, H. Peng, Q. Yao, H. Chen, Q. Xie, B. Tang and W. Zhang. 2009. Developmental Control of a Lepidopteran Pest *Spodoptera exigua* by Ingestion of Bacteria Expressing dsRNA of a Non-Midgut Gene. *PLoS ONE* 4(7): e6225. doi:10.1371/journal.pone.0006225.
- 10 Tomoyasu, Y and R.E. Denell. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* 214(11): 575-578.
- Tu, J., L. Vallier and M. Carlson. 1993. Molecular and genetic analysis of the SNF7 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135: 17-23.
- 15 Turner, C.T., M.W. Davy, R.M. MacDiarmid, K.M. Plummer, N.P. Birch and R.D. Newcomb. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology*, 15: 383–391.
- 20 Vaccari, T., T. Rusten, L. Menut, I.P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark and D. Bilder. 2009. Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *Journal of Cell Science* 122(14): 2413-2423.
- 25 Vaishnav, A.K., J. Gollob, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougères and J. Maraganore. 2010. A status report on RNAi therapeutics. *Silence* 1: 14.
- Whyard, S., A.D. Singh and S. Wong. 2009. Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39: 824-832.
- 30 Winter, V. and M. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes. *Trends in Plant Science* 11: 115-123.
- 35 Witwer, K. W. Melissa A. McAlexander. Suzanne E. Queen and Robert J. Adams. 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence

for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA Biology* 10:7, 1–7.

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
5 Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

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*
10 *Molecular and Applied Genetics*1: 361-370.

Zhang, L., D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai,
Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang,
J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen and C.Y. Zhang. 2012a.
15 Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research*22: 107-126.

Zhang, Y., E. Wiggins, C. Lawrence, J. Petrick, S. Ivashuta and G. Heck. 2012b.
Analysis of plant-derived miRNAs in animal small RNA datasets. *BMC Genomics*13:
20 381.

上野俊一・野澤良彦・佐藤正孝 1984 原色日本甲虫図鑑 (II) 保育社

大林延夫・新里達也 編著 2007 日本産カミキリムシ 東海大学出版会
25

柿本陽一 1981 トウモロコシの起源と特性 I 植物としての分類 類縁関係
畑作全書 雑穀編 農山漁村文化協会 東京

柿本陽一・山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 III 植物としての特性
30 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 34-38

環境省 2006 改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 -レッドデータブック- 5
昆虫類自然環境研究センター

35 環境省 2012 第4次レッドリスト昆虫類
http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20554&hou_id=15619 [Accessed Sep,
2012]

- 環境省 改訂レッドリスト付属説明資料昆虫類平成 22 年 3 月
http://www.biodic.go.jp/rdb/explanatory_pdf/21insect.pdf [Accessed Sep, 2012]
- 5 環境省 生物多様性情報システム絶滅危惧種情報検索
http://www.biodic.go.jp/rdb/rdb_f.html [Accessed Sep, 2012]
- 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 10 小島圭三・林匡夫 1969 原色日本昆虫生態図鑑 I 保育社 大阪
- 財務省 2012 財務省貿易統計
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed Sep 25 2012]
- 15 島根県 2004 しまねレッドデータブック
<http://www1.pref.shimane.lg.jp/contents/rdb/rdb2/cnt/cnt99b.html> [Accessed Oct, 2012]
- 千藤茂行 2001 トウモロコシの品種生態 IV 採種 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京
- 20 瀧澤康孝 2001 子実用トウモロコシの栽培 II 栽培の実際 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp.110-128
- 千葉浩三 1980 図集・作物栽培の基礎知識 栗原浩(編) 農山漁村文化協会
25 東京
- 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
- 30 栃木県 2005 レッドデータブックとちぎ
<http://www.pref.tochigi.lg.jp/shizen/sonota/rdb/index.html> [Accessed Sep, 2012]
- 中根猛彦・大林一夫・野村鎮・黒沢良彦 1963 原色昆虫大図鑑 II 甲虫篇 北隆館 東京
- 35 中根猛彦・大林一夫・野村鎮・黒沢良彦 2007 新訂・原色昆虫大図鑑 II 甲虫編 北隆館 東京

- 中村茂文 2001a 生育のステージと生理, 生態 I 種子と発芽 転作全書 第三卷 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 41-43
- 5 中村茂文 2001b 生育のステージと生理, 生態 III 生殖生長期の生理, 生態 転作全書 第三卷 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 50-53
- 西牧清 1987 13. 食用作物 トウモロコシ 農学大事典第 2 次増訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 養賢堂 東京 pp. 536-541
- 10 野尻湖昆虫グループ 1985 アトラス・日本のネクイハムシ - 化石同定への手引き - 野尻湖昆虫グループ
- 日外アソシエーツ編 2005 昆虫レファレンス事典 I 日外アソシエーツ
- 15 日外アソシエーツ編 2011 昆虫レファレンス事典 II 日外アソシエーツ
- 林匡夫・木元新作・森本桂 1984 原色日本甲虫図鑑 (IV) 保育社 大阪
- 20 林成多 2005 日本産ネクイハムシ図鑑 - 全種の解説 - 月刊むし 408 : 2-18
- 林成多 2012 日本のネクイハムシ むし社
- 福井県 2002 福井県レッドデータブック (動物編)
- 25 <http://www.erc.pref.fukui.jp/gbank/rdb/rdbindex.html> [Accessed Sep, 2012]
- 農林水産省 2012a 23 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 24 年 9 月 14 日公表
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001087011> [Accessed Sep 25 2012].
- 30 農林水産省 2012b 平成 23 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 24 年 8 月 30 日公表
http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_yasai/pdf/yasai_syutou11.pdf [Accessed Sep 25 2012].
- 35 松井正春・斉藤修 2003 III 農業環境技術研究所における Bt トウモロコシ緊急調査 4. Bt 組換えトウモロコシ花粉中の Bt トキシンの検出 4.2. 生物検定に

よる検出 農業環境研究叢書第 14 号遺伝子組換え作物の生態系への影響評価
独立行政法人農業環境技術研究所 つくば pp. 55-62

5 丸山寛治 1981 トウモロコシの品種生態 I 品種の基本特性 畑作全書 雑
穀編 農山漁村文化協会 東京 pp. 83-89

山本勝利・大黒俊哉・松村雄 2003 III わが国における鱗翅目のレッドリスト
掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価 農業環境研究叢書 第 14 号 独
立行政法人農業環境技術研究所 つくば pp. 62-81.

10

緊急措置計画書

5

平成 25 年 3 月 1 日

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
10 住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

10

第一種使用規程の承認を申請しているコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサ
ート耐性トウモロコシ (DvSnf7, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.)
Iltis) (MON87411, OECD UI: MON-87411-9) (以下「本組換え体」という。)の第一種使用
15 等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下
の措置を執ることとする。

15

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す
20 とおりである。

20

平成25年3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

2 第一種使用等の状況の把握の方法

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。

5

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

10

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

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。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

20

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示唆された場合、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。

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 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 8 (p103) 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 30 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、焼却炉を設置している (図 9, p104)。

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 10 (p105) 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 11, p106)。

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 17 (p97) 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 2013 年 10 月 30 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 17 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

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²⁸の平年値は、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 2013 年 10 月 30 日：

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

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²⁸、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²⁹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）³⁰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 2013 年 10 月 29 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

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

²⁸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。（台風の統計資料（気象庁）：<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/index.html>）

²⁹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）

³⁰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。

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 1.0~2.0 m となると想定されている。

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

本組換えトウモロコシにはコウチュウ目害虫抵抗性が付与されていることから、何らかの影響を受ける可能性のある野生動植物として、わが国に生息するコウチュウ目昆虫が考えられた。

コウチュウ目昆虫については、第4次レッドリストに絶滅危惧種及び準絶滅危惧種として 275 種が掲載されている（アクセス 2012 年 9 月 20 日：http://www.env.go.jp/press/file_view.php?serial=20554&hou_id=15619）。このうち、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシの影響を受ける可能性がある種を特定するため、「わが国における鱗翅目のレッドリスト掲載種への Bt トウモロコシ花粉の影響評価」を参考にし、種の食性・生息場所・分布地域から、本組換えトウモロコシの花粉飛散又は鋤き込んだ植物体を食餌することにより影響を受ける可能性を検討した。その結果、本組換えトウモロコシにより影響を受ける可能性が否定できないコウチュウ目昆虫として、表 18 (p100) に示した 4 種を特定した。

表 18 影響を受ける可能性が否定できない絶滅危惧種及び準絶滅危惧種に区分されているコウチュウ目昆虫³¹

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

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。

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 12 (p107 ~ 109) 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。

- (5) 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。
- (6) 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。
- (7) 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。
- (8) 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 8 日本モンサント株式会社隔離ほ場の位置

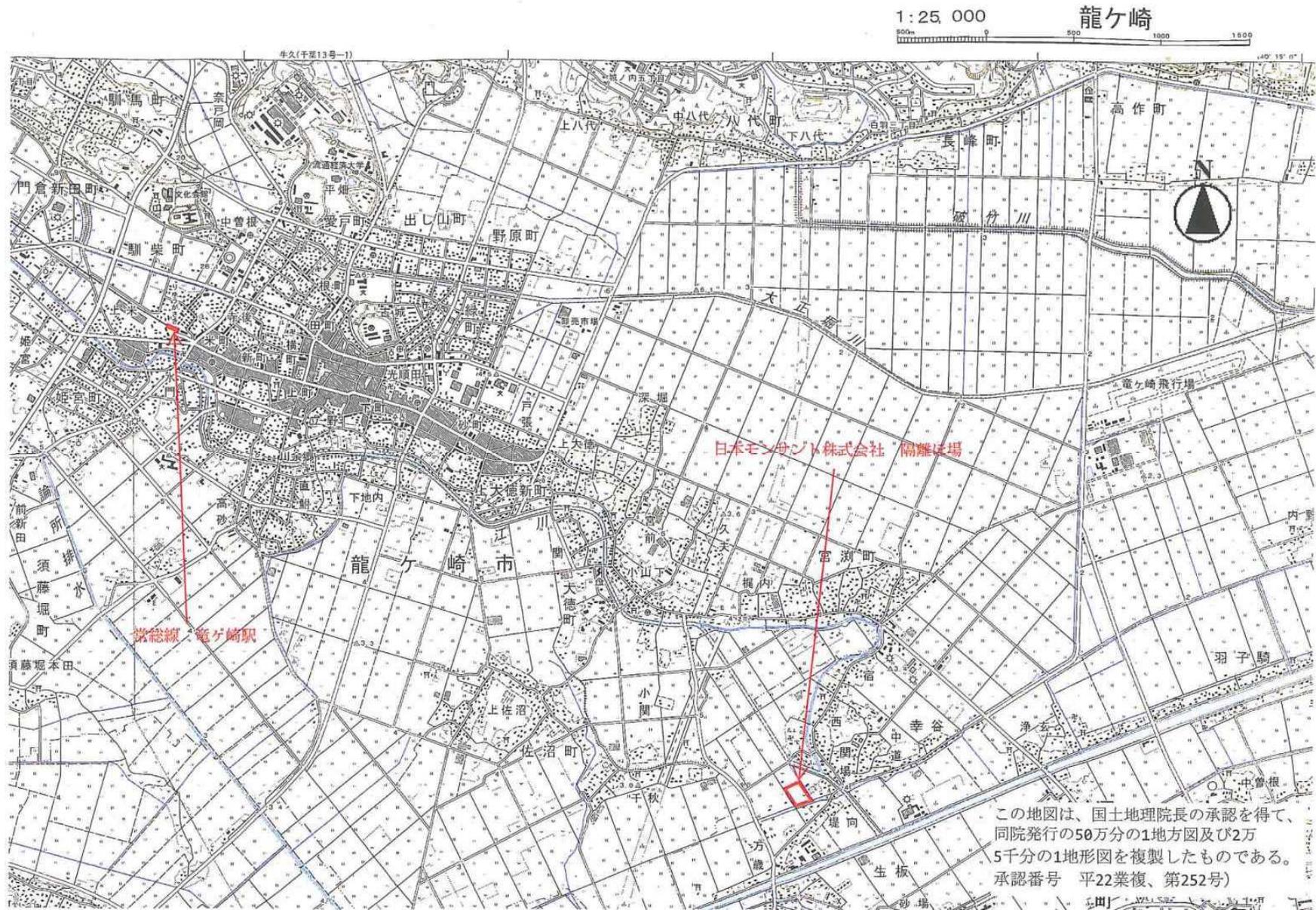


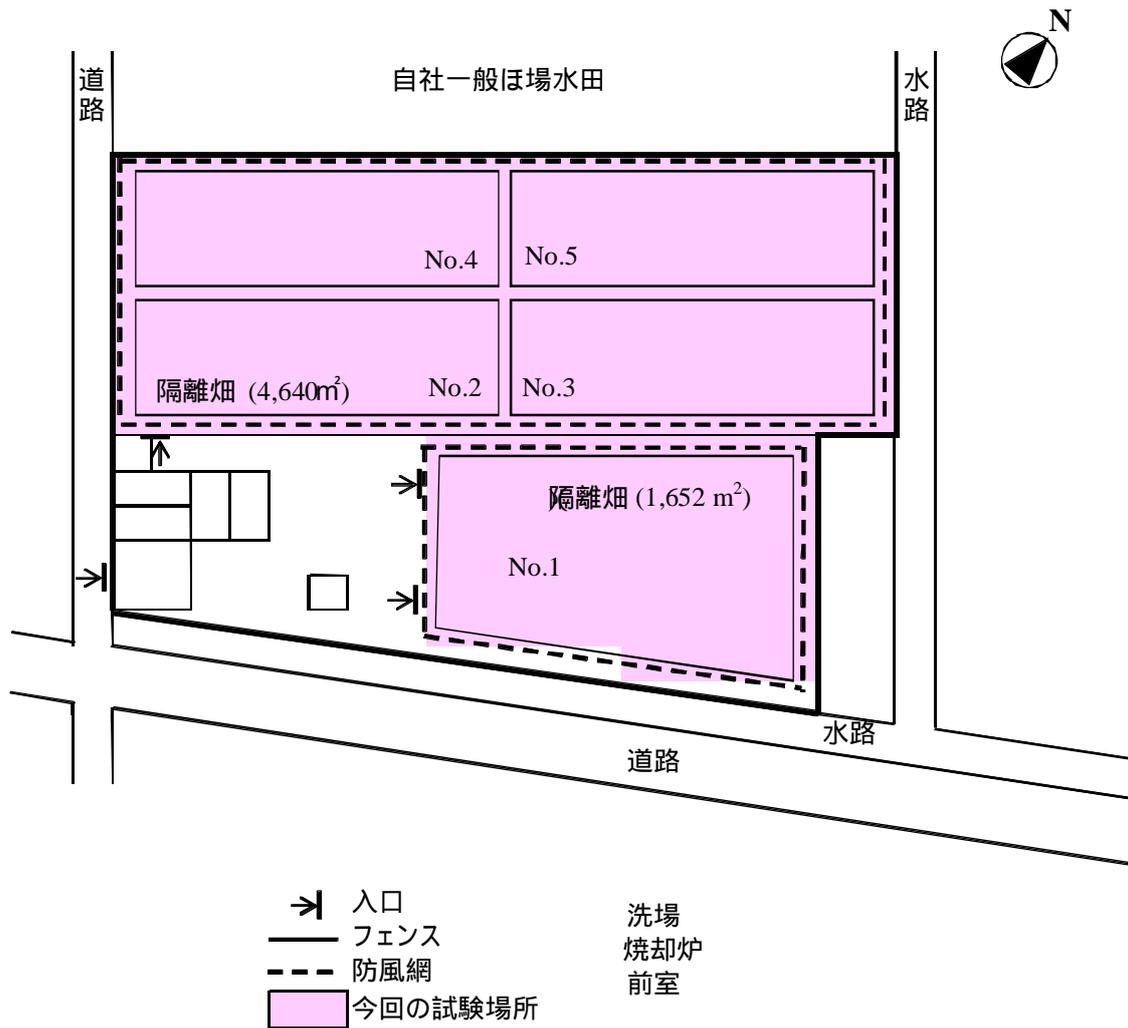
図 9 隔離ほ場の設備³²



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
焼却炉
洗い場

³²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 10 試験区の配置図³³



上記試験場所のうち約 1,000 m²の面積において栽培予定。

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。

図 11 日本モンサント株式会社隔離ほ場地図 (広域)

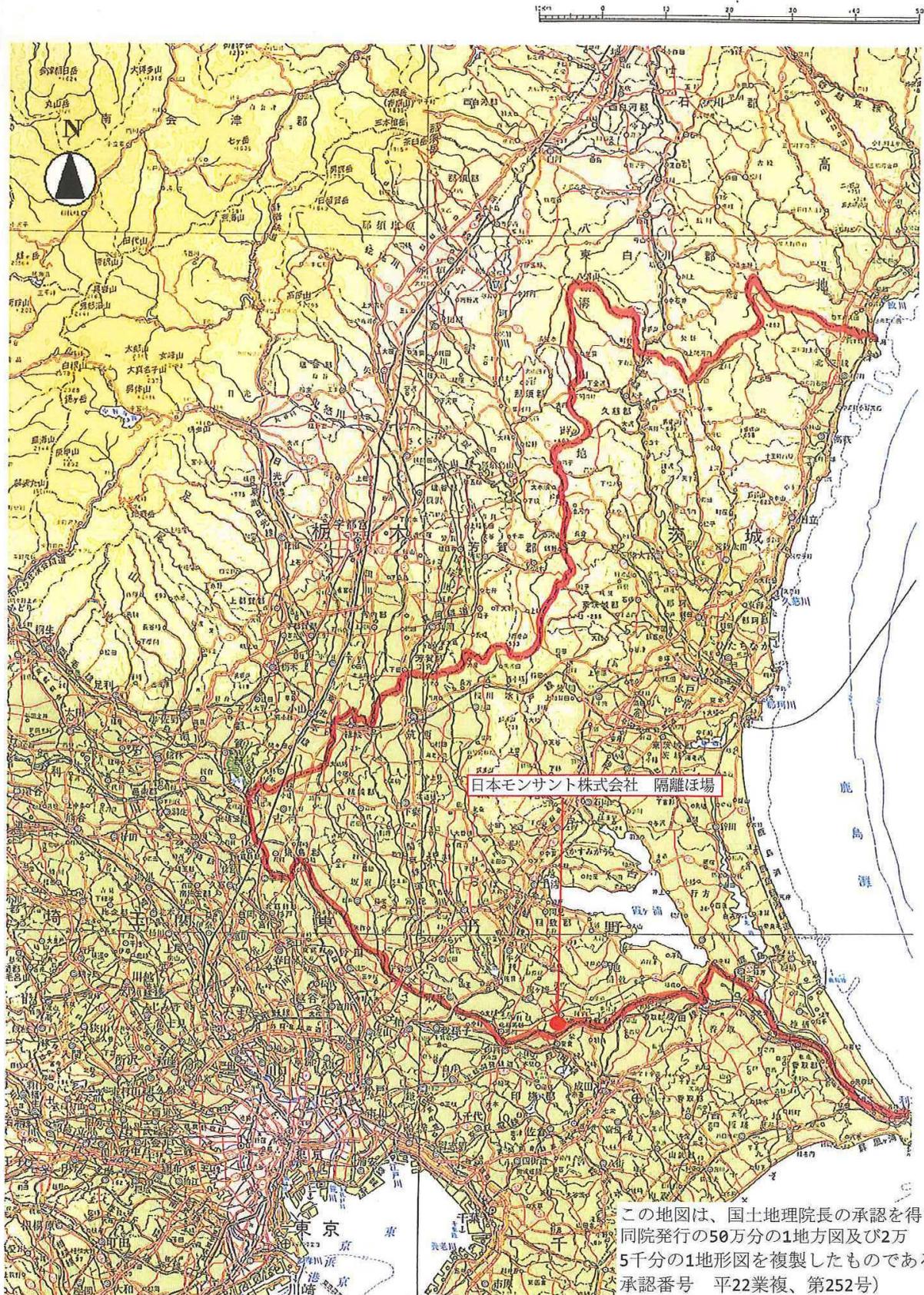


図 12 隔離ほ場における栽培履歴³⁴

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2009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 カラシナ				←→								
	遺伝子組換え テンサイ					←→	←→						
	非遺伝子組換え テンサイ					←→	←→						
	遺伝子組換え ダイズ						←→	←→	←→				
	非遺伝子組換え ダイズ						←→	←→	←→				
	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						←→	←→	←→				
	非遺伝子組換え エンバク						←→	←→	←→				
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.2	非遺伝子組換え ライムギ	←→											
	非遺伝子組換え カラシナ			←→									
	非遺伝子組換え エンバク						←→	←→					
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←→	←→					
No.3	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 カラシナ			←→									
	非遺伝子組換え エンバク						←→	←→					
	非遺伝子組換え トウモロコシ						←→	←→					
No.4	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 カラシナ			←→									
No.5	非遺伝子組換え ライムギ	←→											←
	非遺伝子組換え カラシナ			←→									
	遺伝子組換え ダイズ							←→	←→	←→	←→	←→	←→
	非遺伝子組換え ダイズ							←→	←→	←→	←→	←→	←→

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2010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							←→	←→	←→	←→	←→	←→
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												←
No.3	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							←→	←→	←→	←→	←→	←→
	非遺伝子組換え ライムギ												←
No.4	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							←→	←→	←→	←→	←→	←→
	遺伝子組換え トウモロコシ							←→	←→	←→	←→	←→	←→
No.5	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	→						←→	←→	←→	←→	←→	←→
	非遺伝子組換え ライムギ												←
	非遺伝子組換え ソルガム							←→	←→	←→	←→	←→	←→
No.5	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							←→	←→	←→	←→	←→	←→
	非遺伝子組換え トウモロコシ							←→	←→	←→	←→	←→	←→

³⁴図 12 (p107~109) 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 12 隔離ほ場における栽培履歴 (続き)

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					←				→			
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ					←				→			
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	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					←				→			

図 12 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) (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 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 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					←	←	←	←				

第二部 隔離ほ場での試験計画

5

10

15

【社外秘につき非開示】

20

25

30

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
(DvSnf7, 改変 *cry3Bb1*, 改変 *cp4 epsps*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis)
(MON87411, OECD UI: MOAN-87411-9) の別添資料リスト

- 5
- 別添資料 1 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cry3Bb1* 遺伝子から推定した改変 Cry3Bb1 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 10
- 別添資料 2 本組換えトウモロコシの作出に用いられた改変 *cp4 epsps* 遺伝子から推定した改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 3 Northern Blot Analysis of DvSnf7 RNA Expression in MON 87411 (RAR-2013-0213) (社外秘)
- 15
- 別添資料 4 Field Efficacy Data of MON 87411, DvSnf7, MON 88017, and Control Maize Grown in the U.S. in 2012 (RPN-2013-0244) (社外秘)
- 別添資料 5 Assessment of LMW DvSnf7 Transcript Levels in MON 87411 (RAR-2013-0461) (社外秘)
- 20
- 別添資料 6 Analysis of methylated siRNA uptake and activity in western corn rootworm (RAR-2013-0245) (社外秘)
- 別添資料 7 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of the dsRNA DvSnf7 Against a Range of Insect Taxa (MSL0024483) (社外秘)
- 25
- 別添資料 8 DvSnf7 Gene Structure and DvSnf7 Predicted Amino Acid Sequence (社外秘)
- 30
- 別添資料 9 A Comparative Bioinformatics Analysis of the Snf7 Ortholog in Representative Arthropods (RAR-2013-0005) (社外秘)
- 35
- 別添資料 10 Bioinformatic Comparison of the 240 Nucleotide DvSnf7 Sequence with Eukaryotic Soil Microorganism and *Zea mays* Sequence Databases (RAR-2013-0260) (社外秘)

- 別添資料 11 Enumeration of Soil Microorganisms from a Greenhouse Study Assessing Potential Residual Effects from MON 87411 Maize (MSL0024827) (社外秘)
- 5 別添資料 12 Preliminary Assessment of the Potential for Interaction between the DvSnf7 dsRNA and the Cry3Bb1 Protein (MSL0024566) (社外秘)
- 別添資料 13 Determination of p-Values for the Comparison of LC50 Values and Slopes from the Preliminary Assessment of the Potential for Interaction Between the DvSnf7 dsRNA and the Cry3Bb1 Protein (MSL0025187) (社外秘)
- 10
- 別添資料 14 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87411 in a Single Generation (REG-2012-0375) (社外秘)
- 15
- 別添資料 15 Molecular Characterization of MON 87411 Corn for Japan Stage III Field Trial (MSL0023881) (社外秘)
- 別添資料 16 Stability of the DNA Insert in MON 87411 for Japan Stage III Field Trial (MSL0023882) (社外秘)
- 20
- 別添資料 17 Assessment of the Presence of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Proteins in Corn Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 87411 (MSL0023861) (社外秘)
- 25
- 別添資料 18 Assessment of DvSnf7 RNA Levels in Corn Tissues from MON 87411 Produced in a United States Greenhouse Trial during 2011 (REG-2012-0013) (社外秘)
- 30
- 別添資料 19 Assessment of CP4 EPSPS and Cry3Bb1 Protein Levels in Corn Tissues from MON 87411 Produced in a United States Greenhouse Trial during 2011 (REG-2012-0014) (社外秘)
- 35
- 別添資料 20 Method Characterization Summary for Monsanto SOP BQ-QC-11120, Confirming the Presence of the MON 87411 Transformation Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (RAR-2012-0226) (社外秘)