

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ  
 (*DvSSJ1, ipd072Aa, pat, Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis)  
 (DP23211, OECD UI: DP-023211-2) 申請書等の概要

目次

5	第一種使用規程承認申請書 .....	1
	生物多様性影響評価書の概要 .....	3
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 .....	3
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 .....	3
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 .....	3
10	(2) 使用等の歴史及び現状 .....	3
	(3) 生理学的及び生態学的特性 .....	5
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 .....	8
	(1) 供与核酸に関する情報 .....	8
	(2) ベクターに関する情報 .....	24
15	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 .....	25
	(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 .....	29
	(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 .....	31
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 .....	32
20	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 .....	35
	(1) 使用等の内容 .....	35
	(2) 使用等の方法 .....	35
	(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 .....	36
25	(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 .....	36
	(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 .....	36
	(6) 国外における使用等に関する情報 .....	36
30	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 .....	37
	1 競合における優位性 .....	37
	2 有害物質の産生性 .....	38
	3 交雑性 .....	39
	4 その他の性質 .....	40
35	第三 生物多様性影響の総合的評価 .....	41
	参考文献 .....	43
	緊急措置計画書 .....	51
	隔離ほ場 受容環境 .....	53
	添付資料一覧 .....	67

第一種使用規程承認申請書

平成 30 年 8 月 8 日

農林水産大臣 齋藤 健 殿  
環境大臣 中川 雅治 殿

氏名 デュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社  
申請者 代表取締役社長 田中 能之  
住所 東京都千代田区永田町二丁目 11 番 1 号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ ( <i>DvSSJ1, ipd072Aa, pat, Zea mays subsp. mays</i> (L.) <i>Iltis</i> ) (DP23211, OECD UI: DP-023211-2)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	<p>所在地：栃木県宇都宮市清原工業団地 19 番地 2 デュポン株式会社宇都宮事業所内</p> <p>名称：デュポン・プロダクション・アグリサイエンス株式会社 組換え農作物隔離ほ場</p> <p>使用期間：承認日から平成 34 年（2022 年）3 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) 本遺伝子組換えトウモロコシの種苗が、野鳥等の食害により拡散することを防止するため、播種時及び成熟期から収穫期には防鳥網を設置する。</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象の非遺伝子組換え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象の非遺伝子組換え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の概要

### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

#### 5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

###### ① 和名、英名及び学名

10

和名：トウモロコシ

英名：corn, maize

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

15

###### ② 宿主の品種名又は系統名

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

20

###### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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

25

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

30

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

##### (2) 使用等の歴史及び現状

###### ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

35

トウモロコシの原産地がアメリカ大陸であることは間違いないが、その栽培起源地域については諸説あり、米国南西部、メキシコ及び中央アメリカの複数地域説、メキシコと南米の複数地域説、メキシコとグアテマラの複数地域説及びメキシコ南部単独説がある (OECD, 2003)。考古学的検証に基づくと、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前 7000~5000 年頃であり、紀元前 3400 年頃には栽培が始まったと考えられている (戸澤, 2005)。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる (山田, 2001、戸澤, 2005)。1492 年のコロンブスの

40

アメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。

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

## ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

### 10 ・主たる栽培地域

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

15 国連食糧農業機関（FAO）によると、2016 年における全世界のトウモロコシの栽培面積は約 1 億 9 千万 ha であり、上位国は、中国 3,895 万 ha、米国 3,511 万 ha、ブラジル 1,496 万 ha、インド 1,020 万 ha、メキシコ 760 万 ha である（FAO, 2017）。

20 現在、我が国で栽培されているトウモロコシは、統計上、飼料用青刈りデントコーンと生食用スイートコーンがあり、2016 年の青刈りデントコーンの作付面積は約 9 万 3,400ha で（農林水産省, 2017a）、同年のスイートコーンの作付面積は約 2 万 4,000ha である（農林水産省, 2017b）。

### ・栽培方法

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

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

30 北海道から九州に至る慣行播種期は 4 月中～下旬から 5 月中～下旬が最も多い。適正栽植密度は 10a あたり 6,000～8,000 本である。中耕、除草、土寄せは一連の作業で行い、生育初期に 2～3 回行う。収穫期は 9 月下旬から 10 月下旬で、関東や西南暖地ではやや早く、北海道や東北、東山ではやや遅い（瀧澤, 2001）。

なお、国内主要種苗メーカーの品種リストに基づくと、現在、栽培用として市販されているトウモロコシ種子のほとんどは、海外から輸入された一代雑種（F1）品種であり、収穫種子を翌年に栽培用として播種することは一般的でない。

### 35 ・流通実態及び用途

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

我が国では、2017 年に約 1,531 万トンのトウモロコシを輸入している。輸入トウモロコシのうちの約 1,012 万トンは飼料用であり、残りは食品・工業用及び栽

培用と考えられる（財務省, 2018）。なお、飼料用トウモロコシの大部分は、配合・混合飼料の原料として利用されている（農林水産省, 2018）。

また、飼料用トウモロコシは、発芽可能な状態で輸入されるものが多いが、加熱・圧ぺんすること等が関税制度の下、義務づけられている（農林水産省, 2014）。

5

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

10 —

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

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

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

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

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

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

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

#### ハ 捕食性又は寄生性

30 —

#### ニ 繁殖又は増殖の様式

##### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

35 完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており、脱粒しない。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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

花粉の稔性は花粉の充実度を観察することで推定できる（西尾, 2002）。

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

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

2001)。

我が国でのトウモロコシほ場周辺におけるヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及び  
イヌホオズキ (*Solanum nigrum*) 葉へのトウモロコシの花粉の堆積密度を調査し  
た研究では、ほ場の縁 (0m) での最大花粉堆積密度はヒマワリの葉で 81.7 粒/cm<sup>2</sup>、  
5 イヌホオズキの葉では 71.1 粒/cm<sup>2</sup>であった (Shirai and Takahashi, 2005)。ま  
た、ほ場から 5m 離れた場合の最大堆積密度は、ヒマワリの葉で 19.6 粒/cm<sup>2</sup>、イ  
ヌホオズキの葉では 22.2 粒/cm<sup>2</sup>、ほ場から 10m 離れた場合はヒマワリの葉で 10  
粒/cm<sup>2</sup>以内であった (Shirai and Takahashi, 2005)。

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

さらに、カナダのトウモロコシ畑周辺のトウワタの葉上における花粉堆積密度  
15 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/cm<sup>2</sup> 及び 1.4 粒/cm<sup>2</sup> であったと報告している (Sears *et al.*,  
2000)。

花粉の寿命は通常 10~30 分であるが、好適条件下ではさらに長い (CFIA,  
2012)。平均的な花粉は大気中に飛散した 2 時間後にはその発芽能力を 100 %失  
20 うという報告もある (Luna *et al.*, 2001)。

ホ 病原性

—

25 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または生息に  
影響を及ぼす有害物質の産生は報告されていない。

30 ト その他の情報

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



## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

#### 5 イ 構成及び構成要素の由来

10 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (*DvSSJ1*, *ipd072Aa*, *pat*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) (DP23211, OECD UI: DP-023211-2) (以下「本組換えトウモロコシ」という。)における供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 (9 ページ) 及び表 2 (12 ページ) に示した。また、その供与核酸の塩基配列を添付資料 1 の Appendix1 に示した。

#### ロ 構成要素の機能

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

20 供与核酸の構成要素それぞれの機能を表 1 (9 ページ) 及び表 2 (12 ページ) に示した (一部の構成要素のサイズについては社外秘情報につき非開示)。後述するように (第一.2. (3) .イ、25 ページ)、本組換えトウモロコシの染色体には、T-DNA 領域のうち FRT1 から FRT87 までの領域だけが含まれる。このため、当該領域を挿入 DNA 領域とし、供与核酸のうち挿入 DNA 領域を除く部分を外側骨格領域とした。

25

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

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
その他	FRT1		出芽酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来のFlpリコンビナーゼ標的部位 (Proteau <i>et al.</i> , 1986)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット*	<i>pmi</i>		大腸菌 ( <i>Escherichia coli</i> ) 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI 蛋白質) をコードする遺伝子 (Negrotto <i>et al.</i> , 2000)。コーディング領域の 5'側に 4 塩基、3'側に 36 塩基の非翻訳領域を含む。
	<i>pinII</i> Terminator		ジャガイモ ( <i>Solanum tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子 ( <i>pinII</i> ) のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator		トウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank accession KX247647)。転写を停止する。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	<i>os-actin</i> Promoter		イネ ( <i>Oryza sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子のプロモーター領域 (GenBank accession CP018159、GenBank accession EU155408.1)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>os-actin</i> Intron		イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のアクチン遺伝子のイントロン領域 (GenBank accession CP018159、GenBank accession EU155408.1)。
	<i>pat</i>		<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリンアセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
	CaMV 35S Terminator		カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980、Guilley <i>et al.</i> , 1982)。転写を停止する。
その他	<i>loxP</i>		バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ認識組換え部位 (Dale and Ow, 1990)。
	<i>sb-ubi</i> Terminator		ソルガム ( <i>Sorghum bicolor</i> ) 由来のユビキチン遺伝子のターミネーター領域 (Phytozome gene ID Sobic.004G049900.1)。転写を停止する。

\*後述するように、*pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは予め宿主に移入されている。挿入 DNA 領域が当該プロモーターの下流に部位特異的組換えにより挿入され、*pmi* 遺伝子と当該プロモーターが接続される (第一.2. (3) .イ、25 ページ)。

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

構成要素		サイズ (bp)	由来及び機能
その他	<i>sb-gkaf</i> Terminator		ソルガム ( <i>S. bicolor</i> ) 由来のガンマカフィリン遺伝子のターミネーター領域 (de Freitas <i>et al.</i> , 1994)。転写を停止する。
	<i>attB1</i>		バクテリオファージ $\lambda$ 由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway <sup>®</sup> クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)。
DvSSJ1sRNA発現カセット	<i>ubiZM1</i> Promoter		トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	<i>ubiZM1</i> 5'UTR		トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	<i>ubiZM1</i> Intron		トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	All-stop Codon Sequence		6つの読み枠全てにおいて終止コドンを含む配列。
	<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片		ウェスタンコーンルートワーム ( <i>Diabrotica virgifera virgifera</i> ) 由来のSmooth Septate Junction 1 遺伝子の部分配列 (Hu <i>et al.</i> , 2016)。本発現カセットにおいては、逆位に反復した2つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片がコネクター配列によって接続され、1分子のmRNAとして転写される。
	Mini-stop Codon Sequence		複数の読み枠において終止コドンを含む配列。
	<i>zm-Adh1</i> Intron Connector		トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン1領域 (Dennis <i>et al.</i> , 1984) の部分配列。2つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片を接続する。
	Mini-stop Codon Sequence		複数の読み枠において終止コドンを含む配列。
	<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片		ウェスタンコーンルートワーム ( <i>D. virgifera</i> ) 由来の <i>DvSSJ1</i> 遺伝子の部分配列 (Hu <i>et al.</i> , 2016)。
	All-stop Codon Sequence		6つの読み枠全てにおいて終止コドンを含む配列。
Z27G Terminator		トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) W64 系統由来の27-kDa ガンマゼイン遺伝子のターミネーター領域 (Das <i>et al.</i> , 1991、Liu <i>et al.</i> , 2016)。転写を停止する。	

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

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
その他	<i>UBQ14</i> Terminator	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来のユビキチン 14 遺伝子のターミネーター領域 (Callis <i>et al.</i> , 1995)。転写を停止する。
	<i>In2-1</i> Terminator	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の <i>In2-1</i> 遺伝子のターミネーター領域 (Hershey and Stoner, 1991)。転写を停止する。
	<i>attB2</i>	バクテリオファージ $\lambda$ 由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway <sup>®</sup> クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)。
<i>ipd072Aa</i> 遺伝子発現カセット	BSV (AY) Promoter	Banana streak virus (acuminata Yunnan strain) 由来のプロモーター領域 (Zhuang <i>et al.</i> , 2011)。植物体内での構成的な発現を誘導する。
	<i>zm-HPLV9</i> Intron	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の推定カルモジュリン 5 遺伝子のイントロン領域 (Phytozome gene ID Zm00008a029682)。
	<i>ipd072Aa</i>	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 由来の IPD072Aa 蛋白質をコードする遺伝子 (Schellenberger <i>et al.</i> , 2016)。
	<i>atT9</i> Terminator	シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) 由来のマンノース結合蛋白質スーパーファミリーに属する推定蛋白質遺伝子のターミネーター領域 (GenBank accession NM_001202984)。転写を停止する。
その他	<i>attB3</i>	バクテリオファージ $\lambda$ 由来のインテグラーゼ認識組換え部位 (Cheo <i>et al.</i> , 2004)。
	FRT87	出芽酵母 ( <i>S. cerevisiae</i> ) 由来の改変型 F1p リコンビナーゼ標的的部位 (Tao <i>et al.</i> , 2007)。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸のうち挿入 DNA 領域を除く外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能	
その他	Ti Plasmid Region	50	アグロバクテリウム ( <i>Rhizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )) 由来の Ti プラスミド (pTi) の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Left Border (LB)	25	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の T-DNA 領域の左側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>spc</i>	789	細菌由来のスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
	<i>colE1 ori</i>	370	大腸菌 ( <i>E. coli</i> ) 由来の DNA 複製起点 (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetR</i>	651	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の調節遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>tetA</i>	1,200	細菌由来のテトラサイクリン耐性遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>trfA</i>	1,149	細菌由来のトランス作用複製因子の遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriT</i>	367	細菌由来の DNA 伝達起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>ctl</i>	6,271	細菌由来のセントラルコントロールオペロン領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>oriV</i>	711	細菌由来の DNA 複製起点 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virD1</i>	444	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の T-DNA の植物ゲノムへの挿入に必要な遺伝子 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	<i>virC1</i>	695	
	<i>virC2</i>	609	
	<i>virG</i>	804	
	<i>virB</i>	9,436	
	<i>colE1 ori</i>	370	大腸菌 ( <i>E. coli</i> ) 由来の DNA 複製起点 (Tomizawa <i>et al.</i> , 1977)。
	<i>cos</i>	14	バクテリオファージλ由来の付着末端 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Right Border (RB)	25	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の T-DNA の右側境界領域 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。
	Ti Plasmid Region	50	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来の pTi の配列 (Komari <i>et al.</i> , 1996)。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸のうち挿入 DNA 領域を除く外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
zm-wus2 遺伝子発現カセット	nos Promoter	アグロバクテリウム ( <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )) 由来のpTiのノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。転写を開始する。
	zm-wus2	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のWUS2蛋白質をコードする遺伝子 (Mayer <i>et al.</i> , 1998、Lowe <i>et al.</i> , 2016)。
	pinII Terminator	ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
zm-odp2 遺伝子発現カセット	ubiZM1 Promoter	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的発現を誘導する。
	ubiZM1 5' UTR	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子の5'非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	ubiZM1 Intron	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
	zm-odp2	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来のODP2 蛋白質をコードする遺伝子 (GenBank accession XM008676474)。
	pinII Terminator	ジャガイモ ( <i>S. tuberosum</i> ) 由来のプロテアーゼインヒビターII遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
その他	Z19 Terminator	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の19-kDaゼイン遺伝子のターミネーター領域 (GenBank accession KX247647)。転写を停止する。

表 2 本組換えトウモロコシの作出に用いた供与核酸のうち挿入 DNA 領域を除く外側骨格領域の構成並びにその構成要素の由来及び機能 (続き)

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

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

- 5 a. 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される RNA または蛋白質の機能

#### DvSSJ1dsRNA

10 *DvSSJ1* 遺伝子断片はウェスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*, 以下、「WCR」という。)に由来する *DvSSJ1* 遺伝子の部分断片であり、210 塩基からなる (Hu *et al.*, 2016)。本組換えトウモロコシにおいては、相補的な 2 つの *DvSSJ1* 遺伝子断片を有する RNA が転写され、分子内二重鎖を形成することにより *DvSSJ1dsRNA* が産生される。当該 dsRNA は、本組換えトウモロコシを摂食した WCR の中腸において RNAi (RNA 干渉) を誘導し、内在の *DvSSJ1* 蛋白質の産生を抑制することにより殺虫活性を示す。

#### - RNAi の作用メカニズム

20 RNAi は、動植物が元来備えている、遺伝子発現及び生体防御を調節する機構である。dsRNA が細胞中に産生される又は取り込まれると、RNase III 型ヌクレアーゼである Dicer 蛋白質が細胞質の dsRNA を 21 bp~24 bp の siRNA (small interfering RNA) に分解する。生じた siRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) と結合し、相補的な塩基配列を含む標的 mRNA を塩基対形成によって特異的に認識する。認識された標的 mRNA は RISC 中の Argonaute 蛋白質によって分解され、結果として標的 mRNA からの蛋白質の

25 産生が抑制される (Baum and Roberts, 2014、Hu *et al.*, 2016)。

#### - RNAi による WCR の防除

30 昆虫においては、内在性遺伝子配列の dsRNA の経口投与が RNAi を誘導することが知られており、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) において確認されて以来 (Timmons and Fire, 1998)、種々の昆虫で確認されている。WCR を含むコウチュウ目昆虫は経口投与された dsRNA に特に感受性が高く、WCR の特定の遺伝子を標的とした dsRNA を植物中に産生させることにより、当該植物を摂食した WCR 中に RNAi を誘導し、防除することが可能であることが報告されている (Baum and Roberts, 2014、Hu *et al.*, 2016)。

#### - *DvSSJ1* 遺伝子の同定及び *DvSSJ1* 蛋白質の機能

40 RNAi を介した WCR 防除の新たな標的遺伝子を得るため、WCR 由来の cDNA ライブラリーを基に作成した dsRNA を WCR に経口投与し、殺虫活性を指標にスクリーニングした結果、*DvSSJ1* 遺伝子が選抜された (Hu *et al.*, 2016)。

*DvSSJ1* 遺伝子がコードする *DvSSJ1* 蛋白質は 160 アミノ酸からなる膜貫通型蛋白質であり、アミノ酸配列の相同性からショウジョウバエ (*Drosophila*



*melanogaster*) における SSK (SNAKESKIN) 蛋白質のオルソログ<sup>1)</sup>と考えられた (アミノ酸配列で 54.9%の一致、Hu *et al.*, 2016)。

SSK 蛋白質は、ショウジョウバエの SSJ (Smooth Septate Junction) の形成に必須の蛋白質である。SSJ は節足動物の中腸上皮において、上皮細胞の形態及び細胞間隙における水溶性物質の受動拡散を調節する細胞結合であり (図 1、16 ページ)、*Ssk* 遺伝子の欠損したショウジョウバエは、SSJ が正常に形成されないため胚性致死となる (Yanagihashi *et al.*, 2012)。DvSSJ1 蛋白質も WCR の中腸上皮において発現していることから、WCR における SSJ 形成に関与していると考えられた (Hu *et al.*, 2016)。

なお、*Ssk* 遺伝子のオルソログは他の節足動物にも認められるが、脊椎動物や植物には認められない (Hu *et al.*, 2016)。

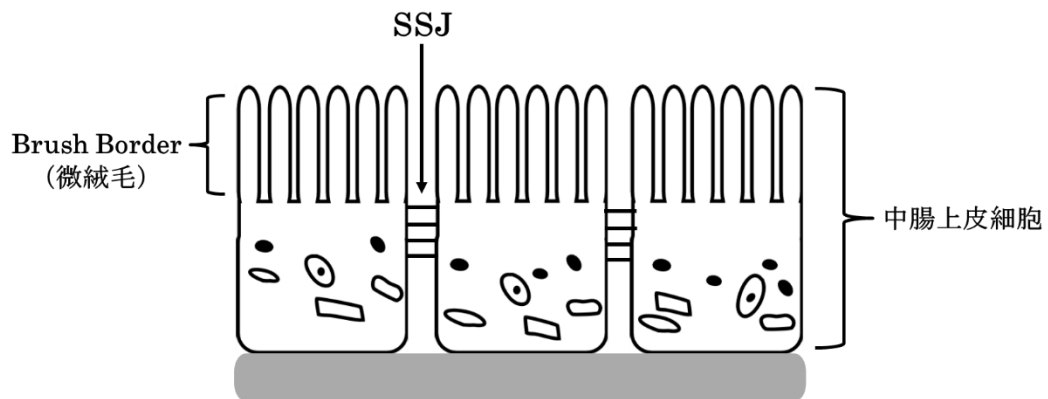


図 1 WCR の中腸上皮細胞における SSJ

SSJ は中腸上皮細胞同士を接着することにより、個々の細胞の形態を調節する。また、細胞間隙を塞ぐ隔壁となり、水溶性物質の受動拡散を調節する。

・ 本組換えトウモロコシ中の *DvSSJ1dsRNA* による WCR の防除

WCR に摂食された本組換えトウモロコシの細胞組織は中腸において消化され、放出された *DvSSJ1dsRNA* が中腸上皮細胞に取り込まれると考えられる。取り込まれた *DvSSJ1dsRNA* は RNAi を介して中腸上皮細胞に内在の *DvSSJ1mRNA* を特異的に分解し、DvSSJ1 蛋白質の産生を抑制する。その結果、WCR の中腸における SSJ 形成が阻害されると考えられる (Hu *et al.*, 2016)。上述のように、SSJ は中腸上皮細胞の形態及び細胞間隙における水溶性物質の受動拡散を調節していることから、*DvSSJ1dsRNA* は本組換えトウモロコシを摂食した WCR の中腸において SSJ 形成を阻害し、これらの調節機能を損なうことにより、殺虫活性を示すと考えられた (図 2、17 ページ; Hu *et al.*, 2016)。

<sup>1)</sup> 共通の先祖遺伝子に由来し、異なる種において同じ機能を示す蛋白質又は遺伝子。

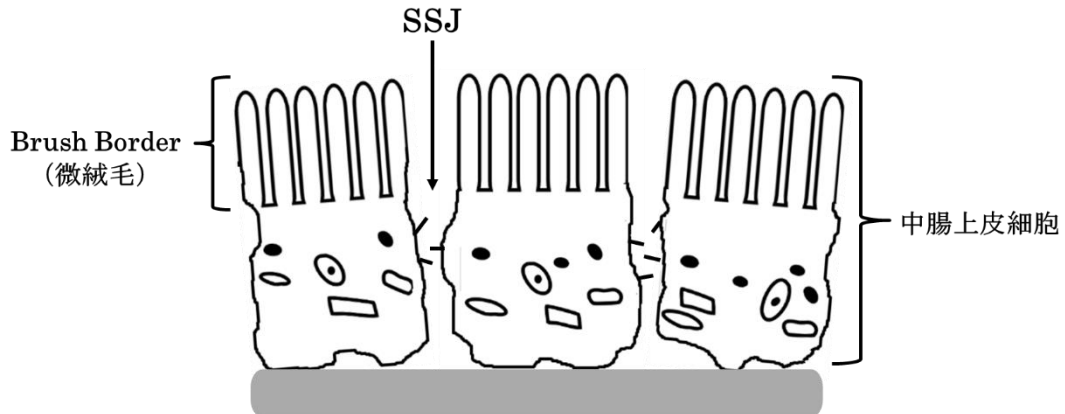


図 2 *DvSSJ1dsRNA* を摂取した WCR の中腸上皮細胞  
*DvSSJ1dsRNA* により、SSJ の形成が阻害され、中腸の機能が損なわれると考えられる。

- *DvSSJ1dsRNA* の殺虫スペクトル

5 標的害虫である WCR に対する殺虫活性を確認するため、210 bp の dsRNA を *in vitro* で合成し、WCR に混餌投与した。その結果、WCR に対する殺虫活性が認められ、 $LC_{50}$  は 0.036 ppm であった (表 3、18 ページ; 添付資料 1 の Appendix 9)。同様に、WCR を除くコウチュウ目昆虫 9 種及びチョウ目昆虫

10 4 種に本 dsRNA を混餌投与し、殺虫スペクトルを確認した。その結果、WCR と同じくコウチュウ目ハムシ科に属する近縁種 *Diabrotica undecimpunctata* (サザンコーンルートワーム; ジュウイチホシウリハムシ) に対して殺虫活性が認められたが、その他の昆虫については試験に用いた本 dsRNA の最大濃度である 1 ppm においても生存率に影響は認められなかった (表 3、18 ページ; 添付資料 1 の Appendix 9)。

15 なお、RNAi においては 21 bp~24 bp の siRNA が標的遺伝子の mRNA 上の相補的な塩基配列を特異的に認識して分解することから (Baum and Roberts, 2014)、各昆虫由来の *Ssk* 遺伝子オルソログについて、*DvSSJ1* 遺伝子断片との塩基配列の一致を確認した。その結果、上記混餌投与試験において影響が認められたサザンコーンルートワームの *Ssk* 遺伝子オルソログにおいて

20 20 については、*DvSSJ1* 遺伝子断片との間に連続する 21 塩基の一致が 79 箇所認められたが、影響が認められなかった昆虫については連続する 21 塩基の一致は認められなかった (表 3、18 ページ)。

25 これらのことから、*DvSSJ1dsRNA* は、調査した 14 種の昆虫のうち WCR 及びその近縁種であるサザンコーンルートワームだけに RNAi を誘導し、殺虫活性を示した。

コウチュウ目又はチョウ目以外の目に属する昆虫に対する影響についても一般申請までに調査する予定である。

表 3 *DvSSJ1*dsRNA の殺虫スペクトル

目	科	種	LC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	NOEC <sup>2)</sup> (ppm)	21 塩基の一致 <sup>3)</sup>
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (WCR)	0.036 (0.0066 - 0.065)	—	190
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	—	0.01	79
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	—	>1	0 (12)
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	<i>Tribolium castaneum</i>	—	>1	0 (11)
		<i>Zophobas morio</i>	—	>1	0 (10)
		<i>Tenebrio molitor</i>	—	>1	NA <sup>4)</sup>
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Epilachna varivestis</i>	—	>1	0 (12)
		<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> <sup>5)</sup>	—	NA <sup>4)</sup>	0 (8)
		<i>Coleomegilla maculata</i> <sup>5)</sup>	—	>1	0 (13)
		<i>Hippodamia convergens</i> <sup>5)</sup>	—	>1	NA <sup>4)</sup>
Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Dalotia coriaria</i> <sup>5)</sup> ( <i>Atheta coriaria</i> )	—	>1	0 (8)	
Lepidoptera (チョウ目)	Nymphalidae (タテハチョウ科)	<i>Vanessa cardui</i>	—	>1	0 (8)
	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	—	>1	0 (9)
	Tortricidae (ハマキガ科)	<i>Cydia pomonella</i>	—	>1	0 (8)
	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Helicoverpa zea</i>	—	>1	0 (8)

1) 半数致死濃度。括弧内は 95%信頼区間。

2) 無影響濃度：生存率に影響を生じなかった最大濃度。試験に用いた濃度上限である 1 ppm で影響が認められなかった場合は > 1ppm とした。

3) 210 bp の *DvSSJ1* 遺伝子断片と各昆虫由来の *Ssk* 遺伝子オルソログとの間で連続する 21 塩基が一致する箇所数。21 塩基の一致が認められない場合は、一致した塩基配列の長さの最大値を括弧で示した。

4) 2018 年 3 月時点では未調査。今後調査予定。

5) 非標的昆虫。これら以外の 11 種は米国における農業害虫。

## IPD072Aa 蛋白質

5 IPD072Aa 蛋白質 (GenBank accession number KT795291) は、86 アミノ酸からなる選択的殺虫蛋白質であり、土壤中に普遍的に存在するグラム陰性桿菌である *Pseudomonas chlororaphis* に由来する (Schellenberger *et al.*, 2016)。  
5 *P. chlororaphis* は米国及び欧州で生物農薬として安全に使用されており、植物、家畜及びヒトへの病原性は認められていない (Anderson *et al.*, 2018)。

### - IPD072Aa 蛋白質の同定及び機能

10 WCR に殺虫効果を示す新たな蛋白質を同定するため、土壤細菌の蛋白質抽出液を WCR に混餌投与し、殺虫活性を指標にスクリーニングした結果、活性画分中の主要な蛋白質として IPD072Aa 蛋白質が精製された (Schellenberger *et al.*, 2016)。

15 本蛋白質を摂食した WCR においては、本蛋白質が中腸上皮細胞の内腔側に局在し (図 3、20 ページ)、その後中腸上皮細胞が破壊されることが確認された。このことから、本蛋白質は Bt 蛋白質と同様、WCR の中腸上皮細胞に存在する受容体に結合し、中腸上皮細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられた。実際に、中腸上皮刷子縁膜小胞 (brush border membrane vesicles ;  
20 BBMV) を用いた結合試験の結果、本蛋白質が WCR の BBMV に結合することが確認された (添付資料 1 の Appendix 10)。一方、後述するように本蛋白質が殺虫活性を示さないチョウ目昆虫である *Ostrinia nubilalis* (ヨーロッパアワノメイガ) の BBMV への結合は認められなかったことから (添付資料 1 の Appendix 10)、本蛋白質は WCR の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合して作用すると考えられた。

25 なお、本蛋白質を産生する組換えトウモロコシは、WCR に殺虫活性を示す Cry34Ab1/Cry35Ab1 蛋白質及び Cry3Bb1 蛋白質に対する抵抗性を発達させた WCR に対しても殺虫活性を示した (Schellenberger *et al.*, 2016)。また、本蛋白質は WCR の BBMV への結合試験において、これら Bt 蛋白質と競合しないことが示された (添付資料 1 の Appendix 10)。これらのことから、これら Bt 蛋白質と本蛋白質は WCR の中腸において異なる受容体に結合すると考  
30 えられた。

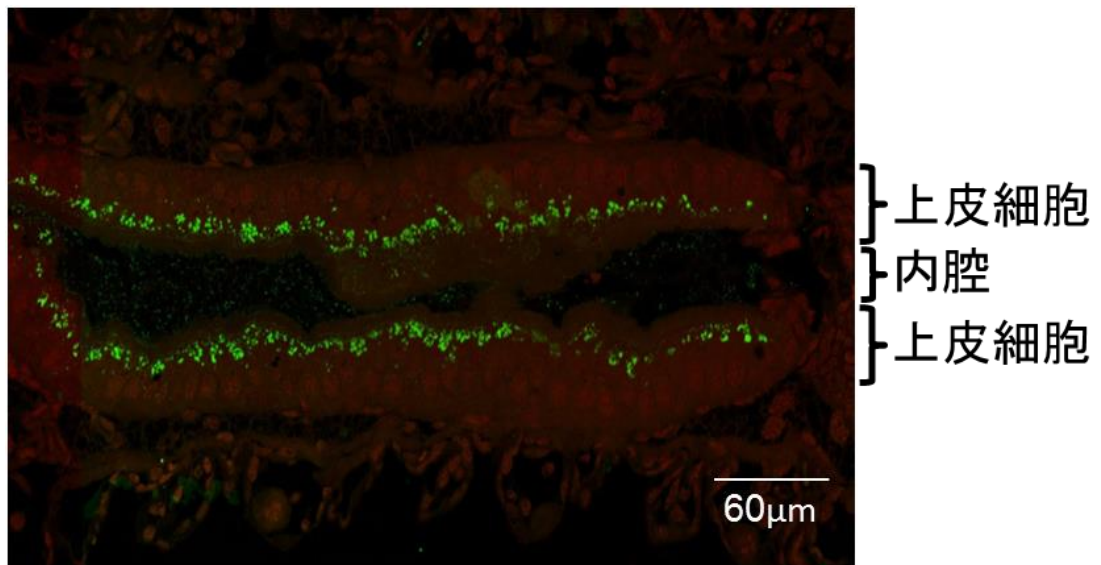


図 3 WCR の中腸における IPD072Aa 蛋白質の局在

WCR に IPD072Aa 蛋白質を混餌投与し、12 時間後にその長軸方向の超薄切片を作成し、IPD072Aa 蛋白質を特異的抗体で検出した（緑色蛍光）。IPD072Aa 蛋白質は中腸上皮細胞の内腔側に局在している。

5

#### - IPD072Aa 蛋白質の殺虫スペクトル

標的害虫である WCR に対する殺虫活性を確認するため、本蛋白質を *in vitro* で合成し WCR に混餌投与した。その結果、WCR に対する殺虫活性が認められ、 $LC_{50}$  は 15.9 ppm であった（表 4、21 ページ；添付資料 1 の Appendix 9）。同様に、WCR を除くコウチュウ目昆虫 10 種及びチョウ目昆虫 4 種に本蛋白質を混餌投与し、殺虫スペクトルを確認した。その結果、他のコウチュウ目昆虫に対する本蛋白質の NOEC はいずれも 100 ppm を超えていた。また、チョウ目昆虫については、試験に用いた本蛋白質の最大濃度である 1000 ppm においても生存率への影響は認められなかった（表 4、21 ページ；添付資料 1 の Appendix 9）。

10

15

これらのことから、IPD072Aa 蛋白質は、調査した 15 種の昆虫のうち WCR に特異的に殺虫活性を示した。

20

コウチュウ目又はチョウ目以外の目に属する昆虫に対する影響についても一般申請までに調査する予定である。

表 4 IPD072Aa 蛋白質の殺虫スペクトル

目	科	種	LC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (ppm)	NOEC <sup>2)</sup> (ppm)
Coleoptera (コウチュウ目)	Chrysomelidae (ハムシ科)	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i> (WCR)	15.9 (12.6 - 20.6)	—
		<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	—	500
		<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	—	>1,000
	Tenebrionidae (ゴミムシダマシ科)	<i>Tribolium castaneum</i>	—	>1,000
		<i>Zophobas morio</i>	—	>1,000
		<i>Tenebrio molitor</i>	—	100
	Coccinellidae (テントウムシ科)	<i>Epilachna varivestis</i>	—	100
		<i>Cryptolaemus montrouzieri</i> <sup>3)</sup>	—	>1,000
		<i>Coleomegilla maculata</i> <sup>3)</sup>	—	100
		<i>Hippodamia convergens</i> <sup>3)</sup>	—	500
	Staphylinidae (ハネカクシ科)	<i>Dalotia coriaria</i> <sup>3)</sup> ( <i>Atheta coriaria</i> )	—	>1,000
Lepidoptera (チョウ目)	Nymphalidae (タテハチョウ科)	<i>Vanessa cardui</i>	—	>1,000
	Crambidae (ツトガ科)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	—	>1,000
	Tortricidae (ハマキガ科)	<i>Cydia pomonella</i>	—	>1,000
	Noctuidae (ヤガ科)	<i>Helicoverpa zea</i>	—	>1,000

1) 半数致死濃度。括弧内は 95%信頼区間。

2) 無影響濃度：生存率に影響を生じなかった最大濃度。試験に用いた濃度上限である 1,000 ppm で影響が認められなかった場合は> 1,000ppm とした。

3) 非標的昆虫。これら以外の 11 種は米国における農業害虫。

## PAT 蛋白質

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

## PMI 蛋白質

PMI 蛋白質は *E.coli* に由来し、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する。トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、PMI 蛋白質を産生する植物は炭素源としてマンノースを含む培地において生長することが可能なため、組換え植物の選抜マーカーとして用いられる (Negrotto *et al.*, 2000 ; 第一.2. (3) .ハ.①、28 ページ)。

### b. アレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質との相同性

Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) データベース<sup>3)</sup> (2017 年 2 月版) を用い、IPD072Aa 蛋白質、PAT 蛋白質及び PMI 蛋白質と既知アレルギーのアミノ酸配列を比較した。連続する 8 アミノ酸の一致の検索及び FASTA アルゴリズムによる類似配列の検索を行った結果、IPD072Aa 蛋白質及び PAT 蛋白質と既知アレルギーのアミノ酸配列に類似性は認められなかった (添付資料 1 の Appendix 2)。PMI 蛋白質についても既知アレルギーとの間に有意な類似性は認められなかった。

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

*DvSSJ1dsRNA* の殺虫活性は WCR 及びその近縁種であるサザンコーンルートワームに特異的であり、試験に用いた他の昆虫に対して活性は認められていない (表 3、18 ページ)。また、RNAi の効果は塩基配列特異的であり、*Ssk* 遺伝子のオルソログは *DvSSJ1dsRNA* の標的となる可能性があるが、当該遺伝子のオルソログはトウモロコシには存在しない (Hu *et al.*, 2016)。

IPD072Aa 蛋白質の殺虫活性は WCR に特異的であり、試験に用いた他の昆虫に対して活性は認められていない (表 4、21 ページ)。また、当該蛋白質のアミノ酸配列について、酵素蛋白質を含めた既知の蛋白質のモチーフ或いはドメイン等との類似性は認められていない (Schellenberger *et al.*, 2016)。

<sup>2)</sup> 塩基配列が改変されているため、添付資料においては *morpat* と表記。

<sup>3)</sup> Health and Environmental Science Institute (HESI) によるデータベース (<http://comparedatabase.org>)、保持配列数 1,970。

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

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

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

10 以上のことから、これら RNA 及び蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は低いと考えられた。



## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

5 目的遺伝子の導入に用いたベクターはプラスミド PHP74643 であり (図 4、26 ページ)、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) 等由来のプラスミド pSB1 から作製された (Komari *et al.*, 1996)。

### ロ 特性

10

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

15 プラスミド PHP74643 の塩基数は 71,116 bp であり、挿入 DNA 領域の塩基数は 13,876 bp である。挿入 DNA 領域を含む T-DNA 領域の塩基配列を添付資料 1 の Appendix 1 に示した。

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20 プラスミド PHP74643 の外側骨格領域には、微生物を用いてプラスミドを増殖させる際に用いた選抜マーカーとして抗生物質スペクチノマイシン耐性 (*spc*) 遺伝子及びテトラサイクリン耐性 (*tetA*) 遺伝子が含まれている。しかしながら、これら抗生物質耐性遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置するため、宿主の細胞には導入されない。実際に、T<sub>3</sub> 世代 (図 6、28 ページ) の種子から抽出したゲノム DNA を用い、外側骨格 5 領域 (LB の外側領域、*spc*、*tetA*、*virG*、RB の外側領域) を対象とした PCR 分析を行った結果、抗生物質耐性遺伝子を含むこれらの領域が本組換えトウモロコシに導入されていないことが確認された (添付資料 1 の Appendix 3)。

25

30 また、PHP74643 の T-DNA 領域のうち、染色体に挿入されなかった外側骨格領域には、*zm-wus2* 遺伝子、*zm-odp2* 遺伝子、*Flp* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子の発現カセットが含まれる。これらの遺伝子は、T-DNA 領域が宿主の細胞に移入された後、染色体に挿入されることなく一過的に蛋白質を産生することにより機能する。*zm-wus2* 遺伝子及び *zm-odp2* 遺伝子は、形質転換における植物体の再生率を向上させる (Lowe *et al.*, 2016)。*Flp* 遺伝子は、FRT1 及び FRT87 において部位特異的組換えを誘導することにより、挿入 DNA 領域を染色体上の意図した位置に挿入することを可能にする (第一.2. (3) .イ、25 ページ)。なお、*DsRed2* 遺伝子は赤色蛍光による選抜マーカーとして機能するが、本組換えトウモロコシの作出には利用していない。これらの遺伝子を含む外側骨格領域が宿主の染色体に挿入されていないことは、T<sub>0</sub> 世代における塩基配列解析により確認した (第一.2. (4) .②、29 ページ)。

35

40

#### ③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

プラスミド PHP74643 に感染性はない。

### (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5

挿入 DNA 領域は、*pmi* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*DvSSJ1dsRNA* 及び *ipd072Aa* 遺伝子の発現カセットを含む。プラスミド PHP74643 における挿入 DNA 領域の構成を図 4 (26 ページ) に示した。

10

また、本組換えトウモロコシの染色体に挿入された核酸全体について、添付資料 3 及び図 5 (27 ページ) に示した。本組換えトウモロコシの作出においては、挿入 DNA 領域が染色体へ挿入されることによって内在性遺伝子の破壊が生じることのないよう、部位特異的組換えを用いた。このため、挿入 DNA 領域に加えて、部位特異的組換えに関与する配列も本組換えトウモロコシの染色体に挿入されている。

15

20

部位特異的組換えにはリコンビナーゼである FLP 蛋白質を用いた。FLP 蛋白質は標的配列である FRT1 及び FRT87 の配列特異的に組換えを誘導する。はじめに、これらの標的配列を含む挿入標的配列 (Landing Pad sequence; 以下「LP 配列」という。) を非組換えトウモロコシ PHR03 系統に導入し、1 コピーの LP 配列が染色体に挿入され、かつその挿入によって内在性遺伝子の破壊が生じていない系統 (以下、「中間系統」という。) を選抜した (添付資料 3 の Figure 1)。次に、得られた中間系統にアグロバクテリウム法により PHP74643 の T-DNA 領域を導入した (図 5 A 及び B、27 ページ)。当該 T-DNA 領域は FRT1 及び FRT87 に加え *Flp* 遺伝子発現カセットを含んでいるため、導入に伴い FLP 蛋白質が産生される (図 5 B、27 ページ)。その結果、当該 T-DNA 領域中の FRT1 及び FRT87 と、既に染色体に挿入されている LP 配列中の FRT1 及び FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され (図 5 B 及び C、27 ページ)、当該 T-DNA 領域のうち挿入 DNA 領域 (図 4、26 ページ) だけが染色体上の LP 配列中に挿入された (添付資料 3 の Figure 2 ; 図 5 D、27 ページ)。

25

30

なお、PHP74643 の T-DNA 領域全体が染色体に挿入される可能性もあるが、後述するように、本組換えトウモロコシの T<sub>0</sub> 世代を用いて、意図した部位特異的組換えだけが生じていることを確認した (第一.2. (4) .②、29 ページ)。

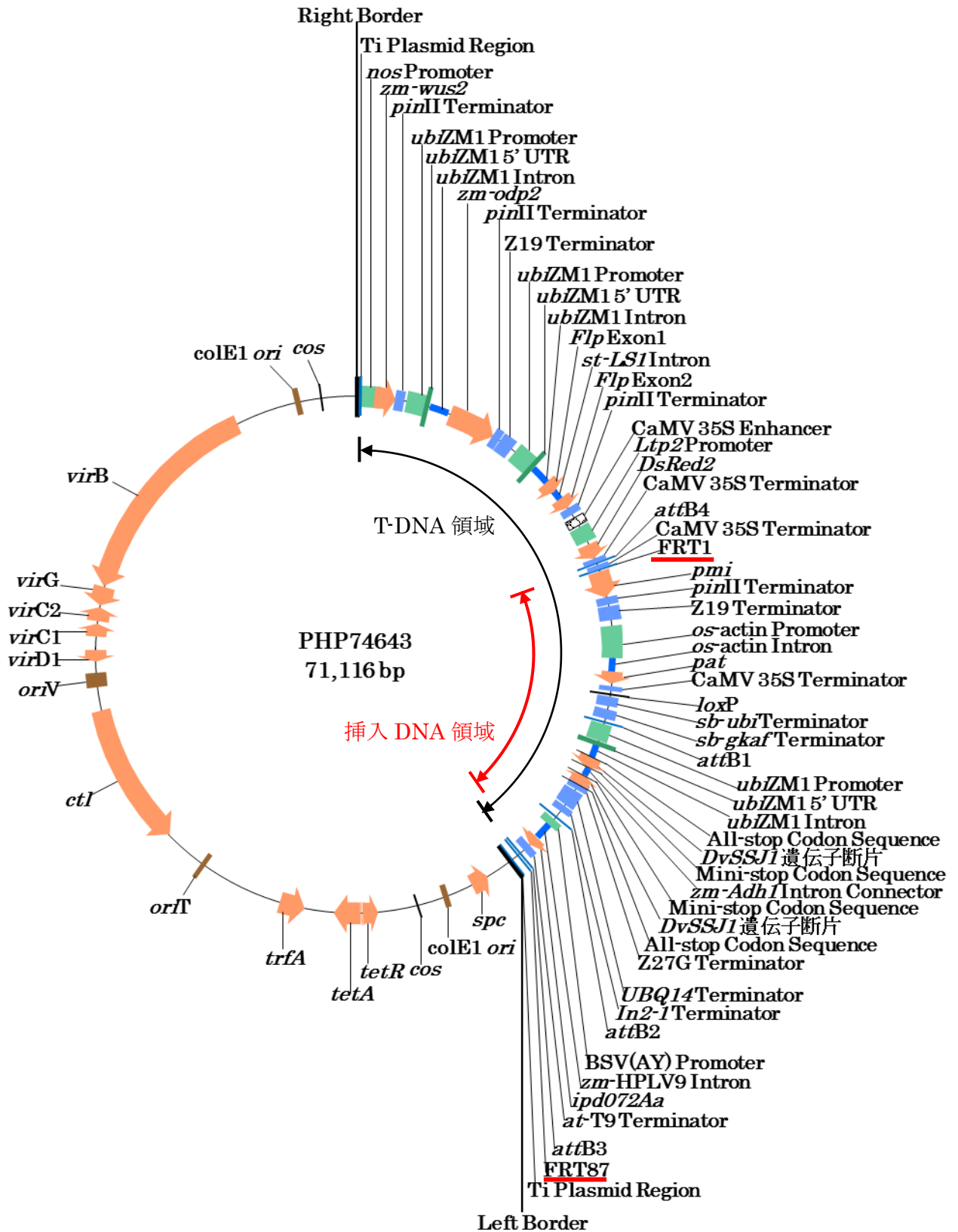


図 4 プラスミド PHP74643 における供与核酸の構成  
染色体に挿入される領域は、赤下線で示した FRT1 及び FRT87 に挟まれた挿入 DNA 領域である。

図 5 部位特異的組換えによる本組換えトウモロコシの作出

A: アグロバクテリウム中の導入用プラスミド PHP74643。

B: PHP74643 の T-DNA 領域。アグロバクテリウムから中間系統の細胞に導入され、核内で一過的に *Flp* 遺伝子を発現する。その後植物体から失われる。

C: 中間系統の染色体 DNA に予め組み込まれていた LP 配列。

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

























































































