

様式第3（第3の1の（2）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供
（情報提供書の提出）

令和5年3月20日

農林水産省消費・安全局農産安全管理課長 宛

氏名 コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社

代表取締役社長 野村 真一郎

提出者 住所 東京都千代田区永田町二丁目11番1号

電話番号 03-3519-3246

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等をするため、「農林水産分野におけるゲノム編集技術の利用により得られた生物の生物多様性影響に関する情報提供等の具体的な手続について」（令和元年10月9日付け元消安第2743号農林水産省消費・安全局長通知）第3の1の（2）の①の規定に基づき、当該生物の使用等に関する情報提供書を提出します。

様式第1（第3の1の（1）の①関係）

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に関する情報提供書

項目	記入欄				
1 ゲノム編集技術の利用により得られた生物の名称及び概要	<p>名称：PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ</p> <p>概要：PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシ（以下、「本ワキシートウモロコシ」という）は、子実デンプンのアミロペクチン含有量が増加したもち性のトウモロコシである。従来育種によって作出されたワキシートウモロコシは既に広く米国、中国及び南アジア等で栽培されており（資料1の1及び2、1～2ページ）、我が国においても栽培されることがある。</p>				
2 当該生物の用途	<p>食用、飼料用、栽培用及びその他（工業用）</p> <p>他の近交系ワキシートウモロコシとの交配で得られるハイブリッド品種が商品化される予定である。従来のワキシートウモロコシの子実はコーンスターチに加工され、主に食用及び工業用に利用されている（資料1の1及び2、1～2ページ）。本ワキシートウモロコシの意図された用途は従来のワキシートウモロコシの用途と相違ない。</p>				
3 使用施設の概要	—				
4 カルタヘナ法第2条第2項第1号の細胞外において核酸を加工する技術の利用により得られた核酸又はその複製物を有していないことが確認された生物であること	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="389 1346 663 1928">(1) 細胞外で加工した核酸の移入の有無（移入した場合は、移入した核酸に関する情報を含む。）</td> <td data-bbox="663 1346 1481 1928"> <p>本ワキシートウモロコシの作出においては6種類のプラスミドを同時に宿主細胞に移入した。うち3種類のプラスミドはそれぞれCRISPR-Cas9法で使用するエンドヌクレアーゼであるCas9蛋白質又は2種類のガイドRNA（CR4及びCR8）をコードする遺伝子を有する。残りの3種類のプラスミドはそれぞれ、選抜マーカーである<i>nptII</i>遺伝子、植物体の再生率を向上させる<i>zm-wus2</i>遺伝子又は<i>zm-odp2</i>遺伝子を有する。（資料1の3、2ページ）。なお、これらのプラスミドは上記遺伝子の一時的な発現を目的として導入した。また、以下に記載したとおり、これらのプラスミド由来の核酸が本ワキシートウモロコシのゲノム中に残存していないことを確認している。</p> </td> </tr> <tr> <td data-bbox="389 1928 663 2072">(2) 移入した核酸の残存の有無</td> <td data-bbox="663 1928 1481 2072"> <p>本ワキシートウモロコシは、宿主であるデントトウモロコシの近交系品種PH1V69系統の<i>WxI</i>遺伝子を、ゲノム編集技術を用いて欠失させることにより作出され</p> </td> </tr> </table>	(1) 細胞外で加工した核酸の移入の有無（移入した場合は、移入した核酸に関する情報を含む。）	<p>本ワキシートウモロコシの作出においては6種類のプラスミドを同時に宿主細胞に移入した。うち3種類のプラスミドはそれぞれCRISPR-Cas9法で使用するエンドヌクレアーゼであるCas9蛋白質又は2種類のガイドRNA（CR4及びCR8）をコードする遺伝子を有する。残りの3種類のプラスミドはそれぞれ、選抜マーカーである<i>nptII</i>遺伝子、植物体の再生率を向上させる<i>zm-wus2</i>遺伝子又は<i>zm-odp2</i>遺伝子を有する。（資料1の3、2ページ）。なお、これらのプラスミドは上記遺伝子の一時的な発現を目的として導入した。また、以下に記載したとおり、これらのプラスミド由来の核酸が本ワキシートウモロコシのゲノム中に残存していないことを確認している。</p>	(2) 移入した核酸の残存の有無	<p>本ワキシートウモロコシは、宿主であるデントトウモロコシの近交系品種PH1V69系統の<i>WxI</i>遺伝子を、ゲノム編集技術を用いて欠失させることにより作出され</p>
(1) 細胞外で加工した核酸の移入の有無（移入した場合は、移入した核酸に関する情報を含む。）	<p>本ワキシートウモロコシの作出においては6種類のプラスミドを同時に宿主細胞に移入した。うち3種類のプラスミドはそれぞれCRISPR-Cas9法で使用するエンドヌクレアーゼであるCas9蛋白質又は2種類のガイドRNA（CR4及びCR8）をコードする遺伝子を有する。残りの3種類のプラスミドはそれぞれ、選抜マーカーである<i>nptII</i>遺伝子、植物体の再生率を向上させる<i>zm-wus2</i>遺伝子又は<i>zm-odp2</i>遺伝子を有する。（資料1の3、2ページ）。なお、これらのプラスミドは上記遺伝子の一時的な発現を目的として導入した。また、以下に記載したとおり、これらのプラスミド由来の核酸が本ワキシートウモロコシのゲノム中に残存していないことを確認している。</p>				
(2) 移入した核酸の残存の有無	<p>本ワキシートウモロコシは、宿主であるデントトウモロコシの近交系品種PH1V69系統の<i>WxI</i>遺伝子を、ゲノム編集技術を用いて欠失させることにより作出され</p>				

(選抜・育成の経過及び当該核酸の残存の有無を確認した方法に関する情報を含む。)

た(資料1の1、1ページ)。
まず、上記プラスミドを移入した宿主細胞から植物体を再生させ、T₀世代とした。T₀世代の各個体におけるWxI遺伝子の塩基配列を解析し、WxI遺伝子が欠失した1系統を選抜した(資料1の3及び4.a、2及び7ページ;資料2、1~3ページ)。なお、当該系統はWxI遺伝子の欠失についてヘミ接合体(WxI対立遺伝子の一方だけが欠失している)であり、以降の育種でホモ接合体にすることにより、両方のWxI対立遺伝子が同一の欠失を有する本ワキシートウモロコシを作出している。

上記のT₀世代1系統をPH1V69系統と戻し交配して得られたBC₀世代(資料1のFigure 4、6ページ;資料2、1ページ)において改めて塩基配列解析を行い、WxI遺伝子が欠失していることを確認した。また、BC₀世代9個体について、定量PCR法及びSouthern-by-Sequencing (SbS)分析により、移入したプラスミド由来の核酸が宿主ゲノム中に残存していないことを確認した(資料1の4.b、8ページ)。まず定量PCR法による確認においては、各個体の葉から抽出したDNAを用い、各プラスミドに含まれる主要な遺伝子配列(*cas9*、2種類のガイドRNA、*nptII*、*zm-odp2*及び*zm-wus2*)の有無を特異的なプライマーにより検出した(資料2、4及び5ページ)。その結果、上記のいずれの遺伝子配列についても定量PCRの結果が陰性である9個体を得られた(資料2、10ページ)。これらの個体について、さらにSbS分析による確認を行った。SbS分析はキャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた手法であり、断片化した植物ゲノム全体から、移入されたプラスミドの全塩基配列を網羅する特異的なプローブセットを用いてDNA断片を選択的に回収(キャプチャー)する。プローブとハイブリダイズしないゲノムDNA断片は洗浄により除去され、回収されたDNA断片だけが濃縮される。濃縮されたDNA断片について、PCRによる増幅及び品質チェックの後、次世代シーケンサーを用いた塩基配列解析を行う。プラスミド由来の塩基配列が宿主ゲノムに挿入されている場合には、プラスミド由来の塩基配列と宿主ゲノムとの接合部位を含むDNA断片が検出される。また、本法の検出感度は従来遺伝子組換え作物の評価に用いられてきたサザンブロット分析と同等であることが示されており、35 bp以上の挿入配列を再現良く検出できる(Zastrow-Hayes *et al.*, 2015, Brink *et al.*, 2019;資料3)。本ワキシートウモロコシについては、定量PCR法による確認を経たBC₀世代9個体のそれぞれの葉から抽出したDNAを断片化し、

		<p>移入した6種のプラスミド由来の塩基配列を含むDNA断片の有無をSbS分析を用いて調べた。その結果、これら9個体はプラスミド由来の塩基配列を有していないことが確認された（資料1のFigure 6～11、10～15ページ；資料2、6～8ページ；代表的な1個体の解析結果を記載）。なお、プラスミドに含まれるトウモロコシ由来の構成要素の配列がSbS分析で検出されたが、これらの塩基配列と宿主トウモロコシのゲノムとの間に新たな接合部位が検出されなかったことから、宿主トウモロコシに内在する配列を検出したものと考えられた。また、宿主トウモロコシのゲノム1コピーあたり1コピーのプラスミドを含む陽性対照におけるプラスミドDNA配列の平均リード深度は582～2,574であり、SbS分析は十分な信頼性を有していると考えられた。</p> <p>これらの確認を経たBC₀世代9個体全てをPH1V69系統と戻し交配し、BC₁世代を作出した。さらに2回の自殖を行い、BC₁F₃世代を作出した（資料1のFigure 4、6ページ；資料2、1ページ）。本ワキシートウモロコシの情報提供の範囲はBC₁F₃世代以降である。</p>
5 改変した生物の分類学上の種	<p>(1) 分類学上の種の名称及び宿主の品種名又は系統名等</p> <p>(2) 自然環境における分布状況、使用等の歴史及び現状並びに生理学的及び生態学的特性</p>	<p>和名：トウモロコシ 英名：maize (corn) 学名：<i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (L.) Iltis 系統名：PH1V69（デントトウモロコシ）</p> <p><u>自然環境における分布状況、使用等の歴史及び現状</u> 現在、トウモロコシの自然環境における自生地域は知られていない。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、最初にトウモロコシの利用が始まったのは紀元前7000～5000年頃であり、紀元前3400年頃には栽培が始まったと考えられている（戸澤, 2005）。また、南北アメリカ大陸の各地に伝播して栽培される過程で、デント、ポップ、スイート、フリントのような変異種が生じたと考えられる（山田, 2001、戸澤, 2005）。1492年のコロンブスのアメリカ大陸到達後、コロンブスによってスペインを通じてヨーロッパに導入され、その後、中東、アフリカ及びアジアの各地域に伝播した。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、</p>

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）。現在、トウモロコシは米国、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）。

生理学的及び生態学的特性

ア 基本的特性

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（戸澤, 2001）。

イ 生息又は生育可能な環境の条件

トウモロコシは、長い年月の間に栽培植物として馴化された結果、自然条件下における自生能力を失った作物である（OECD, 2003）。トウモロコシ種子の発芽の最低温度は10～11℃、最適温度は33℃とされている。実際に播種されるのは13～14℃以上である（中村, 2001）。また、トウモロコシはもともと短日植物であり、その感光性（日長反応性）は晩生種ほど敏感で、早生品種ほど鈍感である（柿本ら, 2001）。これら温度条件等の他、トウモロコシは吸水により種子重が乾燥重の1.6～2.0倍になったときに幼根（初生根又は種子根）が抽出し、子実発芽となる（戸澤, 2005）。また、トウモロコシの栽培は腐植に富む土壌が適し、pH5.0～8.0の範囲で栽培可能である（戸澤, 2005）。

ウ 繁殖又は増殖の様式

トウモロコシは栄養繁殖せず、種子繁殖する。完熟した種子は雌穂の苞皮で覆われており脱粒しない。トウモロコシは長い間栽培植物として利用してきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である（OECD, 2003）。種子の休眠性は知られていない。種子の寿命は、主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い（戸澤, 2005）。氷点下の気温は種子の発芽に悪影響を与え、トウモロコシ種子生産に影響を及ぼす主要な要因となっている。また、45℃以上の気温も種子の発芽に悪影響を及ぼすことが報告されている（Wych, 1988）。さらに、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壌温度が10℃に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する（菊池, 1987、中村, 2001）。また、仮

		<p>に発芽しても生長点が地上に出た後は6～8時間以上0℃以下の外気にさらされると生存できない（OECD, 2003）。子実の活力を6～8年保存するには、子実水分12%、温度10℃、相対湿度55%以内に保つことが必要である（中村, 2001、OECD, 2003）。</p> <p>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<i>Z. mays</i> 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（<i>Z. mays</i> subsp. <i>mexicana</i>）及び<i>Tripsacum</i> 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、<i>Tripsacum</i> 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、<i>Tripsacum</i> 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<i>Tripsacum</i> 属の野生種の自生について報告はない。</p> <p>エ 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。</p>
6 改変に利用したゲノム編集の方法	(1) 利用した人工ヌクレアーゼ等に関する情報	<p>本ワキシートウモロコシの作出にはCRISPR-Cas9法を用いた。本法においては、エンドヌクレアーゼであるCas9蛋白質がガイドRNAによって標的DNA配列に結合し、二本鎖DNAを切断する（資料1の3、2ページ）。</p> <p>なお、切断されたDNAは、植物細胞が元来有するDNA修復機構である非相同末端修復にて修復される（資料1の3、2ページ）。</p>
	(2) 当該人工ヌクレアーゼ等の導入方法	<p>Cas9蛋白質等をコードする遺伝子を含むプラスミドを、パーティクルガン法により宿主細胞に導入した（資料1の3、2ページ）。</p>

<p>7 改変した遺伝子及び当該遺伝子の機能</p>	<p>(1) 標的とし切断等した宿主のゲノム上の部位及び当該部位に生じた変化</p>	<p>移入したプラスミドからはCas9蛋白質及び2種類のガイドRNA（CR4及びCR8）が産生される。これらのガイドRNAは、それぞれ <i>Wx1</i> 遺伝子の5'側に位置するプロモーター領域及び3'側に位置する非翻訳領域内の標的DNA配列を特異的に認識し、Cas9蛋白質がこれら2カ所の標的DNA配列を切断する。続いて、切断部位同士が非相同末端修復により接合することにより、標的DNA配列に挟まれた <i>Wx1</i> 遺伝子を含む領域を欠失させることが可能である（資料1の3、2ページ）。実際に本ワキシートウモロコシ中の当該領域の塩基配列を次世代シーケンサーにより解析した結果、2カ所の切断部位の間の <i>Wx1</i> 遺伝子を含む領域が意図したとおり欠失していることが確認された。また、切断部位同士が結合しており、意図しない塩基の付加や欠失は認められなかった（資料1の4.a、7ページ；資料2、2～3ページ）。</p>
	<p>(2) 標的とした遺伝子に関する情報及び改変により生じると理論上考えられる形質の変化</p>	<p>標的遺伝子である <i>Wx1</i> 遺伝子はアミロース合成酵素をコードする。アミロース合成酵素は、トウモロコシの子実におけるアミロースの生合成を触媒する（資料1の2、1ページ）。宿主であるデントトウモロコシの子実デンプンは、直鎖状多糖であるアミロース及び分枝状多糖であるアミロペクチンから成り、その割合は約25%及び75%である。一方、自然突然変異又は誘発突然変異により <i>Wx1</i> 遺伝子が機能を失ったトウモロコシはワキシートウモロコシとして知られており、子実デンプンのほぼ100%がアミロペクチンから成る（以下、「ワキシー形質」という）。ゲノム編集技術により <i>Wx1</i> 遺伝子が欠失した本ワキシートウモロコシも、同様のワキシー形質を示すと考えられる（資料1の2、1ページ）。</p>
<p>8 当該改変により付与された形質の変化</p>		<p>デンプンの組成の違いはヨウ素ヨウ化カリウム染色（ヨウ素デンプン反応）によって確認できる。染色により、デンプンの約25%がアミロースから成るデントトウモロコシの子実は暗青色を呈するが、ほぼ100%がアミロペクチンから成るワキシートウモロコシの子実は赤褐色を呈する。本ワキシートウモロコシのBC₁F₂世代（資料1のFigure 4、6ページ；資料2、1ページ）において子実の胚乳をヨウ素ヨウ化カリウムで染色した結果、想定どおり赤褐色を呈する子実が認められ、ワキシー形質が付与されたことが確認された（資料1の5.a、18ページ）。</p>

<p>9 8以外に生じた形質の変化の有無（ある場合はその内容）</p>	<p>(1) 標的以外の部位が改変された可能性に関する情報</p>	<p>標的DNA配列と類似性の高い配列において意図しない変異（以下、「オフターゲット変異」という）が生じる可能性を検討した（資料1の4.c、16ページ）。用いた2種類のガイドRNAは <i>Wx1</i> 遺伝子中の標的DNA配列に特異的に設計されており、<i>Wx1</i> 遺伝子を除き宿主のゲノム配列中に標的DNA配列と同一の配列は存在しないことを確認している。また、これまでの知見から植物においてガイドRNAの標的DNA配列と3塩基以上異なるDNA配列にオフターゲット変異が生じる可能性は低いと考えられた。このことから、オフターゲット変異が生じる可能性のある部位として、2種類のガイドRNAの標的DNA配列と1塩基又は2塩基異なるDNA配列が考えられた（以下、「潜在的オフターゲット配列」という）。潜在的オフターゲット配列を特定するため、ガイドRNAの標的DNA配列と参照ゲノム配列を比較した。今回実施した比較においては、届出者が独自に有するPH1V69系統のゲノム配列情報を参照するため、自社データベースと連携したソフトウェアを用いた。当該ソフトウェアは、CRISPRDirect及びCas-OFFinder等のソフトウェアと同様に、公的に利用可能なソフトウェア・パッケージ及びアルゴリズムを用いて開発されており、ガイドRNAとのミスマッチ及びバルジを有する潜在的オフターゲット配列を検出できる。なお、検索条件（参照ゲノムDNA配列、対象のPAMモチーフ（<i>Streptococcus pyogenes</i> 由来のCas9蛋白質の場合は5'-NGG-3'）及び許容する塩基配列の相違の程度）が同じ場合、CRISPRDirect及びCas-OFFinder等と当該ソフトウェアで、得られる潜在的なオフターゲット配列に違いがないことをソフトウェアの開発時に様々な配列を用いて確認した。比較の結果、片方のガイドRNA（CR8）の標的DNA配列と2塩基異なる潜在的オフターゲット配列が1箇所特定された（資料2、11ページ；なお、Cas-OFFinderを用いても同じ結果であった）。そこで、BC₁世代29個体（資料1のFigure 4、6ページ；資料2、1ページ）について塩基配列解析を行い、本ワキシートウモロコシ中の当該配列にオフターゲット変異が生じていないことを確認した（資料1の4.c、16ページ；資料2、9ページ）。</p> <p>なお、従来 of 交配育種や誘発突然変異によって生じる遺伝的変異と比較するとゲノム編集によるオフターゲット変異の頻度は極めて低い。仮にオフターゲット変異が生じたとしても、形態異常等の望ましくない形質を有する系統は育種評価の過程で取り除かれる（資料1の4.c、16ページ）。</p>
-------------------------------------	-----------------------------------	--

	<p>(2) 宿主と比較して作出した生物に生じた8以外の形質の変化</p>	<p>従来のワキシートウモロコシは、自然突然変異又は誘発突然変異により <i>Wx1</i> 遺伝子が機能を失ったトウモロコシの一種である。同様に、本ワキシートウモロコシはゲノム編集技術により <i>Wx1</i> 遺伝子が欠失しているだけであり、その生理学的及び生態学的特性において従来のトウモロコシを超えるものではないと考えられる。</p> <p>従来、近交系品種の育種の一環として、ほ場における諸形質の網羅的な評価及び選抜が行われており、形態異常等の望ましくない形質を有する系統は除去される。本ワキシートウモロコシについても慣行に従って米国ほ場で総合的に評価されており、開花期、絹糸抽出期、稈長、雄穂の大きさ、小穂の形成及び種子の生産量（収量）の点から宿主であるデントトウモロコシと同等であると考えられた（資料1の5.b、19ページ；資料2、12ページ）。</p>
<p>10 当該生物の使用等をした場合に生物多様性影響が生ずる可能性に関する考察</p>	<p>(1) 競合における優位性</p>	<p>植物が自然環境下で他の植物と競合するためには、当該植物が自然環境下で自生する、すなわち人の手を借りずに繁殖し、群落を維持することが必要である。植物の自生には種子の脱粒性及び休眠性が重要であるが、栽培作物であるトウモロコシは栽培化の過程でこれらの特性を失っており、自生することができない（OECD, 2003、後藤ほか, 2018）。従来のワキシートウモロコシを含むトウモロコシが我が国において自生し、野生植物と競合するとの報告はない。</p> <p>従来のワキシートウモロコシは、自然突然変異又は誘発突然変異により <i>Wx1</i> 遺伝子が機能を失ったトウモロコシの一種である。同様に、本ワキシートウモロコシは、ゲノム編集技術により宿主であるデントトウモロコシの <i>Wx1</i> 遺伝子が欠失しているだけであり、競合における優位性について従来のワキシートウモロコシを超えるものではないと考えられた。</p> <p>実際に、米国ほ場において従来育種の慣行に従った評価を行い、本ワキシートウモロコシが形態異常等の望ましくない形質を有していないことを確認している。また、開花期、絹糸抽出期、稈長、雄穂の大きさ、小穂の形成及び種子の生産量の点から宿主であるデントトウモロコシと同等であることを確認した（資料1の5.b、19ページ；資料2、12ページ）。</p> <p>以上のことから、本ワキシートウモロコシが競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。</p>

(2) 捕食性又は寄生性	—
(3) 有害物質の産生性	<p>従来のワキシートウモロコシは食品として既に長い利用の歴史がある。また、従来のワキシートウモロコシを含むトウモロコシが野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。</p> <p>従来のワキシートウモロコシは、自然突然変異又は誘発突然変異により <i>Wx1</i> 遺伝子が機能を失ったトウモロコシの一種である。同様に、本ワキシートウモロコシは、ゲノム編集技術により宿主であるデントトウモロコシの <i>Wx1</i> 遺伝子が欠失しているだけであり、有害物質の産生性について従来のワキシートウモロコシを超えるものではないと考えられた。</p> <p>以上のことから、本ワキシートウモロコシが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。</p>
(4) 交雑性	<p>我が国にワキシートウモロコシを含むトウモロコシと交雑可能な野生種は自生していないことから、本ワキシートウモロコシが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。</p>
(5) その他の性質	—
(6) 総合的考察	<p>従来のワキシートウモロコシを含むトウモロコシが我が国において自生し野生植物と競合したり、野生動植物の生息又は生育に影響を及ぼすような有害物質を産生したりするとの報告はない。また、我が国にワキシートウモロコシを含むトウモロコシと交雑可能な野生種は自生していない。</p> <p>従来のワキシートウモロコシは、自然突然変異又は誘発突然変異により <i>Wx1</i> 遺伝子が機能を失ったトウモロコシの一種である。同様に、本ワキシートウモロコシは、ゲノム編集技術により宿主であるデントトウモロコシの <i>Wx1</i> 遺伝子が欠失しているだけであり、競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性について従来のワキシートウモロコシを超えるものではないと考えられた。</p> <p>以上のことから、本ワキシートウモロコシを我が国において使用した場合に、生物多様性に影響が生ずるおそれはないと考えられた。</p>

資料一覧

資料1 PH1V69 CRISPR-Cas9 Waxy Maize

目次

1. Summary (概説)
2. Waxy trait (ワキシー形質)
Figure 1. Visual appearance and starch composition of normal dent and waxy maize kernels
3. Method for development (作出方法)
Figure 2. Schematic representation of maize *Wx1* gene and location of two guide RNAs used to generate PH1V69 CRISPR-Cas9 Waxy Maize
Figure 3. Schematic map of six plasmids used to generate PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 4. Schematic representation of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize development
4. Molecular characterization (分子的特性評価)
 - a. Repair site sequence (標的部位の塩基配列)
Figure 5. Schematic representation of *Wx1* gene deletion in PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
 - b. Confirmation of no unintended integration of DNA from the transformation plasmids (SbS分析によるプラスミド由来のDNAの残存確認)
Figure 6. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 1 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 7. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 2 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 8. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 3 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 9. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 4 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 10. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 5 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
Figure 11. SbS results confirming the absence of DNA sequences from plasmid 6 in BC0 (F1) plant advanced for development of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
 - c. Off-target analysis (オフターゲット候補配列の変異の確認)
Table 1. Bioinformatic analysis of PH1V69 maize for sequences with 0-2 nucleotide differences from CR4 and CR8 guide RNA target sequences
5. Phenotype characterization (表現型の特性評価)
 - a. Trait confirmation (特性の確認)
Figure 12. Potassium iodide staining to confirm waxy kernel phenotype in PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize
 - b. Other trait changes (その他の特性の変化)

Table 2. Select agronomic characteristics of PH1V69 CRISPR-Cas9 waxy maize

6. References (引用した文献)

※ 括弧内の日本語は参考として記載したものであり、オリジナルは英語である。

資料2 育成図及び資料1を補足する図表

- 図1 PH1V69 CRISPR-Cas9ワキシートウモロコシの育成図
- 図2 PH1V69 CRISPR-Cas9 ワキシートウモロコシにおける *Wx1* 遺伝子の欠失
- 図3 想定される接合部位へのNGSリードのアライメント
- 図4 プラスミド由来の核酸の残存の定量PCR法による確認に用いたプライマー及びプローブの位置
- 図5 プラスミド由来の核酸の残存の定量PCR法による確認に用いたプライマー及びプローブの位置 (続き)
- 図6 プラスミド1及び2由来の核酸の残存のSbS分析による確認
- 図7 プラスミド3及び4由来の核酸の残存のSbS分析による確認
- 図8 プラスミド5及び6由来の核酸の残存のSbS分析による確認
- 図9 想定されるCR8-1配列へのNGSリードのアライメント
- 表1 BC₀世代における定量PCR法によるプラスミド由来DNAの残存の確認結果
- 表2 PH1V69系統におけるガイドRNA CR4及びCR8の標的配列及び類似配列
- 表3 PH1V69 CRISPR Cas9 ワキシートウモロコシの農業形質の確認

資料3 SbS分析の概要

参考文献

- Brink, K., Anitha, S., Beatty, M., Anderson, J.A., Lyon, M., Weaver, J., and Dietrich, N. (2019). Comparison of Southern-by-Sequencing (SbSTM) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. *Journal of Regulatory Science*. 7: 1-14.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (2003). Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27. ENV/JM/MONO 11. (<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815758.pdf>) [Accessed Feb. 25 2014].
- Wych, R.D. (1988). Production of hybrid seed corn. Pages 565-607 In G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.), *Corn and Corn Improvement* (3rd ed.). Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy, Inc.
- Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddelloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *The Plant Genome*. 8: 1-15.
- 柿本 陽一, 山田 実. (2001). トウモロコシの起源と特性. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 菊池 一徳. (1987). トウモロコシの生産と利用. 光琳. 東京.

- 後藤 秀俊, 黒川 俊二, 笠井 美恵子, 福田 美雪, 高橋 靖幸, 井上 公一, 中井 秀一, 山根 精一郎, 津田 麻衣, 大澤 良. (2018). 遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察. 育種学研究. 20(2):105-114.
- 瀧澤 康孝. (2001). 子実用トウモロコシの栽培. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 千藤 茂行. (2001). トウモロコシの品種生態. IV 採取. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 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.
- 中村 茂文. (2001). 生育のステージと生理, 生態. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.
- 山田 実. (2001). トウモロコシの起源と特性. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化協会. 東京.