

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

半矮性トウモロコシ MON94804 系統

**令和 6 年 9 月 25 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
5	III 審議内容	3
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
	（1）遺伝的素材に関する事項	3
	（2）家畜等の安全な飼養経験に関する事項	3
	（3）飼料の構成成分等に関する事項	4
10	（4）既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
	3 宿主に関する事項	4
	（1）学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	4
	（2）遺伝的先祖に関する事項	4
15	（3）有害生理活性物質の生産に関する事項	4
	（4）寄生性及び定着性に関する事項	5
	（5）ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
	（6）自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	5
	（7）有性生殖周期及び交雑性に関する事項	5
20	（8）飼料に利用された歴史に関する事項	5
	（9）飼料の安全な利用に関する事項	5
	（10）生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	5
	（11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
	4 ベクターに関する事項	6
25	（1）名称及び由来に関する事項	6
	（2）性質に関する事項	6
	（3）薬剤耐性に関する事項	6
	（4）伝達性に関する事項	6
	（5）宿主依存性に関する事項	6
30	（6）発現ベクターの作成方法に関する事項	6
	（7）発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	7
	5 挿入遺伝子に関する事項	7

	(1) 供与体に関する事項.....	7
	(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項.....	10
35	(3) 構造に関する事項.....	10
	(4) 性質に関する事項.....	10
	(5) 純度に関する事項.....	11
	(6) コピー数に関する事項.....	11
	(7) 安定性に関する事項.....	11
40	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	12
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	12
	(10) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項.....	12
	6 組換え体に関する事項.....	12
45	(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項.....	12
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	12
	(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項.....	13
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	13
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	13
50	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	14
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	14
	(8) 不活化法に関する事項.....	14
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	14
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	14
55	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	14
	7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項.....	15
	IV 審議結果.....	15
	V 参考文献及び参考資料.....	16

「半矮性トウモロコシ MON94804 系統」に係る安全性確認

I はじめに

65 半矮性トウモロコシ MON94804 系統（以下「MON94804 系統」という。）について、令和 5 年 10 月 3 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

70 飼料名：半矮性トウモロコシ MON94804 系統
性 質：半矮性（短稈）
申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社（日本）
開発者：バイエルグループ（米国）

75 MON94804系統は、トウモロコシのデント種HCL301系統に、トウモロコシ内在性のジベレリン20酸化酵素遺伝子（*ZmGA20ox3*及び*ZmGA20ox5*）を標的とするように設計された逆方向反復配列を発現する *GA20ox_SUP* 抑制カセットを導入し作成された。標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現抑制により、茎のジベレリン含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して、節間が狭まり、その結果、稈長が短
80 くなる。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

85 宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ（*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Ittis）のデント種 HCL301 系統である。

MON94804 系統に導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットに存在する *GA20ox_SUP*配列は、トウモロコシ（*Z. mays*）の *GA20ox3*遺伝子及び *GA20ox5* 遺伝子のコード配列（Song et al., 2011）に由来する 21 塩基長配列及びその逆方向反復配列、並びにイネ（*Oryza sativa*）由来の 3 つの Osa-miR1425 フラグメント（Lacombe et al., 2008）により構成されている配列である。

95 *GA20ox_SUP*抑制カセットはトウモロコシ内在性のジベレリン 20 酸化酵素遺伝子（*ZmGA20ox3* 及び *ZmGA20ox5*）を標的とするように設計された逆方向反復配列を発現する。この抑制カセットから発現する逆方向反復配列をもつ転写産物（以下「*GA20ox_SUP* RNA」とする）は、RNA 干渉（RNAi）機構により認識され、標的の *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する。この抑制により、茎のジベレリン含有量が低下し、従来トウモロコシと比較して、節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。

100 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるトウモロコシ（デント種）の主な利用は飼料用であり、様々な家畜

等に広く利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

105 MON94804 系統及び非組換えトウモロコシの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

110 MON94804 系統は、既存のトウモロコシと使用方法に相違はない。

以上(1)～(4)より、MON94804 系統の飼料としての安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

115 MON94804 系統は、半矮性(短稈)という特性により、強風による倒伏被害の軽減が期待できる。また、従来のトウモロコシ栽培では、稈長が農業機械の噴霧器の高さに達した後に農業機械が畑に入ると植物体を傷つける可能性があるため、生育中期以降に入ることにはできない。しかし、短稈の MON94804 系統を使用する場合、生育中後期においても農業機械を使用できるため、生育段階や病虫害の発生状況に応じて、
120 肥料や農薬を正確に施用することが可能になる。

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

125 宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ (*Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) の非組換え品種 HCL301 のデント種である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

130 トウモロコシの遺伝的先祖は *Zea* 属のテオシント (*Z. mays* ssp. *Mexicana*) で、人為的選抜を経て栽培型化されたと言われている (OECD, 2003)。原産地は、メキシコ、中米又は南米等と考えられている (OECD, 2003)。紀元前 5000 年頃のトウモロコシ野生種の穂軸と考えられる遺物が、メキシコのテワカン溪谷の洞窟住居跡で発見されている。その後、紀元前 3400 年頃までに、栽培化したトウモロコシが現れたと考えられている (戸澤, 2005)。

135 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

140 トウモロコシには、家畜等の健康に悪影響を与える毒性物質の産生性は知られていない。抗栄養素として、フィチン酸やラフィノースが知られている (OECD, 2002)。トウモロコシでは、リンの 60~75%がフィチン酸塩として存在している。そのため、非反芻動物ではトウモロコシ中のリンは極めて吸収されにくい (OECD, 2002)。ラフィノースは低分子量の炭水化物で、腸内でガス化し、腹部を膨満させる原因物質である (OECD, 2002)。トリプシンインヒビターは、たん白質分解酵素阻害物質であり、摂取したたん白質の消化を阻害することが知られているが

(OECD, 2012)、トウモロコシにおいては含有量が低く、栄養学的に問題にならないとされている (OECD, 2002)。

145

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

150

トウモロコシには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害（モザイク病、萎凋細菌病、茎腐病等）が知られているが(OECD, 2003)、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。また、植物病原体の *Fusarium spp.* や、植物体を汚染する糸状菌の *Aspergillus flavus* 等により生産されるカビ毒が家畜等へ悪影響を及ぼすことが知られているが、組換え体の作出には、このような汚染された宿主を用いることはない。なお、組換え体の作出においては、培養過程での汚染防止策が確立されており、再生中の植物や幼植物体は無菌的に維持されている。

155

(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

160

トウモロコシは栽培作物であり、雑草性はないと考えられる。なお、我が国においても自生するとの報告はない。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

165

トウモロコシは種子繁殖する一年生のイネ科植物である(OECD, 2003)。多くの品種では、風媒による他家受粉が行われる。トウモロコシの近縁植物として、テオシント (*Zea* 属) 及びトリプサカム属 (*Tripsacum* 属) があるが、テオシントは我が国において自生するとの報告はなく、またトリプサカムとトウモロコシの交雑は非常に困難であることが知られている (OECD, 2003)。従って、我が国においてはトウモロコシとの交雑はないと考えられる。

170

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

トウモロコシは、長い間飼料利用されてきた歴史がある。日本においては、明治時代にデント種及びフリント種が導入され、その後、飼料用、子実用及び生食用として幅広く利用されている。

175

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

トウモロコシは、子実、サイレージ及び青刈り等が、飼料として安全に利用されている。

180

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

トウモロコシは成長点が地上に出た 5～7 葉期に 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)。また、種子の休眠性は低い (CFIA, 1994)。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

185 温多湿下では短い (戸澤, 2005)。雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌
穂から脱粒し散布される可能性は低く、種子の拡散には人間の仲介が必要である
(OECD, 2003)。仮に、自生したとしても、鍬や感受性を示す除草剤による物理的
又は化学的な方法により防除することができる (OECD, 2003)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

190 トウモロコシの近縁種としてテオシント (*Zea* 属) 及びトリプサカム属
(*Tripsacum* 属) があるが、これら近縁種において有害生理活性物質の産生性が
あるという報告はない。

4 ベクターに関する事項

195 (1) 名称及び由来に関する事項

MON94804 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMAP527892 は、
Escherichia coli 由来のプラスミド pBR322 及び RK2などを基に作成された。

(2) 性質に関する事項

200 導入用プラスミド PV-ZMAP527892 の塩基数、全塩基配列、制限酵素切断部位、
構成要素、その由来及び機能は明らかになっており(参考資料 1)、既知の有害なた
ん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

205 導入用プラスミド PV-ZMAP527892 の外骨格領域には、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目的でアミノグリコシド改変酵素 3''(9)-*O*-ス
クレオチジルトランスフェラーゼをコードするトランスポゾン Tn7由来の *aadA*が
含まれており、*E. coli*及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして利用され
た。

210

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMAP527892 には伝達を可能とする配列は含まれていな
い。

215 (5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMAP527892 には、① *Rhizobium radiobacter*
(*Agrobacterium tumefaciens*) に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori V*、
② *E. coli* に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* が組み込まれてい
る。しかし、これらの領域により導入用プラスミド PV-ZMAP527892 が、植物や
家畜等で増殖することはできない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON94804
220 系統中には、これらの領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認さ
れている。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

225 導入用プラスミド PV-ZMAP527892(参考資料 1)は、*E. coli* 由来のプラスミド
pBR322 及び RK2 などを基に作成されており、*GA20ox_SUP* 抑制カセット及び
230 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域を有している。

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

230 *GA20ox_SUP*抑制カセット及び *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領
域をもった導入用プラスミド PV-ZMAP527892 を、アグロバクテリウム法により
宿主の成熟胚に導入することにより作出された。この T-DNA 領域は、導入を促す
ための右側境界領域と左側境界領域を有する。なお、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセッ
トは、形質転換の際の選抜マーカーとして使用されたが、MON94804 系統の育成
235 過程で取り除かれている。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

240 以下の表に、導入された遺伝子の名称及びその由来を示す。

表 1 MON94804 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来	機能
T-DNA 領域		
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)</i>	T DNA を伝達する際に利用される左側境界 配列を含む (Barker et al., 1983)。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1	<i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコン ビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
P ² - <i>Ract1</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	イネアクチン 1 たん白質をコードしている act1 遺伝子のプロモーター及びリーダー (McElroy et al., 1990)。植物細胞内での恒常 的な転写を誘導する。
TS ⁴ - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成 酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域 をコードしている ShkG 遺伝子のターゲティ ング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的たん白質を葉緑体へと輸送す る。

表1 MON94804 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能
(つづき)

構成要素	由来	機能
CS ⁵ - <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
T ⁶ - <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi	NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1	<i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
P- <i>RTBV-1</i>	イネツングロ桿菌状ウイルス (RTBV)	プロモーター及びリーダーで維管束の師部組織 (Yin and Beachy, 1995) 及びトウモロコシの節間において優先的に転写を誘導する (Paciorek et al., 2022)。なお、 <i>RTBV-1</i> プロモーターは野生型 <i>RTBV</i> の ORF4 の後半半分を含むが、ORF4 の開始アミノ酸であるメチオニンは含まない。したがって、 <i>RTBV-1</i> プロモーターからたん白質が発現することはないと考えられる。
I- <i>Hsp70</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	熱ショックたん白質 (HSP70) をコードする <i>hsp70</i> 遺伝子のイントロン及びその近傍領域に存在するエクソン配列の一部 (Rochester et al., 1986)。遺伝子発現の制御に関わり、植物における発現を高める (Brown and Santino, 1997)。
<i>GA20ox_SUP</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)、イネ (<i>O. sativa</i>)	ジベレリン 20 酸化酵素 3 及び 5 をコードするトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の <i>GA20ox3</i> 遺伝子及び <i>GA20ox5</i> 遺伝子のコード配列 (Song et al., 2011) に由来する 21 塩基長配列及びその逆方向反復配列、並びに <i>GA20ox_SUP</i> の primary micro RNA (pri-miRNA) の基本骨格構造となるイネ (<i>O. sativa</i>) 由来の 3 つの Osa-miR1425 フラグメント (Lacombe et al., 2008) により構成されている配列であり、 <i>GA20ox_SUP</i> 抑制カセットの一部を形成する

表1 MON94804 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能 (つづき)

		(GenBank accession: OL473856)。
T- <i>GST43</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	複数の 3'末端非翻訳領域の配列を基に作製された 3'末端非翻訳領域 (To et al., 2021)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域 (MON94804 系統には存在しない)		
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7	3''(9)- <i>O</i> -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、コード配列及び 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。
OR ⁷ - <i>ori</i> - <i>pBR322</i>	pBR322	複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E.coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
OR- <i>ori V</i>	広宿主域プラスミド RK2	複製開始領域。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。

- 245 1 B-Border (境界配列)
2 P-Promoter (プロモーター)
3 I-Intron (イントロン)
4 TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)
5 CS-Coding Sequence (コード配列)
250 6 T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)
7 OR-Origin of Replication (複製開始領域)
* T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット (P-*Ract1*、I-*Ract1*、TS-*CTP2*、CS-*cp4 epsps*、T-*nos* 及び *loxP* 配列の 1 つ) は、MON94804 系統には存在しない。なお、MON94804 系統に存在する構成要素のみを、参考資料 2 の Appendix Table 2 (p42)
255 に示している。

② 安全性に関する事項

260 トウモロコシは食品及び飼料としての長い使用の歴史を有し、主食として供されている重要な作物である。また、イネは食品及び飼料としての長い使用の歴史を有し、世界人口のおよそ半数以上に主食として供されている重要な作物である。

以上のことから、これらの供与体は家畜等の健康に悪影響を与えるものではないと考えられる。

265 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

挿入遺伝子の宿主への導入は、導入用プラスミド PV-ZMAP527892 を用いてアグロバクテリウム法により行った。まず、宿主 HCL301 系統の成熟胚を、導入用プラスミド PV-ZMAP527892 を含むアグロバクテリウムと共存培養することにより形質転換を行った。その後、選抜マーカーカセットを含む形質転換個体を R₀ 個体として選抜し、続いて T-DNA をヘミで有し外側骨格領域を持たない個体を選抜し、自殖させて R₁ 世代を作出した。R₁ 世代では T-DNA をホモで有し外側骨格領域を持たない個体を選抜した。さらに R₁ 世代を自殖して得られた R₂ 世代の個体を、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統 (HCL301 Cre 系統) と交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選抜マーカーカセット及び loxP 配列の 1 つが除去された F₁ 世代を作出した。

その後、F₁ 個体を自殖して得られた F₂ 世代において、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない 1 個体を選抜した。したがって、F₃ 世代以降には Cre リコンビナーゼ発現カセットは存在しない。F₂ 世代の選抜個体を自殖して得られた F₃ 世代において、導入遺伝子をホモで有する 1 個体を選抜した。F₃ 世代の選抜個体を自殖し、F₄ 世代を得た。こうして得られた F₄ 個体の後代を詳細な導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

285 *GA20ox_SUP* 抑制カセットはイネツングロ桿状ウイルス (RTBV) 由来の *RTBV-1* プロモーターが、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットはイネ (*O. sativa*) 由来の *Ract1* プロモーターが使用されている。

② ターミネーターに関する事項

290 *GA20ox_SUP* 抑制カセットはトウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *GST43* ターミネーターが、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) pTi 由来の *nos* ターミネーターが使用されている。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

295 導入用プラスミド PV-ZMAP527892 の各構成要素の機能は既に明らかになっており (表 1)、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

300 MON94804 系統に導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットは、*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA を産生する。*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA は、RNAi 機構を通じて、標的のトウモロコシ内在性のジベレリン 20 酸化酵素遺伝子 (*ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子) の発現を抑制する。この抑制により、茎における活性型

ジベレリン含有量が低下し、茎の節間における表皮細胞と柔細胞の縦幅が減少することで、節間が狭まり、その結果、稈長が短くなる。

305 また、茎の節間に加えて、葉においても活性型ジベレリン含有量の低下が認められており、葉幅がわずかに増加し、葉長が短くなっていたが、葉幅及び葉長の変化は総葉面積に影響を与えないことが確認されている。

(5) 純度に関する事項

310 塩基配列解析により、T-DNA 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している（参考資料 1）。

(6) コピー数に関する事項

315 MON94804 系統に導入された T-DNA 領域（導入遺伝子）の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、並びに導入遺伝子及びその近傍配列を確認するために、次世代シーケンス（NGS）解析並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した。さらに、MON94804 系統の導入遺伝子挿入部位をトウモロコシのゲノムデータベースと照合し、導入遺伝子がトウモロコシ内在性の既知の遺伝子を破壊していないかどうかを確認した（参考資料 2、参考資料 4）。

NGS 解析の結果、MON94804 系統に導入遺伝子は、核ゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピー導入されていることが確認された。また、ベクター由来の非意図的な配列が存在しないことも確認された。

325 導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を行った結果、導入遺伝子及びその近傍配列が決定され、導入遺伝子と導入用プラスミド PV-ZMAP527892 の T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることも確認された。また、MON94804 系統の導入遺伝子挿入部位において、トウモロコシゲノム内在性配列に 41 bp の欠失が認められた。

330 近傍配列をトウモロコシのゲノムデータベースの塩基配列と照合した結果、導入遺伝子の挿入によりトウモロコシ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことが示された。

(7) 安定性に関する事項

335 MON94804 系統に導入された遺伝子の後代における安定性を確認するため、5 世代から抽出したゲノム DNA を用いて NGS 解析を行った。その結果、導入遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された。

340 複数世代にわたる *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物（*GA20ox_SUP* の *pri-miRNA* 及び成熟 *miRNA*）の発現の安定性を確認するため、5 世代並びに対照の非組換えトウモロコシから採取した葉についてノーザンブロットを行った。その結果、*GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物は安定して後代で発現していることが示された。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

345 MON94804 系統における *GA20ox_SUP* 抑制カセットの転写産物
(*GA20ox_SUP* の pri-miRNA 及び成熟 miRNA) の発現量を、葉、根、茎、地上
部及び穀粒を用いて半定量的ノーザンブロットにより測定した(参考資料 6)。その
350 結果、葉、根、茎及び地上部において *GA20ox_SUP* の pri-miRNA のサイズと予
想された約 0.9 kb のバンド及び *GA20ox_SUP* の成熟 miRNA のサイズと予想され
た約 21 塩基のバンドが検出された。一方、穀粒においては、約 0.9 kb のバンドは
検出されず、約 21 塩基のバンドのみ確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

355 導入用プラスミド PV-ZMAP527892 には、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トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素
3''(9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (AAD) の細菌プロモーター、コード
配列及び 3'末端非翻訳領域を含む *aadA* 遺伝子 (Fling et al., 1985) が *E. coli* 及び
アグロバクテリウム中での選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している。な
360 お、MON94804 系統中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、NGS 解析によ
り確認されている。

(10) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

365 MON94804 系統の導入遺伝子と 5'及び 3'末端近傍配列の両境界領域におけるオ
ープンリーディングフレーム (ORF) を調べるため、6 フレームで ORF を検索し
た。その結果 12 個の ORF が検出されたが、これら ORF について、既知の毒性たん
白質及び有害な生理活性たん白質との構造相同性は認められなかった (参考資料
7)。

370 また、導入遺伝子領域における ORF を調べるため、6 フレームで ORF を検索し
たところ、TOX_2022 による検索では検出されなかったが、PRT_2022 を用いた導
入遺伝子の 6 つのフレームに対する相同性検索の結果、フレーム 2 において、イネ
ツングロ桿状ウイルス (RTBV) の ORF P46 との間に *E*-score が 1×10^{-5} 以下で相
同性を示す配列が検出された (参考資料 8)。しかしながら、フレーム 2 に検出さ
れたアライメントは遺伝子発現カセットの構成要素自身の配列 (*RTBV-1* プロモー
375 ター) であり、有害な生理活性を呈する可能性を示唆するものではなかった。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

380 MON94804 系統に導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される
GA20ox_SUP RNA により、半矮性の特性が付与されている。この点を除けば、
MON94804 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、飼
料としての利用方法も従来と変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

385 MON94804 系統に導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットから産生される
GA20ox_SUP の成熟 miRNA については、miRNA を含む RNA が毒性をもつとい
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
品医薬品局（FDA）により GRAS (generally recognized as safe) の認定を受けて
390 RNAi 機構によって *ZmGA20ox3* 遺伝子及び *ZmGA20ox5* 遺伝子の発現を抑制する
目的で導入されたものであり、当該抑制カセットから新たなたん白質が産生され
るとは考えにくい。

したがって、*GA20ox_SUP*抑制カセットについて毒性の評価は行わなかった。

395 (3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

上述の通り、MON94804 系統に導入された *GA20ox_SUP* 抑制カセットから新
たなたん白質が産生されるとは考えにくいことから、物理化学的処理に対する感
受性の試験を行っていない。

400 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

MON94804 系統は、*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA によりジベレリン生合成経路
の酵素遺伝子であるトウモロコシ内在性の遺伝子発現を抑制することで節間や稈長
が短くなる。このため、既存のジベレリン生合成経路に影響を与える可能性が考え
られたが、①栄養組織における既存のジベレリン生合成経路の代謝産物の量が一時
405 的に増減する可能性はあるが、新規の代謝産物が生じるものではないこと、②ジベ
レリン生合成経路における影響も限定的、部分的、組織特異的な上、活性型ジベ
レリンの含有量の変動幅も従来トウモロコシの変動幅の範囲内であると考えられるこ
と、及び③MON94804 系統の穀粒及び地上部の構成成分は、従来トウモロコシ
品種と同等であることから、*GA20ox_SUP* の成熟 miRNA の発現は MON94804 系
410 統の代謝経路に大きな影響を及ぼすものではないと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON94804 系統及び宿主の非組換えトウモロコシの穀粒及び地上部について、
主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び有害生
415 理活性物質の分析を行った(参考資料 10)ところ、統計学的有意差が認められたも
のがあったが、MON94804 系統の平均値はいずれも AFSI データベースのデント
種の範囲内に収まっており、これまで安全に摂取されている従来トウモロコシの
変動の範囲内であった。これらの相違が安全性に影響を与えているとは考えられ
ない。

420 また、MON94804 系統の栄養組織において、活性型ジベレリン含有量が低下す
ることから、活性型ジベレリン含有量の変化により影響を受ける可能性がある成
分について調査した結果、活性型ジベレリン含有量に影響を受ける可能性がある
成分として、ADF、NDF、TDF、ADL を含む細胞壁残渣が挙げられた (Voorend
et al., 2016)。分析の結果、活性型ジベレリン含有量に影響を受ける可能性がある
425 成分として特定された細胞壁残渣の項目に統計学的有意差が認められるものがあ

430 ったが、MON94804 系統の平均値はいずれも AFSI データベースのデント種の範
435 囲内若しくは同じほ場で栽培された従来商業品種の分析値から計算された許容範
囲 (99%T.I.) に収まっており、これまで安全に摂取されている従来トウモロコシ
の変動の範囲内であった。以上のことから、MON94804 系統の活性型ジベレリン
含有量に影響を受ける可能性がある成分についても、従来のトウモロコシ品種と
同等であることが示された。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

435 これまでに実施したほ場試験において、MON94804 系統と非組換えトウモロコ
シとの間に、外界における生存及び増殖能力の差異は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

440 MON94804 系統と非組換えトウモロコシにおいて、生存及び増殖能力の制限要
因に関しても変わりはない。

(8) 不活化法に関する事項

445 MON94804 系統も従来のトウモロコシと同様に、物理的防除（耕起）や化学的
防除（感受性を示す除草剤の使用）など、トウモロコシを枯死させる従来の方法
で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

表 2 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
カナダ	CFIA 認可 (2024 年 2 月)	HC 認可 (2024 年 2 月)	CFIA 認可 (2024 年 2 月)
米国	FDA 申請中 (2023 年 1 月)	FDA 申請中 (2023 年 1 月)	USDA 評価済 (規制対象外) (2023 年 6 月)
欧州	EFSA 申請中 (2023 年 2 月)	EFSA 申請中 (2023 年 2 月)	—
オーストラ リア・ニュー ジーランド	—	FSANZ 申請中 (2023 年 8 月)	—

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

450 MON94804 系統の栽培方法は従来のトウモロコシと相違ない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

従来のトウモロコシと相違はない。

- 455 7 2 から 6 までの掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項該当しない。

IV 審議結果

- 460 半矮性トウモロコシ（MON94804 系統）について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 465 Achard, P. and P. Genschik. 2009. Releasing the brakes of plant growth: How GAs shutdown DELLA proteins. *Journal of Experimental Botany* 60: 1085-1092.
- 470 AFSI. 2020. Crop Composition Database, Version 8.0. Agriculture & Food Systems Institute, Washington, D.C. . www.cropcomposition.org [Accessed January 4, 2020].
- Allen, E., Z. Xie, A.M. Gustafson and J.C. Carrington. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- 475 Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 480 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.
- Bensen, R.J., G.S. Johal, V.C. Crane, J.T. Tossberg, P.S. Schnable, R.B. Meeley and S.P. Briggs. 1995. Cloning and characterization of the maize *Anl* gene. *The Plant Cell* 7: 75-84.
- 485 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- 490 Binenbaum, J., R. Weinstain and E. Shani. 2018. Gibberellin localization and transport in plants. *Trends in Plant Science* 23: 410-421.
- Borges, F. and R.A. Martienssen. 2015. The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 16: 727-741.
- 495 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 500 Cade, R., K. Burgin, K. Schilling, T.-J. Lee, P. Ngam, N. Devitt and D. Fajardo. 2018. Evaluation of whole genome sequencing and an insertion site characterization method for molecular characterization of GM maize. *Journal of Regulatory Science* 6(1):1-14.
- Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655.
- Cassani, E., E. Bertolini, F. Cerino Badone, M. Landoni, D. Gavina, A. Sirizzotti and R. Pilu. 2009.

- 505 Characterization of the first dominant dwarf maize mutant carrying a single amino acid insertion in the VHYNP domain of the *dwarf8* gene. *Molecular Breeding* 24: 375-385.
- CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- 510 Chen, Y., M. Hou, L. Liu, S. Wu, Y. Shen, K. Ishiyama, M. Kobayashi, D.R. McCarty and B.-C. Tan. 2014. The maize *DWARF1* encodes a gibberellin 3-oxidase and is dual localized to the nucleus and cytosol. *Plant Physiology* 166: 2028-2039.
- 515 Chen, Z., Y. Liu, Y. Yin, Q. Liu, N. Li, X. Liu, X. Li, C. Guo and D. Hao. 2019. Development of dwarfish and yield-effective GM maize through passivation of bioactive gibberellin. *Transgenic Research* 28: 589-599.
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: 520 Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- FAO-WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology, report of joint FAO/WHO consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- 525 Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998. 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 530 encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression 535 of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- Fujioka, S., H. Yamane, C.R. Spray, M. Katsumi, B.O. Phinney, P. Gaskin, J. MacMillan and N. Takahashi. 1988. The dominant non-gibberellin-responding dwarf mutant (*D8*) of maize accumulates 540 native gibberellins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 9031-9035.
- Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.
- 545

- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- 550 Hirano, K., K. Aya, T. Hobo, H. Sakakibara, M. Kojima, R.A. Shim, Y. Hasegawa, M. Ueguchi-Tanaka and M. Matsuoka. 2008. Comprehensive transcriptome analysis of phytohormone biosynthesis and signaling genes in microspore/pollen and tapetum of rice. *Plant and Cell Physiology* 49: 1429-1450.
- 555 Huang, J., D. Tang, Y. Shen, B. Qin, L. Hong, A. You, M. Li, X. Wang, H. Yu, M. Gu and Z. Cheng. 2010. Activation of gibberellin 2-oxidase 6 decreases active gibberellin levels and creates a dominant semi-dwarf phenotype in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Genetics and Genomics* 37: 23-36.
- 560 Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel and B. Bartel. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
- 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.
- 565 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- 570 Lacombe, S., H. Nagasaki, C. Santi, D. Duval, B. Piégu, M. Bangratz, J.-C. Breitler, E. Guiderdoni, C. Brugidou, J. Hirsch, X. Cao, C. Brice, O. Panaud, W.M. Karlowski, Y. Sato and M. Echeverria. 2008. Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity on the genomic organisation and expression of miRNA genes in rice. *BMC Plant Biology* 8: 123.
- 575 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
- 580 Liu, C., S. Zheng, J. Gui, C. Fu, H. Yu, D. Song, J. Shen, P. Qin, X. Liu, B. Han, Y. Yang and L. Li. 2018. *Shortened basal internodes* encodes a gibberellin 2-oxidase and contributes to lodging resistance in rice. *Molecular Plant* 11: 288-299.
- Lorenz, R., S.H. Bernhart, C. Höner zu Siederdissen, H. Tafer, C. Flamm, P.F. Stadler and I.L. Hofacker. 2011. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* 6: 26.
- 585 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.

590 Murofushi, N., I. Honda, R. Hirasawa, I. Yamaguchi, N. Takahashi and B.O. Phinney. 1991. Gibberellins from the seed, tassel, cob and silk of maize. *Agricultural and Biological Chemistry* 55: 435-439.

Nelissen, H., B. Rymen, Y. Jikumaru, K. Demuynck, M. Van Lijsebettens, Y. Kamiya, D. Inzé and G.T.S. Beemster. 2012. A local maximum in gibberellin levels regulates maize leaf growth by spatial control of cell division. *Current Biology* 22: 1183-1187.

595 Nelissen, H., X.-H. Sun, B. Rymen, Y. Jikumaru, M. Kojima, Y. Takebayashi, R. Abbeloos, K. Demuynck, V. Storme, M. Vuylsteke, J. De Block, D. Herman, F. Coppens, S. Maere, Y. Kamiya, H. Sakakibara, G.T.S. Beemster and D. Inzé. 2018. The reduction in maize leaf growth under mild drought affects the transition between cell division and cell expansion and cannot be restored by elevated gibberellic acid levels. *Plant Biotechnology Journal* 16: 615-627.

600 OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2002)25. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 6. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

605 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 for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

610 OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, anti-nutrients, toxicants and allergens. ENV/JM/MONO(2012)24. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

615 Paciorek, T., B.J. Chiapelli, J.Y. Wang, M. Paciorek, H. Yang, A. Sant, D.L. Val, J. Boddu, K. Liu, C. Gu, L.F. Brzostowski, H. Wang, E.M. Allen, C.R. Dietrich, K.M. Gillespie, J. Edwards, A. Goldshmidt, A. Neelam and T.L. Slewinski. 2022. Targeted suppression of gibberellin biosynthetic genes *ZmGA20ox3* and *ZmGA20ox5* produces a short stature maize ideotype. *Plant Biotechnology Journal* 20: 1140-1153.

620 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.

625 Phinney, B.O. 1985. Gibberellin A₁ dwarfism and shoot elongation in higher plants. *Biologia*

- Plantarum 27: 172-179.
- 630 Portwood, J.L., M.R. Woodhouse, E.K. Cannon, J.M. Gardiner, L.C. Harper, M.L. Schaeffer, J.R. Walsh, T.Z. Sen, K.T. Cho, D.A. Schott, B.L. Braun, M. Dietze, B. Dunfee, C.G. Elsik, N. Manchanda, E. Coe, M. Sachs, P. Stinard, J. Tolbert, S. Zimmerman and C.M. Andorf. 2019. MaizeGDB 2018: The maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Research* 47: D1146-D1154.
- 635 Reynolds, A., D. Leake, Q. Boese, S. Scaringe, W.S. Marshall and A. Khvorova. 2004. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 22: 326-330.
- Riordan, S.G. and T. Geng. 2022. Determination of Tolerance Intervals of Acid Detergent Lignin From Compositional Analyses of Maize Grain and Forage from Conventional Maize Grown in the United States in 2020 (Site Codes: IARL, ILMN, INSH, NEYO, OHTR). Bayer Study Report SCR-2022-0261. Bayer CropScience LP, Chesterfield, Missouri.
- 640 Robinson, J.T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz and J.P. Mesirov. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29: 24-26.
- 645 Rochester, D.E., J.A. Winer and D.M. Shah. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. *EMBO Journal* 5: 451-458.
- Rood, S.B. 1985. Application of gibberellic acid to control tillering in early-maturing maize. *Canadian Journal of Plant Science* 65: 901-911.
- 650 Rood, S.B., R.I. Buzzell, L.N. Mander, D. Pearce and R.P. Pharis. 1988. Gibberellins: A phytohormonal basis for heterosis in maize. *Science* 241: 1216-1218.
- 655 Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- Salomon, S. and H. Puchta. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *The EMBO Journal* 17: 6086-6095.
- 660 Sasaki, A., M. Ashikari, M. Ueguchi-Tanaka, H. Itoh, A. Nishimura, D. Swapan, K. Ishiyama, T. Saito, M. Kobayashi, G.S. Khush, H. Kitano and M. Matsuoka. 2002. Green revolution: A mutant gibberellin-synthesis gene in rice. *Nature* 416: 701-702.
- 665 Schwab, R., S. Ossowski, M. Riester, N. Warthmann and D. Weigel. 2006. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1121-1133.
- Sekhon, R.S., H. Lin, K.L. Childs, C.N. Hansey, C.R. Buell, N. de Leon and S.M. Kaeppler. 2011.

- Genome-wide atlas of transcription during maize development. *The Plant Journal* 66: 553-563.
- 670 Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
- 675 Song, J., B. Guo, F. Song, H. Peng, Y. Yao, Y. Zhang, Q. Sun and Z. Ni. 2011. Genome-wide identification of gibberellins metabolic enzyme genes and expression profiling analysis during seed germination in maize. *Gene* 482: 34-42.
- 680 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.
- Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43: 77-90.
- 685 Tirado, S.B., C.N. Hirsch and N.M. Springer. 2021. Utilizing temporal measurements from UAVs to assess root lodging in maize and its impact on productivity. *Field Crops Research* 262: 108014.
- To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant
- 690 biotechnology traits. *Frontiers in Plant Science* 12: 712179.
- U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register*: 22984-23005.
- 695 Voorend, W., H. Nelissen, R. Vanholme, A. De Vliegher, F. Van Breusegem, W. Boerjan, I. Roldán-Ruiz, H. Muylle and D. Inzé. 2016. Overexpression of *GA20-OXIDASE1* impacts plant height, biomass allocation and saccharification efficiency in maize. *Plant Biotechnology Journal* 14: 997-1007.
- 700 Wang, Y., D. Deng, H. Ding, X. Xu, R. Zhang, S. Wang, Y. Bian, Z. Yin and Y. Chen. 2013. Gibberellin biosynthetic deficiency is responsible for maize dominant Dwarf11 (*D11*) mutant phenotype: Physiological and transcriptomic evidence. *PLoS ONE* 8: e66466.
- 705 White, C.N., W.M. Proebsting, P. Hedden and C.J. Rivin. 2000. Gibberellins and seed development in maize. I. Evidence that gibberellin/abscisic acid balance governs germination versus maturation pathways. *Plant Physiology* 122: 1081-1088.
- Winter, D., B. Vinegar, H. Nahal, R. Ammar, G.V. Wilson and N.J. Provart. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS*

710 ONE 2: e718.

Yamaguchi, I., H. Nakazawa, R. Nakagawa, Y. Suzuki, S. Kurogochi, N. Murofushi, N. Takahashi and E.W. Weiler. 1990. Identification and semi-quantification of gibberellins from the pollen and anthers of *Zea mays* by immunoassay and GC/MS. *Plant and Cell Physiology* 31: 1063-1069.

715

Yamaguchi, S. 2008. Gibberellin metabolism and its regulation. *Annual Review of Plant Biology* 59: 225-251.

720

Yin, Y. and R.N. Beachy. 1995. The regulatory regions of the rice tungro bacilliform virus promoter and interacting nuclear factors in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Journal* 7: 969-980.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

725

Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *The Plant Genome* 8: 1-15.

730

Zhang, J., X. Zhang, R. Chen, L. Yang, K. Fan, Y. Liu, G. Wang, Z. Ren and Y. Liu. 2020. Generation of transgene-free semidwarf maize plants by gene editing of gibberellin-oxidase20-3 using CRISPR/Cas9. *Frontiers in Plant Science* 11: 1048.

735

Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1157-1168.

菊池文雄 2005 半矮性 植物育種学辞典 培風館 東京

740

財務省 2023 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed June 1, 2023]

戸澤英男 2005 トウモロコシ ー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー 農山漁村文化協会 東京

745

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. Sequence of Genetic Elements in PV ZMAP527892
2. Amended from TRR0001213: Molecular Characterization of Short Stature Maize MON 94804 (M-811545-03-1)
3. プラスミド PV-ZMOO513642 の構成要素
4. Bioinformatic Evaluation of the MON 94804 Insertion Site Utilizing the ZMA_2022 Database (M-813989-01-2)
5. Demonstration of the Presence or Absence of GA20ox_SUP Transcripts in Maize Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 94804 (M-822071-01-1)
6. Analysis of Transcripts from GA20ox_SUP Suppression Cassette in OSL1, OSR1, Stalk, Forage, and Grain Maize Tissues Collected from MON 94804 (M-814626-01-1)
7. Bioinformatic Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 94804 Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-813988-01-2)
8. Amended from TRR0001535: Bioinformatic Evaluation of the T-DNA in MON 94804 Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-814383-02-1)
9. Bioinformatic Evaluation of the Potential for Degenerate Matches Between the GA20ox_SUP miRNA Sequence and the Zea Mays (Maize) Transcriptome (M-813991-01-2)
10. Compositional Analyses of Maize Grain and Forage from MON 94804 Grown in United States During the 2020 Season (M-819925-01-1)
11. Compositional Analyses of Acid Detergent Lignin of Maize Grain and Forage from MON 94804 Grown in United States During the 2020 Season (M-821368-01-1)