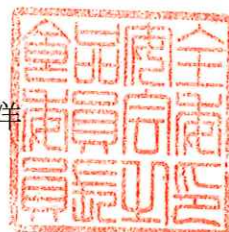




府食第769号
平成29年11月28日

厚生労働大臣
加藤 勝信 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成29年9月6日付け厚生労働省発生食0906第3号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「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MZIR098系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「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MZIR098系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

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 MZIR098 系統

2017年11月

食品安全委員会

目 次

| | 頁 |
|--|----|
| <審議の経緯> | 3 |
| <食品安全委員会委員名簿> | 3 |
| <食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿> | 3 |
| 要 約 | 3 |
| I. 評価対象食品の概要 | 5 |
| II. 食品健康影響評価 | 5 |
| 第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相 違に関する事項 | 5 |
| 1. 宿主及び導入 DNA に関する事項 | 5 |
| 2. 宿主の食経験に関する事項 | 6 |
| 3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項 | 6 |
| 4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項 ... | 6 |
| 5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品として の性質に関する事項 | 6 |
| 6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項 | 6 |
| 第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項 | 7 |
| 第 3. 宿主に関する事項 | 7 |
| 1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項 | 7 |
| 2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項 | 7 |
| 3. 有害生理活性物質の生産に関する事項 | 7 |
| 4. アレルギー誘発性に関する事項 | 7 |
| 5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.. | 7 |
| 6. 安全な摂取に関する事項 | 7 |
| 7. 近縁の植物種に関する事項 | 8 |
| 第 4. ベクターに関する事項 | 8 |
| 1. 名称及び由来に関する事項 | 8 |
| 2. 性質に関する事項 | 8 |
| 第 5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項 | 8 |
| 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 | 8 |
| 2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項 | 9 |
| 3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項 | 11 |
| 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 | 11 |
| 5. 構築された発現ベクターに関する事項 | 11 |
| 6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項 | 12 |
| 第 6. 組換え体に関する事項 | 13 |
| 1. 遺伝子導入に関する事項 | 13 |

| | |
|---|----|
| 2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項 | 15 |
| 3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項 | 15 |
| 4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項 | 16 |
| 5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項 | 17 |
| 6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項 | 18 |
| 7. 宿主との差異に関する事項 | 18 |
| 8. 諸外国における認可、食用等に関する事項 | 19 |
| 9. 栽培方法に関する事項 | 19 |
| 10. 種子の製法及び管理方法に関する事項 | 19 |
| 第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項 | 20 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価結果 | 20 |
| <参照> | 21 |

＜審議の経緯＞

- 2017年9月6日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0906第3号）、関係書類の接受
- 2017年9月12日 第665回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2017年9月29日 第164回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年10月17日 第669回食品安全委員会（報告）
- 2017年10月18日から11月16日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2017年11月22日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2017年11月28日 第675回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

＜食品安全委員会委員名簿＞

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
吉田 緑
山本 茂貴
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

| 2017年9月30日まで | | 2017年10月1日より | |
|--------------|-------|--------------|-------|
| 澤田 純一（座長） | | 中島 春紫（座長） | |
| 小関 良宏（座長代理） | | 小関 良宏（座長代理） | |
| 岡田 由美子 | 中島 春紫 | 児玉 浩明（座長代理） | |
| 橘田 和美 | 樋口 恭子 | 岡田 由美子 | 手島 玲子 |
| 児玉 浩明 | 飯 哲夫 | 橘田 和美 | 樋口 恭子 |
| 近藤 一成 | 山川 隆 | 近藤 一成 | 山川 隆 |
| 柘植 郁哉 | 和久井 信 | 鈴木 秀幸 | 吉川 信幸 |
| 手島 玲子 | | 柘植 郁哉 | |

要 約

「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 MZIR098 系統」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子 (*mcry3A* 遺伝子) 並びに *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子及び *mcry3A* 遺伝子の塩基配列を基に作製されたキメラ遺伝子である改変 *cry3.1Ab* 遺伝子 (*ecry3.1Ab* 遺伝子) を導入して作出されており、mCry3A タンパク質及び eCry3.1Ab タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。また、*Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (*pat-08*) 遺伝子を導入して作出されており、PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できるとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較の結果等について確認した結果、非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「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 MZIR098 系統」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

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
MZIR098 系統

性 質：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

申請者：シンジェンタジャパン株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and
its affiliates (スイス)

「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 MZIR098 系統」(以下「トウモロコシ MZIR098」という。)は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子 (*mcry3A* 遺伝子) 並びに *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子及び *mcry3A* 遺伝子の塩基配列を基に作製されたキメラ遺伝子である改変 *cry3.1Ab* 遺伝子 (*ecry3.1Ab* 遺伝子) を導入して作出されており、mCry3A タンパク質及び eCry3.1Ab タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。また、*Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (*pat-08*) 遺伝子を導入して作出されており PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できるとされている。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 NP2222 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

mcry3A 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* であり、*ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* である。*pat-08* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* strain Tü494 である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

mcry3A 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子は、コウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示す mCry3A タンパク質及び eCry3.1Ab タンパク質を発現する。*pat-08* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質を発現する。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシは、古くから多くの食経験があり（参照 1）、現在では世界中で食品や飼料等に広く利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 5.7~17.3%、脂質 1.4~7.8%、灰分 0.6~6.3%、炭水化物 77.4~89.7% である（参照 2）。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）に、毒性物質の産生性は知られていない。栄養阻害物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 1.6%以下、ラフィノース 0.44%以下及びトリプシンインヒビター 8.42 TIU/mg 以下である（参照 2）。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシ MZIR098 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ MZIR098 の摂取部位は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(3) 摂取量

トウモロコシ MZIR098 の摂取量は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MZIR098 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ MZIR098 は、*mcry3A* 遺伝子、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pat-08* 遺伝子を導入して作出されており、mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質

及び PAT タンパク質を発現することが、宿主との相違点である。

以上、1～6により、トウモロコシ MZIR098 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した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

トウモロコシ MZIR098 は、*mcry3A* 遺伝子、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pat-08* 遺伝子を導入して作出され、mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫及び除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できるとされている。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 NP2222 系統である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は、同属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている（参照 3）。栽培適性の異なる多くの品種が育成された結果、現在では世界的に広く栽培される作物となった（参照 1）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシは、有害生理活性物質のうち毒性物質の産生性は知られていないが、栄養阻害物質としてフィチン酸及びラフィノースを産生することが知られている（参照 4）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシの Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれる分子量 9 kDa のタンパク質及び還元可溶性タンパク質画分から得られる 50 kDa のタンパク質がアレルゲンとして作用することを示唆する報告があるが（参照 5、6）、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発食品ではない（参照 4、7、8、9）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

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が知られているが（参照 3）、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。トウモロコシは、食品分野においてコーン油及びコーンスターチ等の原料として幅広く利用されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、テオシント及びトリプサカムが知られているが(参照 3)、我が国において食用に供されることはない。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

トウモロコシ MZIR098 の作出に使用した導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域は、プラスミド pVictor に由来する。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域にはストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *aadA-03* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

mcry3A 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* であり、*ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* である。*pat-08* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* strain Tü494 である。

(2) 安全性に関する事項

mcry3A 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は土

壤微生物であり、ヒトによる食経験はないが、ヒトや動物に対する病原性は報告されていない。

pat-08 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、腐生性の土壌微生物であり、ヒトによる食経験はないが、ヒトや動物に対する病原菌ではないと考えられる（参照 10）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

（1）挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

mcry3A 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 由来の *cry3A* 遺伝子（参照 11）に、トウモロコシでの発現を高めるためのコドンの最適化を行うために改変したものである。また、標的害虫に対する殺虫活性を高めるために、野生型 Cry3A タンパク質の 155~157 番目のバリン-セリン-セリンに相当する 3 個のアミノ酸配列が、カテプシン G プロテアーゼの認識配列であるアラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニンの 4 個のアミノ酸となるように、塩基配列が改変されている（参照 12）。なお、MZIR098 トウモロコシに導入された *mcry3A* 遺伝子は、2007 年に安全性審査が終了した MIR604 トウモロコシに導入された *mcry3A* 遺伝子と同一である。

ecry3.1Ab 遺伝子は、*mcry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製されたキメラ遺伝子であり、*mcry3A* 遺伝子のドメイン I、ドメイン II 及びドメイン III の一部領域と *cry1Ab* 遺伝子のドメイン III 以降を融合することにより作製された。なお、MZIR098 トウモロコシに導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子は、2013 年に安全性審査が終了した Event5307 トウモロコシに導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子と同一である。

pat-08 遺伝子は、*S. viridochromogenes* strain Tü494 からクローニングされたホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を、植物における発現を高めるためにコドンの最適化を行い人工合成したものである。なお、*pat-08* 遺伝子は、2001 年に安全性審査が終了したトウモロコシ Bt11 系統に導入された *pat* 遺伝子の塩基配列を改変しているものだが、コードする PAT タンパク質のアミノ酸配列は同一である。

（2）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入遺伝子の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

① *mcry3A* 遺伝子

mcry3A 遺伝子がコードする mCry3A タンパク質は、従来の Cry タンパク質と同様に、標的のコウチュウ目昆虫に摂取されると、昆虫の中腸に作用し、中腸上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されている（参照

13) 。mCry3A タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認するため、データベース^aを用いて blastp 検索を行った結果、Cry タンパク質及びパラスポリタンパク質を除き、既知の毒性タンパク質は見いだせなかった (参照 14) 。パラスポリンは *in vitro* で一部のヒトがん細胞に対する細胞死誘導活性を有するが、その他のヒト及びほ乳動物細胞に対して毒性を示すという報告はない (参照 15) 。

② *ecry3.1Ab* 遺伝子

ecry3.1Ab 遺伝子がコードする eCry3.1Ab タンパク質は、mCry3A タンパク質及び Cry1Ab タンパク質から成るキメラタンパク質である。eCry3.1Ab タンパク質は従来の Cry タンパク質と同様に、標的のコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示すが (参照 13) 、中腸上皮細胞における結合部位は、mCry3A タンパク質とは異なることが示されている (参照 16) 。

eCry3.1Ab タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認するために、データベース^aを用いて blastp 検索を行った結果、Cry タンパク質及びパラスポリタンパク質を除き、既知の毒性タンパク質は見いだせなかった (参照 17) 。

③ *pat-08* 遺伝子

pat-08 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、植物の窒素代謝の過程で生成されたアンモニアを無毒化するグルタミン合成酵素を阻害する除草剤グルホシネートをアセチル化することによって、除草剤グルホシネートの阻害作用を不活化する。その結果、トウモロコシ MZIR098 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる。

PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認するために、データベース^aを用いて blastp 検索を行った結果、既知の毒性タンパク質は見いだせなかった。また、Syngenta Toxin Database を用いて検索を行った結果、細菌及び真菌由来の toxin-antitoxin (TA) system、toxin component 並びに GNAT family との相同性が見いだされた (参照 18) 。TA system に関与するタンパク質がほ乳動物細胞に毒性を示すとは考えられず (参照 19) 、これらの配列はデータベース構築に用いたキーワードでデータベースに登録されたものである。また、GCN5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) ドメインを有していたために、アセチルトランスフェラーゼである PAT と相同性を示したと考えられた。したがって、PAT タンパク質と相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 18) 。

^a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez® Protein Database (2016, March 24) 及び Syngenta Toxin Database (20,744 件の重複の無い、自社の毒性タンパク質データベース)

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 はストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA-03* 遺伝子を有するが、トウモロコシ MZIR098 には検出されないことがサザンブロット分析によって確認されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

mcry3A 遺伝子カセットのプロモーターは、トウモロコシのユビキチン遺伝子の Ubi1-18 プロモーター配列である (参照 20)。*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Cestrum yellow leaf curling virus 由来の CMP-04 プロモーター配列である (参照 21)。*pat-08* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来の 35S-04 プロモーター配列である (参照 22)。

(2) ターミネーターに関する事項

ecry3.1Ab 遺伝子発現カセット及び *pat-08* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子由来の NOS-05-01 ターミネーター配列である (参照 23)。*mcry3A* 遺伝子カセットのターミネーターは、NOS-05-01 ターミネーターの塩基配列を変更した NOS-20 ターミネーター配列である。

(3) その他

ecry3.1Ab 遺伝子発現カセットは、転写活性を高める *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子由来の NOS-02 エンハンサー配列を含む。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

mcry3A 遺伝子発現カセット、*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び *pat-08* 遺伝子発現カセットを、外骨格領域及び境界領域を有する中間ベクターに挿入することによって、導入用プラスミド pSYN17629 が作製された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

導入用プラスミド pSYN17629 の T-DNA 領域の塩基配列は明らかになって

おり、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (ORF) は含まれていない (参照 24)。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド pSYN17629 の意図する挿入領域は、右側境界領域 (RB-01-01) から左側境界領域 (LB-01-01) までの T-DNA 領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド pSYN17629 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜を通じて純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド pSYN17629 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、グルホシネート耐性をマーカーとして用いて選抜した。再分化した個体について、*mcry3A* 遺伝子、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pat-08* 遺伝子の存在並びに導入用プラスミド pSYN17629 外骨格領域の抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*aadA-03* 遺伝子) の欠如を PCR 分析にて確認した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、自殖及び既存の品種との戻し交配を行い、トウモロコシ MZIR098 が得られた。

表 1 挿入 DNA の構成要素

| 構成 DNA | 由来及び機能 |
|--------------------------------|---|
| RB-01-01 | T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域 |
| (<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子発現カセット) | |
| NOS-02 エンハンサー | <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のエンハンサー配列 転写活性を高める。 |
| CMP-04 プロモーター | Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター配列 目的遺伝子を恒常的に発現させる。 |
| <i>ecry3.1Ab</i> | <i>B. thuringiensis</i> 由来の <i>mcry3A</i> 遺伝子及び <i>cry1Ab</i> 遺伝子から作製され、eCry3.1Ab タンパク質をコードする。 |
| NOS-05-01 ターミネーター | <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子のターミネーター配列 ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。 |
| (<i>mcry3A</i> 遺伝子発現カセット) | |
| Ubi1-18 | トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来のプロモーター領域 |

| | |
|----------------------|--|
| プロモーター | 目的遺伝子を恒常的に発現させる。 |
| <i>mcry3A</i> | <i>B. thuringiensis</i> に由来する mCry3A をコードする。 <i>cry3A</i> 遺伝子に、植物の発現を高めるための塩基配列のコドンの最適化及び殺虫活性を高めるため改変をしている。 |
| NOS-20 ターミネーター | NOS-05-01 ターミネーターの塩基配列を変更したターミネーター配列 ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。 |
| (pat-08 遺伝子発現カセット) | |
| 35S-04 プロモーター | CaMV 由来のプロモーター領域 目的遺伝子を恒常的に発現させる。 |
| <i>pat-08</i> | <i>S. viridochromogenes</i> strain Tü494 に由来するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼをコードする。 植物の発現を高めるために塩基配列のコドンを最適化している。 |
| NOS-05-01 ターミネーター | <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子由来のターミネーター配列 ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。 |
| LB-01-01 | T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域 |

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

トウモロコシ MZIR098 のゲノム DNA を用い、導入遺伝子領域の PCR 分析を行い、増幅させクローニング後、塩基配列を決定した。導入用プラスミド pSYN17629 の T-DNA 領域の塩基配列と比較した結果、右側境界領域及びそれに続く 10 bp の非タンパク質コード配列並びに左側境界領域の 10 bp の欠失を除き、一致していた (参照 25)。

トウモロコシ MZIR098 に挿入された T-DNA のコピー数を確認するために、トウモロコシ MZIR098 の F1 及び F2 世代並びに非組換えトウモロコシの葉から抽出したゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を行った。その結果、トウモロコシ MZIR098 のゲノムに 1 コピーの T-DNA が挿入されていることが確認された。また、導入用プラスミド pSYN17629 の外骨格領域はトウモロコシ MZIR098 のゲノムに存在しないことが示された (参照 26)。トウモロコシ MZIR098 の挿入遺伝子の 5'末端近傍配列 (1,000 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) の塩基配列と宿主であるトウモロコシゲノム配列を比較した結果、トウモロコシ MZIR098 のトウモロコシゲノムの 24 bp の欠失を除き、一致することが確認された (参照 27)。

DNA 挿入によって宿主の内在性遺伝子が損なわれていないか否かを確認す

るために、5'末端近傍配列 (1,000 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) についてタンパク質データベース^bを用いて blastx 検索を行った。その結果、*E*-value が 10 以下の既知のタンパク質は認められなかった。したがって、トウモロコシ MZIR098 において、遺伝子導入により既知のトウモロコシ内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた (参照 28)。

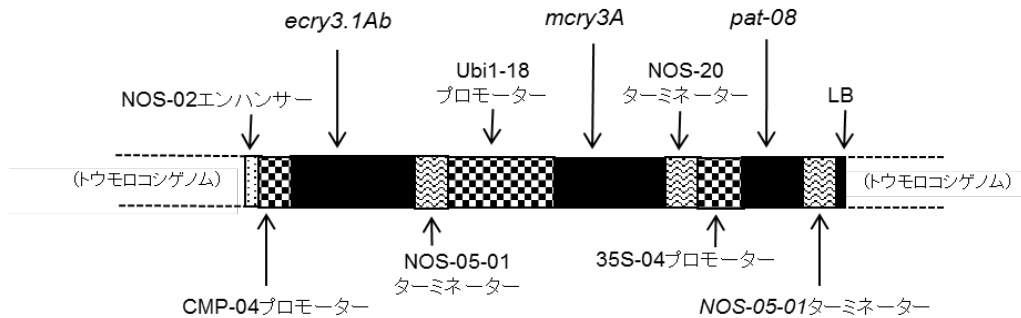


図1 トウモロコシ MZIR098 に挿入された DNA (模式図)

(2) 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

トウモロコシ MZIR098 の挿入 DNA 領域及び両近傍配列との接合部において意図しない ORF が生じていないか否かを確認するために、6 つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF が、挿入 DNA 領域で 144 個及び両近傍配列との接合部で 7 個見いだされた (参照 29、30)。これらの ORF と既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、データベースを用いて相同性検索を行った。

既知のアレルゲンとの相同性の有無の確認は、アレルゲンデータベース^cを用いて、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を有する配列及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する配列を検索した。その結果、1 つの ORF (ORF43) に、既知の 2 つのアレルゲンであるコムギ (*Triticum aestivum*) のグルテン及びグルテニン高分子量サブユニット 5 との間に、連続する 8 アミノ酸配列の一致が認められた。

グルテン及びグルテニン高分子量サブユニット 5 は、94.8%のアミノ酸が一致するホモログである。ORF43 と一致する連続する 8 アミノ酸配列は、同定されているグルテニン高分子量サブユニットの IgE 結合エピトープ (参照 31、32) と一致又は重複する配列ではなかった。また、一致が認められた連続する 8 アミノ酸配列は、低複雑度配列^d内に存在していることから、この ORF43 と

^b NCBI Non-redundant (nr) protein database (2016 February 11)

^c The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) AllergenOnline database, version 2016

^d Low complexity sequence: 繰り返しのアミノ酸配列又は極度に偏ったアミノ酸配列で構成される単調な配列

コムギの2つのアレルゲンとの間における構造的な相同性を示すとは考えにくい。したがって、ORF43により、MZIR098 トウモロコシにおいて意図しないアレルゲンが発現する可能性は低いと考えられた。

既知の毒性タンパク質との相同性検索は、NCBI Entrez® Protein Database を基に構築された毒性タンパク質データベース^eを用いて blastp にて行った。閾値を *E*-value 1×10^{-5} として検索を行った結果、1つの ORF (ORF55) が、毒性タンパク質データベース内の細菌及び真菌由来のタンパク質と相同性を示したが、PAT タンパク質と同じ読み枠の ORF であることから毒性はないと考えられた (参照 29、30)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

トウモロコシ MZIR098 の葉、根、全植物体及び穀粒について、mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析を行った。結果は表 2 のとおりである (参照 33)。

表 2 トウモロコシ MZIR098 における mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質の発現量 (単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

| 分析組織* | mCry3A タンパク質の発現量 | eCry3.1Ab タンパク質の発現量 | PAT タンパク質の発現量** |
|-------|------------------|---------------------|-----------------|
| 葉 | 2.68~100.18 | 1.10~322.84 | <LOD~12.54 |
| 根 | 5.03~88.43 | 2.04~128.79 | <LOD~3.36 |
| 全植物体 | 8.13~92.79 | 2.91~213.01 | <LOD~9.32 |
| 穀粒 | 5.77~22.38 | 0.76~4.84 | <LOD |

* 葉及び根は 6 葉期~収穫期、全植物体は 6 葉期~成熟期、穀粒は成熟期及び収穫時の値を示した。

** 葉、根、全植物体及び穀粒の検出限界値 (LOD) は、 $0.025 \mu\text{g/g}$ 乾燥重である。

3. 遺伝子産物 (タンパク質) が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日に摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 1.1 g (参照 34 : 厚生労働省 2017) を全てトウモロコシ MZIR098 に置き換えて mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ $11.13 \mu\text{g}$ 、 $2.13 \mu\text{g}$ 及び $0.03 \mu\text{g}$ 未満となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.1 g (参照 34) に占める割合はそれぞれ 1.61×10^{-7} 、3.08

^e NCBI Entrez® Protein Database からキーワードにて抽出して、毒性を示さないタンパク質を除外して構築した自社の毒性タンパクデータベース

$\times 10^{-8}$ 及び 4.34×10^{-10} 未満となる。したがって、これらが一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

mcry3A 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*、*pat-08* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* であり、いずれもアレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

Escherichia coli で発現させた mCry3A タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両分析において、試験開始後 2 分以内に消化されることが確認された（参照 35）。

E. coli で発現させた eCry3.1Ab タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に完全長タンパク質は検出されなくなり、試験開始後 15 秒以降に見られた 4~5 kDa の微弱なバンドも 10 分以内に消化されることが確認された。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 36）。

E. coli で発現させた PAT タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析において、試験開始後 1 分以内に完全長の PAT タンパク質のバンドは検出されなくなったが、約 3.5 kDa のバンドが試験開始 60 分まで認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 37）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた mCry3A タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では完全長の mCry3A タンパク質と同様の分子量の微弱なバンドが試験開始 48 時間後まで確認された。また、ウェスタンブロット分析では試験開始後 5 分以内に、完全長の mCry3A タンパク質のバンドが検出されなくなったが、分解物と考えられるバンドが試験開始 48 時間後まで確認された（参照 38）。

E. coli で発現させた eCry3A タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始 1 分後に、完全長の eCry3A タンパク質のバンドが検出されなくなった。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始 1 分後に完全長の eCry3A タンパク質のバンドが検出されなくなったが、分解物と考えられるバンドが試験開始 48 時間後まで確認された（参照 39）。

E. coli で発現させた PAT タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両分析において、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された（参照 40）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた mCry3A タンパク質及び eCry3.1Ab タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するために、ELISA 分析を行った。その結果、mCry3A タンパク質では 95°C で、eCry3.1Ab タンパク質では 65°C で 30 分間加熱処理に対して免疫反応性が失われることが確認された（参照 41、42）。

PAT タンパク質は、SDS-PAGE 分析により加熱処理で分解されないことが報告されている（参照 43）。*E. coli* で発現させた PAT タンパク質の加熱処理に対する酵素活性の感受性を調査した結果、65°C で 30 分間加熱処理により酵素活性は検出限界未満となり PAT タンパク質は加熱処理により失活することが示された（参照 44）。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項

mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^oを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列について、35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見いだされなかった（参照 45、46、47）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^oを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 45、46、47）。

上記（1）から（4）まで及び前項 3 から総合的に判断し、mCry3A タンパク質、eCry3.1Ab タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

トウモロコシ MZIR098 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のトウモロコシ MZIR098 について挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、導入遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝し

ていることが示された（参照 48）。

また、トウモロコシ MZIR098 の 5 世代の葉から抽出したゲノム DNA を用いたサザンブロット分析により、挿入遺伝子は世代間で安定していることが確認された（参照 49）。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

mCry3A タンパク質及び eCry3.1Ab タンパク質は、いずれも *B. thuringiensis* に由来する殺虫性タンパク質（Cry タンパク質）である。Cry タンパク質は、殺虫以外の機能を有することは知られていない。したがって、これらの Cry タンパク質が酵素活性を持つことはないと考えられることから、植物の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

PAT タンパク質は、グルホシネートをアセチル化することによって、グルホシネートの除草剤としての機能を失わせる。その反応は L-グルホシネートに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたトウモロコシ MZIR098 と宿主である非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、二次代謝産物及び栄養阻害物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 50）。

（1）主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維、総食物繊維（穀粒のみ）並びにデンプン（穀粒のみ））について分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、又は統計学的有意差が認められた場合であっても対照品種が示す変動内及び ILSI データベースの範囲内であった（参照 2）。

（2）ミネラル類

穀粒のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、セレン、ナトリウム及び亜鉛）及び茎葉のミネラル類（カルシウム及びリン）について分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、又は統計学的有意差が認められた場合であっても対照品種が示す変動内及び ILSI データベースの範囲内であった（参照 2）。なお、穀粒のセレン及びナトリウムは、一部又は大半の分析値が定量限界未満であったことから、統計処理は行わなかった。

（3）ビタミン類

穀粒のβ-カロテン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ナイアシン、ビタミン B₆、葉酸及びビタミンEについて分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、又は統計学的有意差が認められた場合であっても対照品種が示す変動内及び ILSI データベースの範囲内であった（参照 2）。

（4）アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸 18 種類について分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

（5）脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 10 種類について分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められないか、又は統計学的有意差が認められた場合であっても対照品種が示す変動内及び ILSI データベースの範囲内であった（参照 2）。

（6）二次代謝産物及び栄養阻害物質

穀粒のフェルラ酸、*p*-クマル酸、イノシトール、フィチン酸、トリプシンインヒビター、フルフラール及びラフィノースについて分析を行った。その結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。フルフラールについては定量限界以下であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品及び飼料としての安全性審査の申請並びに米国農務省（USDA）に対する無規制裁培のための申請が行われ、2016年4月及び2016年3月にそれぞれ安全性が確認された。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）及びカナダ食品検査庁（CFIA）に対して食品、飼料及び環境の安全性審査の申請が行われ、いずれも2016年8月に安全性が確認された。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2016年7月に安全性が確認された。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MZIR098 の栽培方法は、特定のコウチュウ目昆虫に対する防除方法及び生育期に除草剤グルホシネートを使用できることを除いて、従来のトウモロコシ（デント種）と同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ MZIR098 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ（デ

ント種)と同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「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 MZIR098 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 戸澤英男 2005 トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用— 社団法人農山漁村文化協会 東京
2. ILSI. 2014. Crop Composition Database, Version 5.0. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> (accessed October 6, 2014).
3. OECD. 2003. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 27: Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11.
4. OECD. 2002. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6: 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.
5. Pastorello, E.A., C. Pompei, V. Pravettoni, L. Farioli, A.M. Calamari, J. Scibilia, A.M. Robino, A. Conti, S. Iametti, D. Fortunato, S. Bonomi and C. Ortolani. 2003. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100° C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112: 775-783.
6. Pasini, G., B. Simonato, A. Curioni, S. Vincenzi, A. Cristaudo, B. Santucci, A.D.B. Peruffo and M. Giannattasio. 2002. IgE-mediated allergy to corn: A 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy* 57: 98-106.
7. Codex Alimentarius Commission. 1999. Draft recommendations for the labelling of foods that can cause hypersensitivity (Draft amendment to the general standard for the labelling of prepackaged foods). Alinorm 99/22, Appendix III, Section 4.2.1.4. Adopted at the Twenty-third session of the Codex Alimentarius Commission.
8. US FDA. 2006. Guidance for industry: Questions and answers regarding food allergens, including the food allergen labeling and consumer protection act of 2004 (Edition 4); Final Guidance. <http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/UCM301394.pdf> (accessed Jan 19, 2016).
9. 消費者庁. 2010. アレルギー物質を含む加工食品の表示ハンドブック <http://www.caa.go.jp/foods/pdf/syokuhin19.pdf>. (accessed Jan 19, 2016).
10. OECD. 1999. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
11. Sekar V, Thompson DV, Maroney MJ, Bookland RG, Adang MJ. 1987.

- Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7036-7040.
12. Chen E, Stacy C. 2007. Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefore. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,230,167. Washington DC: U.S. Patent Office.
 13. OECD. 2007. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 42: Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14.
 14. 補遺 2 : mCry3A: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 3. Report No. SSB-129-16 A3. (社内文書)
 15. Yamashita S, Katayama H, Saitoh H, Akao T, Park YS, Mizuki E, Ohba M, Ito A. 2005. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. *The Journal of Biochemistry* 138: 663-672.
 16. Walters FS, deFontes CM, Hart H, Warren GW, Chen JS. 2010. Lepidopteran-active variable-region sequence imparts Coleopteran activity in eCry3.1Ab, an Engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3082-3088.
 17. 補遺 3 : eCry3.1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 3. Report No. SSB-128-16 A3. (社内文書)
 18. 補遺 4 : PAT (pat): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 1. Report No. SSB-108-16 A1. (社内文書)
 19. Unterholzner SJ, Poppenberger B, Rozhon W. 2013. Toxin-antitoxin systems: biology, identification, and application. *Mobile Genetic Elements* 3: e26219.
 20. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18: 675-689.
 21. Hohn T, Stavolone L, De Haan PT, Ligon HT, Kononova M. 2007. Cestrum yellow leaf curling virus promoters. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,166,770. Washington DC: U.S. Patent Office.
 22. Odell JT, Nagy F, Chua NH. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
 23. Bevan M, Barnes WM, Chilton M-D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.

24. 補遺 1 : Plasmid pSYN17629: Plasmid Lineage Analysis and Sequence Assessment. Report No. TK0117490 A1. (社内文書)
25. 補遺 5 : Event MZIR098 Maize: Insert and Flanking Sequence Analysis. Final Report Amendment 1. Report No. TK0144270 A1. (社内文書)
26. 補遺 6 : Event MZIR098 Maize: Insert Copy Number Southern Blot Analysis. Final Report Amendment 1. Report No. TK0117497 A1. (社内文書)
27. 補遺 7 : Event MZIR098 Maize: Genomic Insertion Site Analysis. Final Report. Report No. TK0117489. (社内文書)
28. 補遺 8 : Event MZIR098 Maize: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analyses of Maize Genomic Sequences Flanking the Insert. Assessment. Report No. TK0288708. (社内文書)
29. 補遺 9 : Event MZIR098: Allergenicity and Toxicity Assessment of Hypothetical Open Reading Frames within the MZIR098 Insert Defined by Stop to Stop Codons. Assessment. Report No. SSB-139-16. (社内文書)
30. 補遺 10 : Event MZIR098: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop, Genome to Insert Junction Open Reading Frames. Assessment Amendment 1. Report No. SSB-136-16 A1. (社内文書)
31. Matsuo H, Kohno K, Niihara H, Morita E. 2005. Specific IgE determination to epitope peptides of ω -5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Journal of Immunology* 175: 8116-8122.
32. Matsuo H, Yokooji T, Taogoshi T. 2015. Common food allergens and their IgE-binding epitopes. *Allergology International* 64: 332-343.
33. 補遺 11 : Quantification of eCry3.1Ab, mCry3A, and Phosphinothricin Acetyltransferase in Event MZIR098 Maize Tissues. Assessment. Report No. TK0117462_SR_01. (社内文書)
34. 厚生労働省. 2017. 平成 27 年 国民健康・栄養調査報告. 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果. 厚生労働省. 平成 29 年 3 月
35. 補遺 14 : *In vitro* Digestibility of Modified Cry3A Protein (MCRY3A-0102 and IAPMIR604-0103) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Amended Report No. 1. Replaces Original Report Issued December 2, 2003. Report No. SSB-029-03 A1. (社内文書)
36. 補遺 15 : *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Study No. TK0028111. (社内文書)
37. 補遺 16 : *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Final Report. Report No. TK0062551. (社内文書)
38. 補遺 17 : *In vitro* Digestibility of Modified Cry3A Protein from Test Substances MCRY3A-0102 and MCRY3A-SF-0106 under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Report No. SSB-169-06. (社内文書)

39. 補遺 18 : *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1AB-0208 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Amended Report No. 1. Report No. SSB-015-09 A1. (社内文書)
40. 補遺 19 : *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Study No. TK0030220. (社内文書) .
41. 補遺 20 : Effect of Temperature on the Stability of Modified Cry3A Protein from Test Substances MCRY3A-0102 and MCRY3A-SF-0106. Report No. SSB-108-07. (社内文書)
42. 補遺 21 : Effect of Temperature on the Immunoreactivity of eCry3.1Ab Protein. Study No. TK0022186. (社内文書)
43. Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R-J, Rouan D. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41: 134-149.
44. 補遺 22 : Effect of Temperature on the Enzymatic Activity of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein. Final Report. Report No. TK0062553. (社内文書)
45. 補遺 23 : mCry3A: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-123-16. (社内文書)
46. 補遺 24 : eCry3.1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-105-16. (社内文書)
47. 補遺 25 : PAT (*pat*): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-106-16. (社内文書)
48. 補遺 26 : Event MZIR098 Maize: Mendelian Inheritance Analysis. Final Report Amendment 2. Report No. TK0117487 A2. (社内文書)
49. 補遺 27 : Event MZIR098 Maize: Genetic Stability Analysis of F₂, F₃, F₄, F₅, and F₁ Generations. Final Report Amendment 2. Report No. TK0117501 A2. (社内文書)
50. 補遺 28 : Compositional Analysis of Forage and Grain from MZIR098 Maize Treated with Trait-Specific Herbicide Grown During 2013 in the USA. Assessment Amendment 1. Report No. TK0117452 A1_SR_01. (社内文書)