

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性
トウモロコシ MON95379 系統

令和3年（2021年）10月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

<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	4
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	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	5
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	6
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	7
第 4. ベクターに関する事項	7
1. 名称及び由来に関する事項	7
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	8
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	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項	10
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	12

1. 遺伝子導入に関する事項.....	12
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.....	14
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.....	15
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.....	17
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.....	18
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.....	19
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	19
<参照>.....	20

<審議の経緯>

2021年7月14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0714第4号）、関係書類の接受

2021年7月27日 第826回食品安全委員会（要請事項説明）

2021年8月25日 第214回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年10月19日 第836回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

山本 茂貴（委員長）

浅野 哲（委員長代理 第一順位）

川西 徹（委員長代理 第二順位）

脇 昌子（委員長代理 第三順位）

香西 みどり

松永 和紀

吉田 充

<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>

中島 春紫（座長）

児玉 浩明（座長代理）

安達 玲子 近藤 一成

飯島 陽子 手島 玲子

岡田 由美子 樋口 恭子

小関 良宏 山川 隆

小野 竜一 吉川 信幸

橘田 和美

要 約

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 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* 由来の、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子を導入して作出されており、Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質を発現することで、チョウ目害虫による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、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、「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 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

(申請内容)

名称：チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 系統

性質：チョウ目害虫抵抗性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer CropScience LP (ドイツ)

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 系統」(以下「トウモロコシ MON95379」という。)は、*Bacillus thuringiensis* 由来の、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子を導入して作出されており、*Cry1B.868* タンパク質及び改変 *Cry1Da* タンパク質を発現することで、チョウ目害虫による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* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

cry1B.868 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis*、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* 及び *B. thuringiensis* 亜種 *kurstaki* である。改変 *cry1Da* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cry1B.868 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子は、それぞれ *Cry1B.868* タンパク質及び改変 *Cry1Da* タンパク質をコードしており、いずれもチョウ目に属する特定の昆虫に対する殺虫活性を発揮する。

これらの遺伝子はアグロバクテリウム法を用いて宿主へ導入された。

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

トウモロコシ種子の主要栄養素組成 (対乾燥重量) は、粗タンパク質 5.7~

17.3%、粗脂質 1.4～7.8%、総食物繊維 5.8～35.3%、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)については、フィチン酸 0.1～1.9%、ラフィノース 0.02～0.47%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 MON95379 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

(2) 摂取(可食)部位

トウモロコシ MON95379 の摂取部位は、従来のトウモロコシと変わらない。

(3) 摂取量

トウモロコシ MON95379 の摂取量は、従来のトウモロコシと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MON95379 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

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 MON95379 は、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子を導入して作出されており、Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質を産生することが宿主との相違点である。

1. から 6. までは、トウモロコシ MON95379 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

Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質は、ツマジロクサヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) やアメリカタバコガ (*Helicoverpa zea*) 等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。また、これらは異なる受容体に結合することから、既に商業栽培されている害虫抵抗性トウモロコシに対して抵抗性を有するチョウ

目害虫に対する抵抗性もトウモロコシ MON95379 系統へ付与する(参照 3)。

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 (*Z. mays* ssp. *mays* (L.)
Illis) のデント種 LH244 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 4)。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

トウモロコシには、有害生理活性物質のうちヒト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が、栄養阻害物質としては、フィチン酸、ラフィノースが含まれていることが知られている(参照 5)。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシの分子量 9 kDa の Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれるタンパク質、16 kDa のトリプシンインヒビター、26 kDa の α -ゼイン前駆体、30 kDa のキチナーゼ-A 及び 50 kDa の γ -ゼインが食物アレルギーとして報告されている(参照 6~9)が、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発性食品とは考えられていない(参照 5)。

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(参照 4)が、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属が知られているが(参照 4)、わ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 MON95379 の作出に使用した導入用プラスミド PV-

ZMIR522223 の外側骨格領域は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成された。

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 PV- ZMIR522223 の外側骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照 10)。

(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 PV- ZMIR522223 の外側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 PV-ZMIR522223 の外側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 PV-ZMIR522223 の外側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に対して耐性を付与する *aadA* 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 PV-ZMIR522223 の外側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

cry1B.868 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis*、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* 及び *B. thuringiensis* 亜種 *kurstaki* である。改変 *cry1Da* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* である。

(2) 安全性に関する事項

B. thuringiensis は土壌中に存在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等への病原性やアレルギー性は報告されていない。

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又は合成方法に関する事項

一般的に Cry タンパク質はドメイン I、II、III 及び C 末端ドメインより構

成されている。

cry1B.868 遺伝子は、*B. thuringiensis* に由来する野生型 Cry1Be タンパク質のドメイン I 及び II をコードする DNA 配列、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* に由来する野生型 Cry1Ca タンパク質のドメイン III をコードする DNA 配列、及び *B. thuringiensis* 亜種 *kurstaki* に由来する野生型 Cry1Ab タンパク質の C 末端ドメインをコードする DNA 配列を基に合成された。

改変 *cry1Da* 遺伝子は、*B. thuringiensis* 亜種 *aizawai* からクローニングされた野生型 *cry1Da* 遺伝子に由来する。改変 Cry1Da タンパク質のアミノ酸配列は、野生型 Cry1Da タンパク質のアミノ酸配列と比較して、殺虫活性を増強するため、1 アミノ酸の挿入と 3 箇所のアミノ酸置換が存在する。

(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、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている(参照 10)。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

感受性昆虫の体内に取り込まれた Cry タンパク質は、昆虫消化管にて殺虫活性をもつコアタンパク質へと変換され、中腸上皮細胞膜上の特異的受容体と結合し、細胞膜に小孔を形成することで中腸組織に損傷を与え殺虫活性を示す(参照 11)。Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質についても、ツマジロクサヨトウ (*S. frugiperda*) の中腸上皮細胞膜上の受容体への結合を介し殺虫活性を発揮することが示されており、既知の Cry タンパク質と同様の作用機作を有することが示唆されている(参照 3)。なお Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質は異なる受容体に結合し、独立して作用すると考えられており、相互作用する可能性は低い。また、ツマジロクサヨトウの防除に既に利用されている Cry1F、Cry1A.105、Cry2Ab 及び Vip3A タンパク質とも異なる受容体に結合し、独立した作用を示すことが報告されている(参照 3)。

B. thuringiensis で発現させた Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質を用いて、殺虫スペクトラムについて混餌投与による生物検定を行った結果、殺虫活性はチョウ目昆虫に限られることが示された(参照 12、13)。

Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質について毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース^aを用いて E-score $<1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 14)。

(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 PV-ZMIR522223 は、ストレプトマイシン及びスペクチノ

^a TOX_2020: Swiss-Prot database より抽出された毒性タンパク質データベース (ダウンロード日: 2020 年 1 月)

マイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有するが、本遺伝子は外側骨格領域に存在し、トウモロコシ MON95379 には導入されないことがシーケンス解析により確認されている。

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

cry1B.868 遺伝子発現カセットの *Zm.Ubq* プロモーターは、テオシント (*Zea mays* subsp. *Mexicana*) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン配列である(参照 15)。

改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセットの *Tip* プロモーターは、アワ (*Setaria italica*) 由来液胞膜内在性タンパク質をコードする (*Tip*) 遺伝子のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列である(参照 16)。

(2) ターミネーターに関する事項

cry1B.868 遺伝子発現カセットの *Ltp* ターミネーターは、イネ (*Oryza sativa*) 由来の脂質輸送タンパク質様 (*LTP*) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列である(参照 17)。

改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセットの *GOS2* ターミネーターは、イネ (*O. sativa*) 由来の転写開始因子をコードする *GOS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列である(参照 17)。

(3) その他

改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセットは、発現制御のため、Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA 由来の FMV エンハンサー配列(参照 18)及びイネ (*O. sativa*) 由来のアクチン *15* (*Act15*) 遺伝子の *Act15* イントロン配列を含む(参照 19)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR52223 は、外骨格領域及び *cp4 epsps* 遺伝子等を含む T-DNA 領域の一部から構成される中間プラスミドに、*cry1B.868* 遺伝子発現カセット、改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセット等を含む残りの T-DNA 領域を挿入することにより作製された。

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 PV-ZMIR52223 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている(参照 10)。

(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

第6-1-(2)に記載のとおりである。

(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 PV-ZMIR52223 の意図する挿入領域は、T-DNA 領域の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までである。なお、T-DNA 領域中の *cp4 epsps* 遺伝子 (選抜マーカー) 発現カセット及び *loxP* 配列の一つは組換え体作出の過程で除去される。

(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 PV-ZMIR52223 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。

表1 トウモロコシ MON95379 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
LB	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
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 由来の Cre タンパク質認識組換え部位
(cry1B.868 遺伝子発現カセット)	
<i>Ltp</i> ターミネーター	イネ由来の <i>LTP</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
<i>cry1B.868</i>	<i>B. thuringiensis</i> に由来する Cry1Be タンパク質のドメイン I 及び II、Cry1Ca タンパク質のドメイン III 並びに Cry1Ab タンパク質の C 末端ドメインから構成されるキメラタンパク質 Cry1B.868 をコードする配列。チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。
<i>Zm.Ubq</i> プロモーター	テオシント由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン配列。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
(改変 <i>cry1Da</i> 遺伝子発現カセット)	
FMV エンハンサー	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のエンハンサー。植物細胞内での転写を高める。
<i>Tip</i> プロモーター	アワ由来 <i>Tip</i> 遺伝子のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列。植物細胞における転写を誘導する。
<i>Act15</i> イントロン	イネ由来の <i>Act15</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列。 目的遺伝子の発現制御に関わる。

改変 <i>cry1Da</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の改変 <i>Cry1Da</i> タンパク質をコードする。チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。
<i>GOS2</i> ターミネーター	イネ由来の <i>GOS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
RB	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

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 PV-ZMIR522223 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、グリホサート耐性をマーカーとして用いて選抜し、形質転換再生個体を得た。次に、自殖により得た個体について、T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域を持たない個体を PCR 法及びサザンブロット分析を用いて選抜した。選抜した個体を 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^bと交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選抜マーカー (*cp4 epsps*) カセット及び *loxP* 配列の 1 つが除去され、自殖により Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜してトウモロコシ MON95379 が得られた。

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 MON95379 のゲノムに挿入された T-DNA 領域^cのコピー数、導入用プラスミド由来の非意図的な配列の有無及び挿入近傍配列を確認するために、シーケンス解析及び PCR 分析を行った。

トウモロコシ MON95379 のシーケンス解析で得た塩基配列 (リード) の冗長度^dは 96(中央値)であり、非組換えトウモロコシでの冗長度は 100(中央値)であった。得られたリードの全てを、導入用プラスミド PV-ZMIR522223 と照合した結果、トウモロコシ MON95379 では、T-DNA 領域 5'及び 3'末端配列を含む 2 つの接合領域が特定され、T-DNA 領域が 1 箇所に 1 コピー挿入されたことが示された(参照 20)。一方で、非組換えトウモロコシではこれらの接合領域は確認されなかった。また、トウモロコシ MON95379 において導入用プラスミド PV-ZMIR522223 由来の非意図的な配列は確認されなかった。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の導入用プラスミド

^b LH244 Cre 系統は、従来トウモロコシ品種 LH244 系統を導入用プラスミド PV-ZMOO513642 をアグロバクテリウム法にて形質転換し、T-DNA 領域をホモで有する (参照 20. Amended from MSL0030839: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON 95379 (社内文書))。

^c 導入用プラスミド PV-ZMIR522223 の T-DNA 領域のうち、選抜マーカーカセット及び *loxP* 配列の 1 つが除去された領域をいう。

^d 特定の DNA (ゲノム DNA 及び遺伝子) に対する塩基配列解析の回数を示す尺度。本試験では、1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標とし、その中央値が 75 以上となる条件で解析を実施。

PV-ZMOO513642 の配列と照合した結果、トウモロコシ MON95379 には PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないと考えられた。さらに、トウモロコシ MON95379 の挿入領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの目的の T-DNA 領域と比較した結果、両者は同一であることが確認された。

次に、トウモロコシ MON95379 への挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、MON95379 の挿入 DNA 近傍配列の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列に特異的なプライマーを作成し、非組換えトウモロコシを用いて PCR 分析及び塩基配列の解析を行った後、これをトウモロコシ MON95379 の近傍配列と比較した。その結果、トウモロコシ MON95379 の T-DNA 領域の挿入部位に認められた宿主ゲノムの 160 bp の欠失が認められたことを除き、トウモロコシ MON95379 の近傍配列と非組換えトウモロコシの塩基配列は一致しており、導入遺伝子の近傍配列が宿主ゲノム由来であることが確認された(参照 20)。

また、トウモロコシ MON95379 のゲノムに DNA を挿入することにより宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列 (1,000 bp)、欠失した 160 bp 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) の計 2,160 bp について、EST データベース (EST_2020^e)、核酸データベース (NT_2020^f) 及びアミノ酸配列データベース (NR_2020^g) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索において、 E -score $<1 \times 10^{-6}$ かつ 95%以上の相同性を有する配列が認められたが、これらは導入遺伝子挿入部位をまたがるものではなかった。また、blastx 検索において、 E -score $<1 \times 10^{-8}$ の配列が 1つ確認されたが、トウモロコシ MON95379 の導入遺伝子挿入部位をまたがるのではなく、植物体内でタンパク質として産生される知見もなかった。したがって、導入遺伝子挿入部位においてトウモロコシ内在性の既知の遺伝子は破壊されているとは考えられなかった(参照 21)。

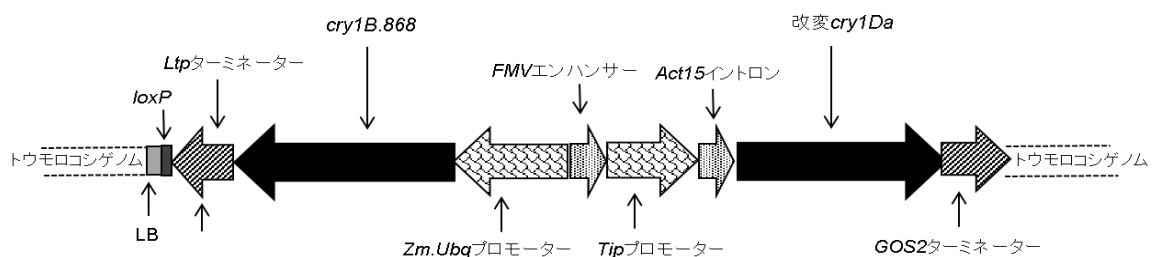


図1 トウモロコシ MON95379 に挿入された DNA (模式図)

^e EST_2020 : NCBI FTP server より 2020 年 1 月にダウンロードした EST 配列のデータベース。

^f NT_2020 : NCBI FTP server より 2020 年 1 月にダウンロードした塩基配列のデータベース。

^g NR_2020 : NCBI FTP server より 2020 年 1 月にダウンロードしたアミノ酸配列のデータベース。

(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 MON95379 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列との接合部において意図しないオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）が生じていないことを確認するために、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 8 アミノ酸以上の接合部を跨ぐ ORF が 12 個見いだされた(参照 22)。12 個の 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、アレルゲンデータベース (AD_2020^h)、毒性タンパク質データベース (TOX_2020^a) 及びタンパク質データベース (PRT_2020ⁱ) を用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。また、AD_2020 を用いて、連続する 80 アミノ酸配列に対して 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、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった。

トウモロコシ MON95379 の挿入 DNA 領域において、6つの読み枠から目的以外の新規タンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び生理活性のあるタンパク質との構造相同性の有無を確認するため、AD_2020^h、TOX_2020^a 及び PRT_2020ⁱ を用いて上記と同様の基準にて相同性検索を行った。その結果、相同性を示す配列が検出されたが、いずれもタンパク質として翻訳され、アレルゲン性及び毒性を有する可能性は低いと考えられた(参照 23)。

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 MON95379 の葉、根、花粉、地上部及び穀粒について、Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da 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 24)。

表 2 トウモロコシ MON95379 における Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質の発現量 (平均値)

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	Cry1B.868 タンパク質の発現量**	改変 Cry1Da タンパク質の発現量***
葉	630	92

^h AD_2020: COMPARE(COMprehensive Protein Allergen Resource)から 2020 年 1 月にダウンロードしたアレルゲン配列のデータベース。

ⁱ PRT_2020: NCBI FTP server より 2020 年 1 月にダウンロードしたタンパク質データベース。

根	110	43
花粉	91	<LOQ
地上部	110	26
穀粒	26	0.25

* 葉及び根は2~4葉期、花粉は絹糸抽出期、地上部は黄熟期、穀粒は成熟期である。

** 定量限界値 (LOQ) は全ての組織において 0.625 µg/g 乾燥重である。

*** 定量限界値 (LOQ) は葉、根、花粉及び地上部は 0.125 µg/g 乾燥重、穀粒は 0.050 µg/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 1.3 g (参照 25) を全てトウモロコシ MON95379 に置き換えて Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質の摂取量を計算すると 33.8 µg 及び 0.33 µg、となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 70.4 g (参照 25) に占める割合は両タンパク質を合計した場合、 4.8×10^{-7} となる。したがって、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

cry1B.868 遺伝子及び改変 cry1Da 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* に、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

Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質に関して、アレルギー誘発性の報告は、これまでのところない。

(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

a. Cry1B.868 タンパク質

B. thuringiensis で発現させた Cry1B.868 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、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 分析においては、完全長の Cry1B.868 タンパク質は試験開始後 0.5 分以内に消化されるが、約 4 kDa のフラグメントが 0.5 分後から 60 分後にわたり認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 26)。

約 4 kDa のフラグメントについて評価するため、人工胃液処理を 2 分間行った後、0 分から 2 時間にわたり人工腸液処理を行い、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、約 4 kDa のフラグメントは、人工腸液処理 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 26)。

b. 改変 Cry1Da タンパク質

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry1Da 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、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 分析においては、完全長の改変 Cry1Da タンパク質は試験開始後 0.5 分以内に消化されるが、約 4 kDa のフラグメントが 0.5 分後から 60 分後にわたり認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 27)。

約 4 kDa のフラグメントについて評価するため、人工胃液処理を 2 分間行った後、0 分から 2 時間にわたり人工腸液処理を行い、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、約 4 kDa のフラグメントは、人工腸液処理 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 27)。

② 人工腸液に対する感受性

a. Cry1B.868 タンパク質

B. thuringiensis で発現させた Cry1B.868 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、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、完全長の Cry1B.868 タンパク質は試験開始後 5 分以内に消化されるが、約 60 kDa のフラグメントが試験開始 5 分後から 24 時間後にわたり認められた(参照 26)。

b. 改変 Cry1Da タンパク質

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry1Da 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、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、完全長の改変 Cry1Da タンパク質は試験開始後 5 分以内に消化されるが、約 60 kDa のフラグメントが試験開始 5 分後から 24 時間後にわたり認められた(参照 27)。

③ 加熱処理に対する感受性

a. Cry1B.868 タンパク質

B. thuringiensis で発現させた Cry1B.868 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、機能活性分析として EC₅₀ を指標とした生物検定及び SDS-PAGE 分析を行った。生物検定の結果、75℃以上、15 及び 30 分間の加熱処理に対して、非加熱サンプルと比較して機能活性が 98%以上減少していた(参照 28)。SDS-PAGE 分析では 95℃、15 及び 30 分間の加熱処理に対して、完全長の Cry1B.868 タンパク質に相当するバンドの強度(濃さ)が減衰し低分子量のバンドの増加が認められた(参照 29)。以上より Cry1B.868 タンパク質は加熱に対する感受性を有することが示された。

b. 改変 Cry1Da タンパク質

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry1Da 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、機能活性分析として EC₅₀ を指標とした生物検定、及び SDS-PAGE 分析を行った。生物検定の結果、75°C以上、15 及び 30 分間の加熱処理に対して、非加熱サンプルと比較して機能活性が 98%以上減少していた(参照 29)。SDS-PAGE 分析では 75°C以上、15 及び 30 分間の加熱処理に対して、完全長の改変 Cry1Da タンパク質に相当するバンドの強度(濃さ)が減衰し低分子量のバンドの増加が認められた(参照 29)。以上より Cry1B.868 タンパク質は加熱に対する感受性を有することが示された。

(4) 遺伝子産物(タンパク質)と既知のアレルゲン(グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。)との構造相同性に関する事項

Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da 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、AD_2020ⁱを用いて相同性検索を行った。その結果、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を示す既知のアレルゲン、連続する 80 アミノ酸配列について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン及び連続する 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。

(1) から (4) まで及び前項 3 から総合的に判断し、Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da 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

挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ MON95379 の穀粒から抽出されたゲノム DNA を用いてシーケンス解析を行った結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 個検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された(参照 20)。

また、Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質の発現の安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ MON95379 の穀粒について、*B. thuringiensis* で発現させた Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質を陽性対照としてウェスタンブロット分析を行った。その結果、供試した 5 世代ではいずれの世代でも各タンパク質が発現していることが確認された(参照 30)。

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

Cry1B.868 タンパク質及び改変 Cry1Da タンパク質が何らかの酵素活性をもつとの報告はないことから、新しい代謝経路及び代謝産物を作ることは考えにくい。したがって、両タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性はないと考えられる。

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 MON95379 及び非組換えトウモロコシについて構成成分の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った(参照 31)。

(1) 穀粒における栄養素

粗タンパク質及び 18 種類のアミノ酸、粗脂肪及び 9 種類の脂肪酸、炭水化物及び繊維質、灰分及び 8 種類の無機質並びに 7 種類のビタミンについて分析を行った。その結果、粗タンパク質、アラニン、グルタミン酸、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、セリン、トレオニン、バリン、18:3 リノレン酸、炭水化物、銅、鉄、マンガン、リン、亜鉛及びビタミン A において統計学的有意差が認められたが、これらの平均値は ILSI データベースの範囲内であった(参照 2)。その他の項目には、統計学的有意差は認められなかった。

(2) 穀粒における栄養阻害物質及び二次代謝産物

栄養阻害物質（フィチン酸及びラフィノース）及び二次代謝産物（フェルラ酸及び p-クマル酸）について分析を行った結果、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。

(3) 地上部における栄養素

一般成分（粗タンパク質、粗脂肪、炭水化物）、繊維質、灰分及び 2 種類の無機質について分析を行った結果、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。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

カナダにおいては、食品の安全性審査の申請が、カナダ保健省 (Health Canada) に対して、飼料・環境の安全性審査の申請が、カナダ食品検査庁 (CFIA) に対してそれぞれ 2020 年 2 月に行われた。

米国においては、無規制裁培のための申請が、同年 7 月に米国農務省 (USDA) に対して、食品・飼料のための申請が、同年 8 月に米国食品医薬品庁 (FDA) に対して行われた。

欧州においては、食品、飼料及び輸入のための安全性審査の申請が、欧州食品安全機関 (EFSA) に対して同年 11 月に行われた。

ブラジルにおいては、ブラジル国家バイオ安全技術委員会 (CTNBio) によって、同年 12 月に商業利用が認可された。

豪州及びニュージーランドにおいては、食品としての安全性審査のための申請が、2021 年 4 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して行われた。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON95379 の栽培方法は、従来のトウモロコシと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ MON95379 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシと同じである。

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

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 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. 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. 2005.
2. ILSI. Crop composition database, version 7. 2019.
3. Wang Y, Wang J, Fu X, Nageotte J R, Silverman J, Bretsnyder E C et al.: *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 Protein Interactions with Novel Receptors Allow Control of Resistant Fall Armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Appl Environ Microbiol* 2019; 85
4. OECD. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). 2003.
5. OECD. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients. Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites. 2002.
6. Pastorello E A, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C et al.: The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 744-51
7. Lee S H, Benmoussa M, Sathe S K, Roux K H, Teuber S S, and Hamaker B R: A 50 kDa maize gamma-zein has marked cross-reactivity with the almond major protein. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 7965-70
8. Volpicella M, Leoni C, Fanizza I, Distaso M, Leoni G, Farioli L et al.: Characterization of maize chitinase-A, a tough allergenic molecule. *Allergy* 2017; 72: 1423-29
9. Pastorello E A, Farioli L, Pravettoni V, Scibilia J, Conti A, Fortunato D et al.: Maize food allergy: lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients. *Anal Bioanal Chem* 2009; 395: 93-102
10. Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR522223 (社内文書).
11. Deist B R, Rausch M A, Fernandez-Luna M T, Adang M J, and Bonning B C: Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins (Basel)* 2014; 6: 3005-27
12. Characterizing the Activity Spectrum of Cry1B.868 Against a Range of Invertebrate Taxa (社内文書).
13. Characterizing the Activity Spectrum of Cry1Da_7 Against a Range of Invertebrate Taxa (社内文書).
14. Updated Bioinformatics Evaluation of Cry1Da_7 and Cry1B.868 in MON 95379 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (社内文書).
15. Cornejo M J, Luth D, Blankenship K M, Anderson O D, and Blechl A E:

- Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Mol Biol* 1993; 23: 567-81
16. Hernandez-Garcia C M and Finer J J: Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Sci* 2014; 217-218: 109-19
 17. Hunt A G: Messenger RNA 3' End Formation in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1994; 45: 47-60
 18. Richins R D, Scholthof H B, and Shepherd R J: Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 8451-66
 19. Rose A B: Intron-mediated regulation of gene expression. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 326: 277-90
 20. Amended from MSL0030839: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON 95379 (社内文書).
 21. Amended From TRR0000121: Updated Bioinformatics Evaluation of MON 95379 Utilizing the EST_2020, NT_2020, and NR_2020 Databases (社内文書).
 22. Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 95379 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (社内文書).
 23. Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in MON 95379 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (社内文書).
 24. Assessment of Cry1B.868 and Cry1Da_7 Protein Levels in Leaf, Root, Pollen, Forage and Grain Tissues Collected from MON 95379 Produced in United States Field Trials During 2018 (社内文書).
 25. 厚生労働省. 平成 30 年国民健康・栄養調査報告 (令和 2 年 3 月公表) . 2020.
 26. Amended Report for MSL0030730: Assessment of the *in vitro* Digestibility of Cry1B.868 Protein by Pepsin and Pancreatin (社内文書).
 27. Assessment of the *in vitro* Digestibility of Cry1Da_7 Protein by Pepsin and Pancreatin (社内文書).
 28. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1B.868 Protein (社内文書).
 29. Amended Report for MSL0031014: The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1Da_7 Protein (社内文書).
 30. Demonstration of the Presence of Cry1Da_7 and Cry1B.868 Proteins in Maize Seed Samples across Multiple Generations of MON 95379 (社内文書).
 31. Amended Report for MSL0029995: Compositional Analyses of Maize Grain and Forage Harvested from MON 95379 Grown in the United States During the 2018 Season (社内文書).