

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

絹糸抽出期における高雌穂バイオマス
トウモロコシ MON87403 系統

2017年8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	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	12
5. 構築された発現ベクターに関する事項	12
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	13
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.....	16
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.....	16
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1月4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0104第1号）、関係書類の接受
- 2017年1月10日 第634回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2017年1月25日 第156回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年7月26日 第162回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年8月22日 第662回食品安全委員会（報告）

<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>

澤田 純一（座長）
小関 良宏（座長代理）
岡田 由美子 中島 春紫
橘田 和美 樋口 恭子
児玉 浩明 飯 哲夫
近藤 一成 山川 隆
柘植 郁哉 和久井 信
手島 玲子

要 約

「絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 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、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *ATHB17* 遺伝子を導入して作出されており、当該遺伝子が転写後スプライシングを受け、N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* タンパク質を発現することで、絹糸抽出期の雌穂バイオマスが増大するとされている。

「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、「絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 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：絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 系統
性質：絹糸抽出期の雌穂バイオマスの増大
申請者：日本モンサント株式会社
開発者：Monsanto Company (米国)

「絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 系統」(以下「トウモロコシ MON87403」という。)は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *ATHB17* 遺伝子を導入して作出されており、当該遺伝子が転写後スプライシングを受け、N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* タンパク質を発現することで、絹糸抽出期の雌穂バイオマスが増大するとされている。

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

ATHB17 遺伝子の供与体は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

トウモロコシ MON87403 では、*ATHB17* 遺伝子が転写された後、mRNA レベルで単子葉植物に特異的なスプライシングを受けることで(参照 1)、N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* タンパク質が発現する。その結果、トウモロコシ MON87403 では絹糸抽出期の雌穂バイオマスが増大するとされている。

この遺伝子は、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 2)、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%、総脂質 1.4~7.8%、総食物繊維 8.7~35.3%、灰分 0.6~6.3%、炭水化物 77.4~89.7%である（参照 3）。

(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 0.1~1.6%、ラフィノース 0.02~0.44%である（参照 3, 4）。

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 MON87403 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 MON87403 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 MON87403 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 MON87403 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 MON87403 は、*ATHB17* 遺伝子を導入して作出されており、当該遺伝子が転写後スプライシングを受け、N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* 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 MON87403 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 MON87403 は、導入された *ATHB17* 遺伝子が転写後スプライシングを受け、N 末端の 113 個のアミノ酸が欠失した *ATHB17Δ113* タンパク質を

発現し、それによって絹糸抽出期の雌穂重（雌穂バイオマス）が非組換えトウモロコシと比較して増大する。絹糸抽出期の雌穂重と収穫期の種子数は正の相関があるとの報告があり（参照 5, 6）、トウモロコシ MON87403 においても成熟期の種子数が非組換えトウモロコシと比較して増加していることが確認されている（参照 7）。

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.) Iltis）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 8）。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 2）。

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についてはその産生性が知られていないが、栄養阻害物質としては、フィチン酸及びラフィノースが含まれてい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（参照 9、10）が、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発食品とは考えられていない（参照 4）。

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 8）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 8）、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 MON87403 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMAP5714 の外骨格領域は、*E. coli* 由来のプラスミド pUC 等を基に作成された。

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-ZMAP5714 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（参照 11）。

(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-ZMAP5714 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 PV-ZMAP5714 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 PV-ZMAP5714 の外骨格領域にはスペクチノマイシン及びビ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-ZMAP5714 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

ATHB17 遺伝子の供与体は、シロイヌナズナである。

(2) 安全性に関する事項

ATHB17 遺伝子の供与体であるシロイヌナズナは、アブラナ科に属する雑草で、ヒトによる摂取の報告はない。近縁種の油糧種子作物であるナガミノアマナズナ (*Camelina sativa*) は、米国で生鮮野菜として食されている。シロイヌナズナの花粉に暴露されることで生じた研究従事者の職業性喘息の報告（参照 12）があることを除き、シロイヌナズナがアレルギー誘発性及び毒性を持つという報告はない。

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若しくは合成方法に関する事項

挿入遺伝子は、シロイヌナズナの *ATHB17* 遺伝子を PCR にて増幅した後、クローニングしたものであり、塩基配列はシロイヌナズナ内在性 *ATHB17* 遺伝子と同一である。

挿入 DNA の構成要素は表 1 のとおりである。

(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

トウモロコシ MON87403 及び非組換えトウモロコシを米国の圃場にて栽培し、絹糸抽出期における雌穂重を比較した結果、トウモロコシ MON87403 の雌穂重に有意な増加が確認された（参照 7）。また、遺伝的背景の異なる品種における本形質の発現についても調査を行うため、様々な遺伝的背景を持つ系統と *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する系統との掛け合わせ系統を作出し、それぞれの対照トウモロコシと絹糸抽出期における雌穂重を比較した結果、いずれの品種においても対照のトウモロコシと比較して雌穂重の有意な増加が認められた（参照 13）。

ATHB17 タンパク質は、ホメオドメインロイシンジッパー（HD-Zip）ファミリーの 4 つのクラスのうち、クラス II（HD-Zip II）に属する転写因子である（参照 14）。HD-Zip タンパク質は、DNA 結合ドメインであるホメオドメインとホモ二量体及びヘテロ二量体形成に必要とされるロイシンジッパードメインを有する。また、シロイヌナズナでは HD-Zip II タンパク質がリプレッションモチーフを有する転写リプレッサーであり、標的遺伝子の発現を抑制することが知られている（参照 15, 16）。トウモロコシの HD-Zip II タンパク質も、シロイヌナズナと同一の DNA 結合配列を用いたレポーターアッセイにより転写リプレッサーであることが報告されている（参照 13）。

HD-Zip II タンパク質の機能に関しては、シロイヌナズナの遺伝子は、生殖生長における子実の発達に関与しているとの報告（参照 17）及びトウモロコシの *HD-Zip II* 遺伝子が生殖生長組織において発現が高いとの報告（参照 13）がある。

トウモロコシ MON87403 で発現する *ATHB17* mRNA の配列を調べるため、*ATHB17* 遺伝子の転写産物を RT-PCR 法を用いて増幅した後、シーケンス解析を行った結果、単子葉植物特有のスプライシングが起り、*ATHB17* タンパク質の N 末端 113 アミノ酸に相当する RNA 領域が欠失した mRNA が発現していることが確認された（参照 18）。トウモロコシの MON87403 で発現する *ATHB17* タンパク質についてウェスタンブロット分析を行った結果、*E. coli*

で発現させた *ATHB17Δ113* タンパク質の分子量と同様の位置にバンドが観察され、全長の *ATHB17* タンパク質に相当するバンドは観察されなかった (参照 13)。*ATHB17Δ113* タンパク質では、DNA 結合ドメインであるホメオドメイン及び二量体を形成するロイシンジッパーは保持され、リプレッションモチーフを含む N 末端の 113 アミノ酸領域が欠失されているため、*ATHB17Δ113* タンパク質は DNA 結合能を有するホモ及びヘテロ二量体を形成するが、転写リプレッサーの機能を有さないことが示されている (参照 13)。

また、*ATHB17Δ113* タンパク質の発現によるトウモロコシの内在性遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有するトウモロコシ 2 種類の系統とそれぞれの対照トウモロコシの雌穂花序及び絹糸抽出期の雌穂における遺伝子発現を RNA シークエンス解析^aにより比較した。その結果、両系統とも発現量に 2 倍以上の変化が見られ、かつ *fdr_p*^b値が 0.05 未満という基準では変化した転写産物は見られなかった (参照 13)。また、RNA シークエンス解析において、トウモロコシ内在性の 18 種の *HD-Zip II* 遺伝子 (参照 19) の発現量は、対照トウモロコシの発現量と比較して変化は認められなかった (参照 20)。これは、*HD-Zip II* 遺伝子は、そのプロモーター領域に *HD-Zip II* タンパク質の DNA 結合配列を有し、ネガティブ・フィードバック機構を有するとの報告 (参照 15) があることから、*ATHB17Δ113* タンパク質がドミナント・ネガティブ作用を通じ、トウモロコシ MON87403 の内在性 *HD-Zip II* タンパク質を拮抗阻害することにより、内在性 *HD-Zip II* タンパク質の転写抑制が解除され、生じた *HD-Zip II* タンパク質によるネガティブ・フィードバック機構が働き、結果として *ATHB17Δ113* タンパク質の発現が内在性遺伝子の発現に与える影響が小さくなったことによるものであると考察されている (参照 21)。

RNA シークエンス解析の結果 (Raw-P<0.0001)、対照トウモロコシと比較して *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有するトウモロコシ 2 種類の系統に共通して発現量に有意な変化が認められた 9 種の遺伝子について、blast 検索にて機能の推定を行った。その結果、雌穂花序で特定された遺伝子がコードするタンパク質は、植物の Hsp22 熱ショックタンパク質、BAG ドメインを持つタンパク質、RNA Recognition Motif (RRM) を有する推定タンパク質等であり、雌穂では、グリセロホスホジエステラゼ (GPPD) 活性を有するタンパク質及び転写調節に関与するカルモジュリン結合タンパク質ファミリーに属するものであると推察された (参照 13)。

また、9 種の遺伝子のコードするタンパク質が、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性を示すかどうか、データベース^cを用いて調査した (参照

^a 次世代シーケンサーを用いて全ての mRNA を解読して、遺伝子発現の変化を網羅的に解析する手法。

^b 膨大なデータの統計処理に適した false discovery rate を制御した検定方式による p-値。

^c AD_2016:FARRP Allergen Online database 2016 年 1 月及び TOX_2016:PRT_2016 (GenBank protein database, 211 版)

22)。その結果、既知のアレルゲンと連続する 80 アミノ酸以上の配列で 35% 以上の相同性を示す配列は検出されず、連続する 8 アミノ酸配列の一致が見られたタンパク質は、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有するトウモロコシ 2 種類の系統で共通して発現が減少していたことから、アレルギー誘発性を高めるものではないと考えられた。既知の毒性タンパク質との相同性解析において、9 種のうち 2 種に相同性が認められており、うち 1 種は *ATHB17* 遺伝子発現カセットを有するトウモロコシ 2 種類の系統で共通して発現が減少していたことから毒性を高めるものではないと考えられた。残る 1 種は、アジア綿 (*Gpssypium arboretum*) に由来する Alpha-latrocrustotoxin-Lt1a であり、同タンパク質と毒性タンパク質である地中海クロゴケグモの Alpha-latrocrustotoxin-Lt1a は部分的相同性を有していることを根拠としてデータベースに登録されている。しかしながら、本タンパク質と毒性タンパク質との間に構造的に類似性のある配列はないこと等から、毒性を有していないと考えられた。

ATHB17Δ113 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を確認するために、毒性タンパク質データベース (TOX_2013^d) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 23)。

(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-ZMAP5714 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* 遺伝子を有するが、本遺伝子は外骨格領域に存在し、トウモロコシ MON87403 には導入されないことが次世代シーケンシング技術及びバイオインフォマティクスによる接合領域の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

ATHB17 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA プロモーターを基に作製された *e35S* プロモーターとイネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター (*Ract1* プロモーター) を接合させたキメラプロモーターである (参照 24, 25)。

(2) ターミネーターに関する事項

ATHB17 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ (*Triticum aestivum*) の熱ショックタンパク質 (Hsp17) をコードする遺伝子の 3'末端非翻訳領域である (参照 26)。

(3) その他

^d TOX_2013:PRT_2013 (GenBank protein database, 193 版、2013 年 1 月 24 日) のタンパク質データベースから検索・構築した 8,881 配列のサブセット。

ATHB17 遺伝子発現カセットは、目的遺伝子の発現を高めるため、コムギの葉緑素 a/b 結合タンパク質の 5'末端非翻訳リーダー領域である *Cab* リーダー配列及び目的遺伝子の発現の制御に関わるイネのアクチン遺伝子である *Ract1* イントロン配列を含む（参照 25,27）。

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-ZMAP5714 は、PV-ZMAP5714 を構成する外骨格領域から成る中間プラスミドのマルチクローニングサイトに、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-ZMAP5714 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。

(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 PV-ZMAP5714 の塩基配列は明らかになっており、挿入された T-DNA 領域に既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性物質と相同性を持つ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 23, 28）。

(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-ZMAP5714 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。

(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-ZMAP5714 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 MON87403 への挿入 DNA の構成要素

構成 DNA	由来及び機能
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
(ATHB17発現カセット)	
<i>e35S/Ract1</i> プロ	プロモーター領域

モーター	カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター配列とイネのアクチン 1 (<i>act1</i>) 遺伝子プロモーター配列を接合させたキメラプロモーター配列
<i>Cab</i>	コムギ葉緑素 a/b 結合タンパク質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる。
<i>Ract1</i>	イネのアクチン 1 遺伝子の <i>Ract1</i> イントロン配列。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
<i>ATHB17</i>	シロイヌナズナ由来の HD-Zip サブクラス II に属する転写因子 (<i>ATHB17</i>) をコードする遺伝子
<i>Hsp17</i> ターミネーター	ターミネーター領域 コムギの熱ショックタンパク質 (<i>Hsp17</i>) の 3'末端非翻訳領域
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

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

T-DNA 領域外に *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを配置した導入用プラスミド PV-ZMAP5714 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 (参照 29)。次に、自殖により得た個体について、*ATHB17* 遺伝子を含む T-DNA 領域をホモで有し、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを持たない個体を PCR 分析を用いて選抜した後、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交配又は戻し交配を行い、トウモロコシ MON87403 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 MON87403 のゲノムに挿入された T-DNA 領域の挿入箇所数、コピー数及び外骨格配列の有無を確認するために、次世代シーケンス技術及びバイオインフォマティクスによる接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA)、PCR 分析並びに PCR 産物の塩基配列解析を行った。

トウモロコシ MON87403 及び非組換えトウモロコシからゲノムを抽出し、NGS/JSA を行った結果、両ゲノムから読まれたリードの冗長度^oは平均で 113 及び 106 であった。NGS で得た塩基配列 (リード) 全てを、導入用プラスミド PV-ZMAP5714 と照合し、導入用プラスミドと相同性がある配列と相同性がない配列の両方をもつリードを導入遺伝子との接合領域として検出し、重複を確

^o 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。

認することで、接合領域の検出数、すなわちコピー数として確定した。その結果、トウモロコシ MON87403 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たが、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 MON87403 の NGS の結果から得られたリード配列と導入用プラスミド PV-ZMAP5714 との配列について相同性解析を行った結果、T-DNA 領域の冗長度は中央値が 127、最低冗長度が 22 であることを確認し、トウモロコシ MON87403 において T-DNA の全領域にリードが検出されたものの、外骨格領域と相同性のある配列は確認されなかった。以上のことから、トウモロコシ MON87403 のゲノム中に T-DNA 領域が 1 箇所以上 1 コピー挿入され、導入プラスミドの外骨格領域はゲノム中に存在しないことが確認された (参照 30)。さらに、トウモロコシ MON87403 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 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 MON87403 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、MON87403 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 MON87403 の近傍配列と比較した。その結果、トウモロコシ MON87403 の T-DNA 領域の挿入部位に認められた宿主ゲノムの 149 bp の欠失を除き、トウモロコシ MON87403 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 30)。

また、トウモロコシ MON87403 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 (1,345 bp)、欠失した 149 bp 及び 3'末端近傍配列 (1,267 bp) の計 2,761 bp について、EST データベース (EST_2014^f)、核酸データベース (NT_2014^g) 及びアミノ酸配列データベース (NR_2014^h) 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、95%以上の相同性を有する配列が認められたが、これらの配列は相同性を示した部分が 100 bp 以下の配列と短く、長くともクエリー配列との部分的一致であることから、データベースの既知の塩基配列ではないと考えられた。また、blastx 検索において、blastn 検索で相同性の認められた領域に重複して相同性を有する配列が確認されたが、1 箇所以上にストップコドンが存在するか、又は相同性を示した部分が短く、内在性遺伝子の存在を示すものではないと考えられた。したがって、DNA の挿入

^f EST_2014 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) EST 配列のデータベースで、75,091,877 配列のサブセット。

^g NT_2014 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) 塩基配列のデータベースで、20,846,064 配列のサブセット。

^h NR_2014 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、34,985,996 配列のサブセット。

によって既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた（参照 31）。

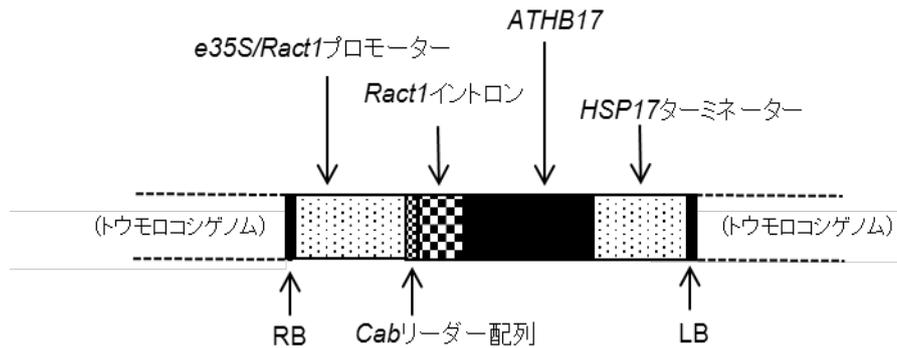


図1 トウモロコシ MON87403 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87403 の挿入 DNA 領域 (3,132 bp) と 5'末端近傍配列 (1,345 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,267 bp) との接合部において意図しない ORF 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 10 個見いだされた（参照 32）。10 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲン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_2014ⁱ)、毒性タンパク質データベース (TOX_2014^j) 及びタンパク質データベース (PRT_2014^k) を用いて FASTA 検索を行った。また、AD_2014 を用いて、*E-score* が 1×10^{-5} 以下、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、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ず、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も見いだされなかった。PRT_2014 による相同性検索の結果、相同性の高いフレームが 5'末端近傍に見られたが、カリフラワーモザイクウイルス由来の配列で、ATHB17 遺伝子発現カセットの e35S/Ract1 プロモーターのアミノ酸配列に対応し、生理活性のあるタンパク質とは考えられなかった。

トウモロコシ MON87403 の挿入 DNA 領域において、6つのフレーム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構造相関性を有するか調査するため、AD_2014、TOX_2014 及び PRT_2014 を用いて FASTA アルゴリズムにより相同性を検索した。その結果、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相同性は認められなかった（参照 28）。

ⁱ AD_2014: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)から得られた配列を基に作成されたデータベースで、1,706 配列のサブセット。

^j TOX_2014: PRT_2014 から検索し、構築したデータベースで、10,419 配列のサブセット。

^k PRT_2014: GenBank (GenBank protein database, 199 版, 2014 年 1 月 24 日)に登録されているタンパク質のアミノ酸配列から構成されるデータベースで、32,476,608 配列のサブセット。

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 MON87403 の葉、根、地上部及び穀粒について、ATHB17Δ113 タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析した。

結果は表 2 のとおりである（参照 33）。

表 2 トウモロコシ MON87403 における ATHB17Δ113 タンパク質の発現量
(単位は μg/g 乾燥重)

分析組織*	ATHB17Δ113 タンパク質の発現量
葉	0.014
根	0.0023
地上部	0.0018
穀粒	<LOD**

* 葉及び根は 3～4 葉期、地上部は黄熟期、穀粒は成熟期の値を示した。

** 穀粒の検出限界は、0.00028 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 0.5 g（参照 34）を全てトウモロコシ MON87403 に置き換えて ATHB17Δ113 タンパク質（検出限界値：0.00028 μg/g DW）の摂取量を計算すると 1.4×10^{-4} μg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 68.9 g（参照 34）に占める割合は 2.0×10^{-12} 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

ATHB17 遺伝子の供与体であるアブラナ科の植物であるシロイヌナズナに関して、その花粉に暴露されることで生じた研究従事者の職業性喘息の報告（参照 12）があることを除き、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

ATHB17 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

E. coli で発現させた ATHB17Δ113 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 分析においては、試験開始後 0.5 分以内に 4 ~5 kDa のフラグメントが認められたが、2 分後には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 0.5 分以内に消化されることが確認された（参照 35）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた ATHB17Δ113 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、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、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 35）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた ATHB17Δ113 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、95°C、15 分間及び 30 分間の加熱処理に対して免疫反応性の減少は僅か（22%）であり（参照 36）、加熱処理に対し安定であることが示唆された。

(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

ATHB17Δ113 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_2013¹を用いて相同性検索を行った。その結果、*E-score* が 1×10^{-5} 以下であり、かつ連続する 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 23）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2013 を用いて相同性検索を行った結果、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。

上記（1）から（4）まで及び前項 3 から総合的に判断し、ATHB17Δ113 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 MON87403 の穀粒から抽出されたゲノム DNA を用いて NGS/JSA を行った。その結果、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 30）。

また、ATHB17Δ113 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 MON87403 の葉について、*E. coli* で発現させた ATHB17Δ113 タン

¹ AD_2013: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP)から得られた配列を基に作成されたデータベースで、1,630 配列のサブセット。

パク質を対照としてウェスタンブロット分析を行った。その結果、非遺伝子組換え体では発現していないが、供試した 5 世代ではいずれの世代でも発現していることが確認された（参照 37）。

さらに、トウモロコシ MON87403 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 MON87403 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 38）。

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

ATHB17Δ113 タンパク質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II タンパク質が関与する既存の代謝経路に影響を与える可能性が考えられるが、新たな代謝経路が生じるとは考えにくい。RNA シークエンスによる発現比較解析の結果、トウモロコシ内在性の遺伝子について、発現量の変化が認められた 9 種の遺伝子のうち 5 種について機能が推定されたが、代謝経路への影響を示唆するものではなかった。また、トウモロコシ MON87403 の構成成分分析の結果、非組換え体と比較して統計学的有意差は認められなかった。したがって、ATHB17Δ113 タンパク質の発現がトウモロコシ内在性の代謝経路に与える影響は小さいと考えられる。

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 MON87403 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、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、二次代謝産物及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 39）。

(1) 主要構成成分

穀粒及び地上部の主要構成成分（タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維並びに総食物繊維（穀粒のみ））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。

(2) 脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、8 種類については、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。残りの 14 種類については定量限界以下であった。

(3) 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。

(4) 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、ナトリウム及び亜鉛)及び地上部のミネラル類(カルシウム及びリン)について分析を行った結果、ナトリウム以外は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。ナトリウムについては定量限界以下であった。

(5) ビタミン類

穀粒のビタミンA(β -カロチン)、ビタミンB₁(チアミン)、ビタミンB₂(リボフラビン)、ビタミンB₃(ナイアシン)、ビタミンB₆(ピリドキシン)、ビタミンB₉(葉酸)及びビタミンE(α -トコフェロール)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。

(6) 二次代謝産物

穀粒のフェルラ酸、*p*-クマル酸及びフルフラールについて分析を行った結果、フェルラ酸及び*p*-クマル酸については、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。

(7) 有害生理活性物質

穀粒のフィチン酸及びラフィノース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

米国においては、米国食品医薬品庁(FDA)に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2015年6月に安全性の確認が終了した。また、米国農務省(USDA)に対して無規制裁培のための申請が行われ、2015年12月に安全性の確認が終了した。

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)に対して食品及び飼料・環境の安全性審査の申請が行われ、それぞれ2015年11月に安全性認可を受けた。

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4月に安全性認可を受けた。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87403 の栽培方法は、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 MON87403 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

「絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 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. Goodall, G.J. and W. Filipowicz. 1991. Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *The EMBO Journal* 10: 2635-2644.
2. 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
3. ILSI. 2014. Crop Composition Database, Version 5.0. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed April 22, 2015].
4. 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.
5. Fisher, K.S. and A.F.E. Palmer. 1983. Maize. Pages 155-180 in Potential Productivity of Field Crops Under Different Environments. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
6. Severini, A.D., L. Borrás, M.E. Westgate and A.G. Cirilo. 2011. Kernel number and kernel weight determination in dent and popcorn maize. *Field Crops Research* 120: 360-369.
7. 別添資料 1 : Physiological Assessments of Maize MON 87403 in 2012 U.S. Field Trials (MSL0025451) (社内報告書)
8. 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 of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
9. 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.
10. 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.
11. 別添資料 2 : Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP5714 (社内報告書)
12. Yates, B., A. De Soyza, R. Harkawat and C. Stenton. 2008. Occupational asthma caused by *Arabidopsis thaliana*: a case of laboratory plant allergy. *Rur Respir J* 32: 1111-1112.

13. Rice, E.A., A. Khandelwal, R.A. Creelman, C. Griffith, J.E. Ahrens, J.P. Taylor, L.R. Murphy, S. Manjunath, R.L. Thompson, M.J. Lingard, S.L. Back, H. Larue, B.R. Brayton, A.J. Burek, S. Tiwari, L. Adam, J.A. Morrell, R.A. Caldo, Q. Huai, J.-L.K. Kouadio, R. Kuehn, A.M. Sant, W.J. Wingbermuehle, R. Sala, M. Foster, J.D. Kinser, R. Mohanty, D. Jiang, T.E. Ziegler, M.G. Huang, S.V. Kuriakose, K. Skottke, P.P. Repetti, T.L. Reuber, T.G. Ruff, M.E. Petracek and P.J. Loida. 2014. Expression of a truncated *ATHB17* protein in maize increases ear weight at silking. *PLoS One* 9: e94238.
14. Ariel, F.D., P.A. Manavella, C.A. Dezar and R.L. Chan. 2007. The true story of the HD-Zip family. *Trends in Plant Science* 12: 419-426.
15. Ciarbelli, A.R., A. Ciolfi, S. Salvucci, V. Ruzza, M. Possenti, M. Carabelli, A. Fruscalzo, G. Sessa, G. Morelli and I. Ruberti. 2008. The Arabidopsis homeodomain-leucine zipper II gene family: Diversity and redundancy. *Plant Molecular Biology* 68: 465-478.
16. Kagale, S. and K. Rozwadowski. 2011. EAR motif-mediated transcriptional repression in plants: An underlying mechanism for epigenetic regulation of gene expression. *Epigenetics* 6: 141-146.
17. Zúñiga-Mayo, V.M., N. Marsch-Martínez and S. de Folter. 2012. JAIBA, a class-II HD-ZIP transcription factor involved in the regulation of meristematic activity, and important for correct gynoecium and fruit development in Arabidopsis. *The Plant Journal* 71: 314-326.
18. 別添資料 3 : Sequence Analysis of the *ATHB17* RNA Transcript Produced in MON 87403 (MSL0024955) (社内報告書)
19. Zhao, Y., Y. Zhou, H. Jiang, X. Li, D. Gan, X. Peng, S. Zhu and B. Cheng. 2011. Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize. *PLoS ONE* 6: e28488.
20. 別添資料 4 : Analysis of Endogenous Maize HD-Zip II Expression by RNA-seq for Japan (RAR-2017-0068) (社内報告書)
21. Ohgishi, M., A. Oka, G. Morelli, I. Ruberti and T. Aoyama. 2001. Negative autoregulation of the Arabidopsis homeobox gene *ATHB-2*. *The Plant Journal* 25: 389-398
22. 別添資料 5 : Bioinformatics Evaluation of the Potential for Allergenicity and Toxicity of Differentially Expressed Genes in MON87403 Utilizing the AD_2016 and TOX_2016 Databases (RAR-2017-0065) (社内報告書)
23. 別添資料 6 : Bioinformatics Evaluation of the *ATHB17Δ113* Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0025242) (社内報告書)
24. Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
25. 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.
26. McElwain, E.F. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Research* 17: 1764.
 27. Lamppa, G.K., G. Morelli and N.-H. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1370-1378.
 28. 別添資料 7 : Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87403 Utilizing the AD_2014, TOX_2014 and PRT_2014 Databases (MSL0025648) (社内報告書)
 29. Huang, S., L.A. Gilbertson, T.H. Adams, K.P. Malloy, E.K. Reisenbigler, D.H. Birr, M.W. Snyder, Q. Zhang and M.H. Luethy. 2004. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Research* 13: 451-461.
 30. 別添資料 8 : Amended Report for MSL0025316: Molecular Characterization of MON 87403 (MSL0025909) (社内報告書)
 31. 別添資料 9 : Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87403: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0025871) (社内報告書)
 32. 別添資料 1 0 : Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87403: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0025733) (社内報告書)
 33. 別添資料 1 1 : Assessment of ATHB17 Δ 113 Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from Maize MON 87403 Produced in the United States Field Trials during 2012 (MSL0026598) (社内報告書)
 34. 厚生労働省. 2014. 平成 25 年国民健康・栄養調査報告の概要. 厚生労働省.
 35. 別添資料 1 3 : Assessment of the *in vitro* Digestibility of ATHB17 Δ 113 Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0025516) (社内報告書)
 36. 別添資料 1 4 : Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-Produced MON 87403 ATHB17 Δ 113 Protein (MSL0026235) (社内報告書)
 37. 別添資料 1 5 : Amended Report for MSL0025012: Demonstration of the Presence of ATHB17 Δ 113 Protein in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87403 (MSL0025213) (社内報告書)
 38. 別添資料 1 6 : Segregation of the T-DNA Insert in MON 87403 Across Three Generations (MSL0024676) (社内報告書)
 39. 別添資料 1 7 : Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from MON 87403 Grown in the United States during 2012 (MSL0025076) (社内報告書)