

府食第469号
令和7年6月26日

内閣総理大臣
石破 茂 殿

食品安全委員会
委員長 山本 茂貴

食品健康影響評価の結果の通知について

令和5年10月3日付け厚生労働省発健生1003第11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トウモロコシMON95275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トウモロコシMON95275系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針」（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、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

別添

遺伝子組換え食品等評価書

コウチュウ目害虫抵抗性
トウモロコシ MON95275 系統
(食品)

令和7年(2025年)6月

食品安全委員会

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. 食品健康影響評価において比較対象として用いる既存品種の性質に関する事項	5
1. 既存品種の分類学上の位置付けに関する事項	5
2. 既存品種の食経験に関する事項	5
3. 既存品種の食品としての利用方法に関する事項	5
4. 既存品種の遺伝的先祖及び育種開発の経緯並びに近縁の植物種に関する事項	6
5. 既存品種由来の食品の構成成分等に関する事項	6
6. 既存品種のアレルギー誘発性等に関する事項	6
7. 既存品種の栽培及び流通過程において、健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項	6
8. 既存品種の安全な摂取に関する事項	7
第 2. 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項	7
1. 新たに付加される形質又は改変される形質	7
2. 利用目的	7
3. 利用方法	7
4. 安全性において検討が必要とされる相違点	7
5. 既存品種以外のものを比較対象とする場合の理由	7
第 3. 挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項	8
1. ベクターの名称及び由来に関する事項	8
2. ベクターの性質に関する事項	8
3. 挿入 DNA の供与体に関する事項	8
4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物（RNA 及びタンパク質）の性質に関する事項	9
5. そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項	12
6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項	12
7. 構築されたコンストラクトに関する事項	14
第 4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項	15
1. 遺伝子導入に関する事項	15

2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	18
3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項	19
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（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合にはその遺伝子産物についても評価すること。）	20
5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項（既存品種及び既存品種に近縁な種に含まれる基質と反応する可能性に関する事項を含む。） .	22
6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項	23
7. 諸外国における認可、食用等に関する事項	24
第5. 第1から第4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	24
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	25
<参照>	26

<審議の経緯>

- 2023年10月3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（厚生労働省発健生1003第11号）、関係書類の接受
- 2023年10月10日 第916回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2023年11月17日 第242回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2025年1月29日 第261回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2025年5月13日 第982回食品安全委員会（報告）
- 2025年5月14日から2025年6月12日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2025年6月18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に報告
- 2025年6月24日 第988回食品安全委員会（報告）
（6月26日付け内閣総理大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

2024年6月30日まで	2024年7月1日から
山本 茂貴（委員長）	山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）	浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）	祖父江 友孝（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）	頭金 正博（委員長代理 第三順位）
香西 みどり	小島 登貴子
松永 和紀	杉山 久仁子
吉田 充	松永 和紀

<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>

2024年3月31日まで	2024年4月1日から
児玉 浩明（座長）	児玉 浩明（座長）
佐々木 伸大（座長代理）	佐々木 伸大（座長代理）
伊藤 政博 柴田 識人	伊藤 政博 手島 玲子
岡田 由美子 手島 玲子	小野 道之 樋口 恭子
小野 道之 樋口 恭子	小野 竜一 藤原 すみれ
小野 竜一 藤原 すみれ	柴田 識人 百瀬 愛佳
	爲廣 紀正

<第242回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

山川 隆（国立大学法人東京大学大学院）

<第261回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

山川 隆（国立大学法人東京大学大学院）

要 約

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統」について食品健康影響評価を実施した。

本系統は、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統を既存品種とし、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) (以下「WCR」という。) に由来する *Snf7* 遺伝子 (*DvSnf7* 遺伝子) の一部を逆方向反復配列の形で導入するとともに、*Brevibacillus laterosporus* に由来する *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* に由来する *vpb4Da2* 遺伝子を導入して作出されており、二本鎖 RNA (*DvSnf7* dsRNA)、Mpp75Aa1.1 タンパク質及び Vpb4Da2 タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫抵抗性が付与される。

WCR が本トウモロコシを摂取すると、*DvSnf7* dsRNA が細胞内に取り込まれ、RNA 干渉機構 (RNAi 機構) により、細胞機能の維持に必要不可欠な *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで殺虫活性を示すとされている。Mpp75Aa1.1 タンパク質及び Vpb4Da2 タンパク質は選択的殺虫タンパク質であり、WCR 等のコウチュウ目昆虫に摂食されると、昆虫の中腸上皮細胞膜上の受容体と結合して中腸組織を損傷させることにより殺虫活性を発揮する。

「遺伝子組換え食品 (種子植物) に関する食品健康影響評価指針」(平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定) に基づき、導入遺伝子の供与体の安全性、導入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、導入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における導入遺伝子の安定性、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。その結果、本系統には、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トウモロコシ MON95275 系統」については、人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：コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95275系統

性 質：コウチュウ目害虫抵抗性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer Group (ドイツ)

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統」(以下「トウモロコシ MON95275」という。)は、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) (以下「WCR」という。)に由来する *Snf7* 遺伝子 (*DvSnf7* 遺伝子) の一部を逆方向反復の形で導入するとともに、*Brevibacillus laterosporus* に由来する *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* に由来する *vpb4Da2* 遺伝子を導入して作出されており、二本鎖 RNA (*DvSnf7 dsRNA*)、*Mpp75Aa1.1* タンパク質及び *Vpb4Da2* タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫抵抗性が付与される。

II. 食品健康影響評価

第 1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる既存品種の性質に関する事項

1. 既存品種の分類学上の位置付けに関する事項

既存品種は、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 LH244 系統である。

2. 既存品種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. 既存品種の食品としての利用方法に関する事項

(1) 収穫時期 (成熟程度) と貯蔵方法

一般にトウモロコシの収穫は秋季に行われ、乾燥後、常温で貯蔵される。

(2) 摂取 (可食) 部位

トウモロコシの摂取 (可食) 部位は雌穂に形成される子実である。

(3) 摂取量

日本人の「とうもろこし・加工品」^aの一日平均摂取量は、1.0 g である。

(4) 調理及び加工方法

デント種は主に飼料用として栽培されているが、コーンスターチの原料とし

^a 令和元年「国民健康・栄養調査報告」食品群別摂取量の食品分類

て利用されるほか、食用油やスナック菓子に加工される。

4. 既存品種の遺伝的先祖及び育種開発の経緯並びに近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は、同属のテオシントで、人為的選抜を経て栽培化したと言われている。原産地は、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、現在では北緯 60 度から南緯 40 度辺りまで栽培地域が拡大し、世界的に広く栽培される作物となった（参照 1）。

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、わが国において食用に供されることはない（参照 3）。

5. 既存品種由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 既存品種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

トウモロコシの子実の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、総食物繊維 5.8～35.3%、粗タンパク質 5.7～17.3%、粗脂肪 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) 既存品種に含まれる毒性物質・栄養阻害物質（栄養素の消化・吸収等を阻害する物質。例えば、トリプシンインヒビター、フィチン酸等）等の種類及びその量の概要

トウモロコシには、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。栄養阻害物質として、フィチン酸、ラフィノースが知られている。トリプシンインヒビターも含まれているが、含有量が少なく、栄養学的に問題にならないとされている（参照 4）。

対乾燥重量の含有量については、フィチン酸 0.11～1.9%、ラフィノース 0.020～0.47%である（参照 2）。トリプシンインヒビターの活性は、0.49～8.42 TIU (Trypsin Inhibitor Unit) /mg DW である（参照 5）。

6. 既存品種のアレルギー誘発性等に関する事項

トウモロコシの脂質輸送タンパク質 (Lipid Transfer Protein) と呼ばれる分子量 9 kDa のタンパク質、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である可能性が示唆されているが（参照 6、7、8、9）、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発性のある食品とは考えられていない（参照 4）。

7. 既存品種の栽培及び流通過程において、健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

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。

8. 既存品種の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。デント種は、食品分野においてコーン油、コーンスターチ等の原料として幅広く利用されている。

以上1～8より、トウモロコシ MON95275 の安全性評価においては、従来のトウモロコシが比較対象であると判断した。

第2. 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項

1. 新たに付加される形質又は改変される形質

トウモロコシ MON95275 は、コウチュウ目害虫抵抗性が付与される。

2. 利用目的

トウモロコシ MON95275 は、WCR 等のコウチュウ目害虫に殺虫活性を有することによりコウチュウ目害虫による食害を防ぐ。

3. 利用方法

(1) 栽培方法、収穫時期、種子の製法及び管理方法

トウモロコシ MON95275 の栽培方法、収穫時期、種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

(2) 可食部位、調理及び加工方法

トウモロコシ MON95275 の可食部位、調理及び加工方法は、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 MON95275 の摂取量は、従来のトウモロコシと変わらない。

4. 安全性において検討が必要とされる相違点

トウモロコシ MON95275 は、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列、*mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子を導入して作出されており、*DvSnf7* dsRNA、*Mpp75Aa1.1* タンパク質及び *Vpb4Da2* タンパク質を発現することが既存品種との相違点である。

5. 既存品種以外のものを比較対象とする場合の理由

既存品種以外のものは比較対象としていない。

第3. 挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項

1. ベクターの名称及び由来に関する事項

トウモロコシ MON95275 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMIR525664 のベクターバックボーンは、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322などを基に作製された。

2. ベクターの性質に関する事項

(1) ベクター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-ZMIR525664 のベクターバックボーンの塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 10）。

(2) 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-ZMIR525664 のベクターバックボーン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（参照 10）。

(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 のベクターバックボーンには、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（参照 10）。

(4) 伝達性等に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 のベクターバックボーンには、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

3. 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

DvSnf7 遺伝子の部分配列、*mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子の供与体は、それぞれ WCR、*Bre. laterosporus* 及び *Bac. thuringiensis* である。

(2) 安全性に関する事項（アレルギー誘発性、毒素産生性を含む。）

WCR は北アメリカを原産とするコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫であり、コーンルートワームの 1 種である。WCR がヒトに対するアレルギー誘発性及び毒素産生性を有しているとの報告はない。

Bre. laterosporus は土壌、岩、埃、淡水及び海水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、アレルギー誘発性及び毒素産生性を有しているとの報告はない。

Bac. thuringiensis は土壌中に遍在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等への病原性、アレルギー誘発性及び毒素産生性を有しているとの報告はない。

4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物（RNA 及びタンパク質）の性質に関する事項

(1) 導入遺伝子の機能に関する事項

① 遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能

- a. *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と一致するように設計された逆方向反復配列
- DvSnf7* 遺伝子の部分配列は、WCR から抽出された *Snf7* 遺伝子の RNA を逆転写した後、PCR で増幅して合成された。*DvSnf7* 遺伝子の部分配列と一致するように設計された逆方向反復配列が転写されることで形成される *DvSnf7* dsRNA は、トウモロコシ MON95275 を摂食した WCR の中腸において RNA 干渉機構 (RNAi 機構) により、オートファジー経路に関与する *DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制される。この作用は、WCR の中腸細胞だけではなく体組織でも観察されるとしている (参照 11)。*Snf7* 遺伝子がコードする SNF7 タンパク質は、不要となった細胞小器官及びタンパク質を自食作用 (オートファジー) により分解するための選別に関与する ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport)-III 複合体の構成タンパク質である。WCR の *DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制されることで、分解されるべき不要タンパク質が細胞に蓄積するため細胞の恒常性が損なわれ、WCR は死に至るとしている。

DvSnf7 dsRNA の殺虫活性について、コウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目 14 種類の生物種に対して評価した。その結果、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫にのみ殺虫活性が認められた^b。また、経口摂取された *DvSnf7* dsRNA が RNA 干渉機構 (RNAi 機構) により認識されるには、連続した 21 塩基以上の配列の相同性が必須であることが知られているが (参照 11、12)、最も近縁であるコウチュウ目ハムシ科ハムシ亜科の昆虫の *Snf7* 遺伝子であっても *DvSnf7* 遺伝子の部分配列と 21 塩基長で一致する配列は存在しないことを確認している。

b. *mpp75Aa1.1* 遺伝子

mpp75Aa1.1 遺伝子は、*Mpp75Aa1.1* タンパク質をコードする。*Mpp75Aa1.1* タンパク質は、他の殺虫活性をもつ膜孔形成タンパク質と同様に、感受性昆虫の体内に取り込まれ、昆虫消化管の生理条件下において、消化管の特異的なタンパク質分解酵素により部分的に分解されることでコアタンパク質へと変換される。その後、コアタンパク質が WCR の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体へ結合し、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 13)。

Mpp75Aa1.1 タンパク質の殺虫活性について、コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目及びナガミ

^bコウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 系統 (平成 28 年 6 月 7 日食品安全委員会において了承)

ミズ目の8目 20種の生物種に対して評価した。この生物検定において、EC₅₀ (半数影響濃度) 又は LC₅₀ (半数致死濃度) が推定された場合には、感受性を有する生物種であると判定した。その結果、Mpp75Aa1.1 タンパク質に対してはコウチュウ目、チョウ目、ハチ目 (幼虫) 及びアミメカゲロウ目の昆虫が感受性を示した (参照 14)。

c. *vpb4Da2* 遺伝子

vpb4Da2 遺伝子は、Vpb4Da2 タンパク質をコードする。Vpb4Da2 タンパク質は、他の殺虫活性をもつ膜孔形成タンパク質と同様に、感受性昆虫の体内に取り込まれ、昆虫消化管の生理条件下において、消化管の特異的なタンパク質分解酵素により部分的に分解されることでコアタンパク質へと変換される。その後、コアタンパク質が WCR の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体へ結合し、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 15)。

Vpb4Da2 タンパク質の殺虫活性について、コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目、ハエ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目及びナガミミズ目の8目 20種の生物種に対して評価した。この生物検定において、EC₅₀ (半数影響濃度) 又は LC₅₀ (半数致死濃度) が推定された場合には、感受性を有する生物種であると判定した。その結果、Vpb4Da2 タンパク質に対してはコウチュウ目及びハエ目の昆虫が感受性を示した (参照 16)。

② 発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性

Mpp75Aa1.1 タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、毒性タンパク質データベース^cを用いて E-score $\leq 1 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った。その結果、*Clostridium perfringens* の ETX タンパク質である Q02307 と相同性を示した。しかしながら、Q02307 の毒性発現に重要な受容体結合ドメインのアミノ酸は、Mpp75Aa1.1 タンパク質において欠如していたことから、Mpp75Aa1.1 タンパク質が哺乳類に対して毒性をもつとは考えにくい (参照 17)。

Vpb4Da2 タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、毒性タンパク質データベース^cを用いて E-score $\leq 1 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った。その結果、*Bacillus anthracis* の感染防御抗原である P13423 と相同性を示した。しかしながら、P13423 は、それ自身で毒性を発揮することではなく、ワクチンとして使用されている実績がある。また、細胞膜上の特異的受容体への結合を担う受容体結合ドメインについては、Vpb4Da2 タンパク質と P13423 との間で相同性が認められなかった。以上のことから、Vpb4Da2 タンパク質が哺乳類やその他の脊椎動物に対して毒

^c TOX_2021: Swiss-Prot database (URL: <https://www.uniprot.org/uniprot/>、ダウンロード日: 2021年1月) から抽出された毒性タンパク質配列のデータベースであり、7,870 配列を含む。

性をもつとは考えにくい（参照 18）。

(2) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子のうち、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-ZMIR525664 のベクターバックボーンには、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子（参照 19）が含まれているが、トウモロコシ MON95275 のゲノム中に導入されていないことが次世代シーケンス解析により確認されている。

(3) 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる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

DvSnf7 遺伝子の部分配列の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 (CaMV) 由来の 35S プロモーター及びリーダー配列である。

mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ガマグラス (*Tripsacum dactyloides*) 由来の *RCc3* 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列である。

vpb4Da2 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の脂質輸送タンパク質遺伝子 (*Ltp* 遺伝子) のプロモーター及びリーダー配列である。

② ターミネーターに関する事項

DvSnf7 遺伝子の部分配列の発現カセットのターミネーターは、エンドウ (*Pisum sativum*) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする *RbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である（参照 20）。

mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ハトムギ (*Coix lacryma-jobi*) の熱ショックタンパク質をコードする *Hsp* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列である（参照 21）。

vpb4Da2 遺伝子発現カセットのターミネーターは、アワ (*Setaria italica*) の S-アデノシルメチオニン合成酵素 1 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列である（参照 21）。

③ その他

DvSnf7 遺伝子の部分配列の発現カセットには、植物細胞内での転写を高めるためにトウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *pIIG* 遺伝子のエンハンサー配列である *pIIG-Zm1* エンハンサー配列を挿入するとともに、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *hsp70* 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からなる *Hsp70* イントロン配列を挿入している。

mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセットには、植物細胞内での転写を高めるため

にダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来する *DaMV-1* エンハンサー配列を挿入するとともに、アワ (*S. italica*) 由来の *14-3-3c* 遺伝子の *14-3-3c-Si1* イントロン配列を挿入している。

vpb4Da2 遺伝子発現カセットは、植物細胞内での転写を高めるためにダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来する *DaMV-2* エンハンサー配列を挿入するとともに、アワ (*S. italica*) 由来のアクチン遺伝子の *Act-Si1* イントロン配列を挿入している。

また、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列の発現カセットと *mpp75Aa1.1* 遺伝子発現カセットとの間には、これら 2 つのカセットが互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化させるため非コード配列である *Isr-1* スペーサーが存在する。

5. そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項

中間系統作出のために既存品種のゲノムに導入された *Agrobacterium* CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子は 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) (参照 22) を、バクテリオファージ P1 由来のキメラ *Cre* 遺伝子は *Cre* タンパク質をそれぞれ産生する。

CP4 EPSPS は、形質転換後の細胞に除草剤グリホサート耐性を付与し、形質転換された細胞の選抜に利用された。

リコンビナーゼである *Cre* タンパク質は、中間系統のゲノム DNA に 2 か所存在する標的配列 *loxP* の間で部位特異的組換えを誘導する。

これらの遺伝子は、いずれもトウモロコシ MON95275 の作出の過程において一時的に既存品種及び中間系統のゲノムに導入された後にゲノムから除去されるため、トウモロコシ MON95275 には残存しない。

6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項

(1) 挿入 DNA のクローニング又は合成方法に関する事項

DvSnf7 遺伝子の部分配列は、WCR から抽出された *Snf7* 遺伝子の RNA を逆転写した後に PCR 法によりクローニングされた。また、*mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子は、それぞれの供与体のゲノム DNA から PCR 法によってクローニングされた。

(2) 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-ZMIR525664 は、プラスミド pBR322 等より構成されたベクターバックボーンと *DvSnf7* 遺伝子の部分配列の発現カセット、*mpp75Aa1.1* 遺伝子発現カセット、*vpb4Da2* 遺伝子発現カセット及び *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域より作製された。導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の挿入 DNA 領域の構成要素は表 1 のとおり。なお、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは、作出の過程で除去されるため、トウモロコシ MON95275 には存在しない。

表1 導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の挿入 DNA 領域の構成要素 (一部省略)

構成 DNA	由来及び機能
Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA 領域を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (参照 23、24)。
(DvSnf7 遺伝子の部分配列の発現カセット)	
<i>pIIG-Zm1</i> エンハンサー	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) に由来し、物理的インピーダンス誘導タンパク質をコードする <i>pIIG</i> 遺伝子のエンハンサー配列 (参照 25)。植物細胞内での転写を高める。
<i>35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の <i>35S</i> プロモーター及びリーダー配列 (参照 26)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>Hsp70</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の熱ショックタンパク質 (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 (参照 27)。
<i>DvSnf7</i> ^{P1}	<i>D. virgifera virgifera</i> 由来の <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列① (参照 28、29)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (参照 30)。
Intervening sequence	転写産物において当該配列内で対合しないように設計された、ループ部分の配列。
<i>DvSnf7</i> ^{P2}	上記の部分配列 ①の逆方向配列。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (参照 30)。
<i>E9</i> ターミネーター	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (参照 20)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
(mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセット)	
<i>DaMV-1</i> エンハンサー	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (参照 31)。植物細胞内での転写を高める。
<i>RCc3-Td1</i> プロモーター	ガマグラス (<i>Tripsacum dactyloides</i>) 由来の <i>RCc3</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (参照 32)。植物細胞内での転写を誘導する。
<i>14-3-3c-Si1</i> イントロン	アワ (<i>Setaria italica</i>) の <i>14-3-3c</i> 遺伝子のイントロン配列 (参照 33)。
<i>mpp75Aa1.1</i>	<i>Bre. laterosporus</i> 由来の <i>Mpp75Aa1.1</i> タンパク質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (参照 17)。

<i>HSP-C11</i> ターミネーター	ハトムギ (<i>Coix lacryma-jobi</i>) の熱ショックタンパク質をコードする <i>Hsp</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (参照 21)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
(vpb4Da2 遺伝子発現カセット)	
<i>DaMV-2</i> エンハンサー	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (参照 31)。植物細胞内での転写を高める。
<i>Ltp-Zm1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の脂質輸送タンパク質遺伝子 (<i>Ltp</i> 遺伝子) のプロモーター及びリーダー配列 (参照 32)。植物細胞における転写を誘導する。
<i>Act-Si1</i> イントロン	アワ (<i>S. italica</i>) のアクチン遺伝子のイントロン配列 (参照 33)。
<i>vpb4Da2</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の Vpb4Da2 タンパク質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (参照 34)。
<i>SAM1-Si1</i> ターミネーター	アワ (<i>S. italica</i>) の S-アデノシルメチオニン合成酵素 1 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (参照 21)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 由来の loxP 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 (参照 35)。
Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (参照 36)。

※ *DvSnf7^{P1}* 及び *DvSnf7^{P2}* における「P」は部分配列であることを意味する。

※ Right Border Region 及び Left Border Region は、トウモロコシ MON95275 に導入された際に導入用プラスミド PV-ZMIR525664 と比較して短くなっている。

7. 構築されたコンストラクトに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列並びに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-ZMIR525664 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) 既存品種に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域がコンストラクト上で明らかであること

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の意図する挿入領域は、T-DNA 領域の右側境界領域から左側境界領域までである。なお、T-DNA 領域中の *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び *loxP* 配列の一つは遺伝子組換え体を作成する過程で除去されるため、トウモロコシ MON95275 には残存しない。

- (3) 導入しようとするコンストラクトは、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されていること

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンによる選抜を通じて目的外の遺伝子の混入がないよう純化されており、塩基配列の解析により目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。

第4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

- (1) 遺伝子の既存品種への導入方法に関する事項

既存品種に、導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入した後、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、ベクターバックボーンをもたない個体を PCR 法及びサザンブロット分析により選抜した。選抜した個体について 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^dと交配し、Cre/lox 法により T-DNA 領域から選択マーカーとして用いた *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び *loxP* 配列の一つが除去された個体を作成した。その後、自殖により Cre リコンビナーゼ発現カセットを持たない個体を選抜してトウモロコシ MON95275 が得られた。

- (2) 遺伝子組換え栽培系統に関する事項 (系統の考え方に基づいた記述、育成図)

トウモロコシ MON95275 について、形質転換個体の選択方法、個体の継代方法及び系統の考え方が育成図等で示されており、食品健康影響評価を実施する世代及び系統の範囲は特定されている。

- (3) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

トウモロコシ MON95275 のゲノムに導入された挿入 DNA のコピー数、ベクターバックボーンの有無及び挿入近傍配列を確認するために、次世代シーケンス解析、PCR 分析及び塩基配列解析を実施した。

トウモロコシ MON94804 のシーケンス解析で得た塩基配列 (リード) の平均リード深度は 253 であった。得られたリードの全てを導入用プラスミド PV-ZMIR525664 と照合した結果、トウモロコシ MON95275 では、導入された DNA 領域の 5' 末端配列及び 3' 末端配列を含む 2 つの接合領域が特定され、目的の DNA 領域が 1 箇所に 1 コピー導入されたことが示された。また、トウモロコシ MON94804 において導入用プラスミド PV-ZMIR525664 に由来する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

^d LH244 Cre 系統は、従来トウモロコシ品種 LH244 系統を既存品種とし、導入用プラスミド PV-ZMOO513642 を用いたアグロバクテリウム法による形質転換を行うことで作出された。T-DNA 領域をホモで有し、ベクターバックボーンを持たない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。

組換えトウモロコシ系統の導入用プラスミド PV-ZMOO513642 の配列と照合した結果、トウモロコシ MON95275 には PV-ZMOO513642 に由来する配列は存在しないことが確認された。さらに、トウモロコシ MON95275 に導入された DNA 領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の目的の挿入 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（参照 22）。

また、トウモロコシ MON95275 に導入された DNA の近傍配列が既存品種のゲノム由来であることを確認するために、トウモロコシ MON95275 に導入された DNA 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、既存品種を用いて 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 MON95275 の近傍配列と比較した。その結果、トウモロコシ MON95275 の近傍配列において、既存品種のゲノムと比較して 746 bp の欠失及び 6 bp の付加が認められた。このことを除き、トウモロコシ MON95275 の近傍配列と既存品種の塩基配列は一致しており、導入された DNA 領域の近傍配列が既存品種のゲノム由来であることが確認された（参照 22）

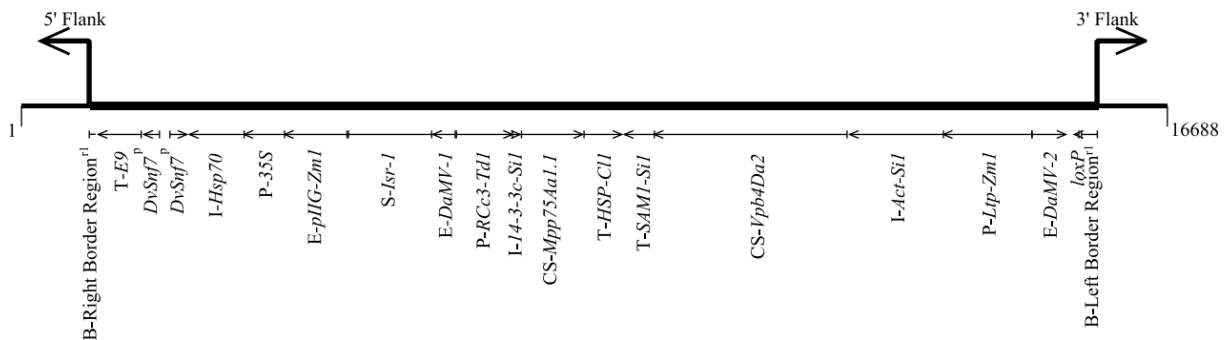


図 トウモロコシ MON95275 のゲノム DNA 中に導入された DNA 領域（模式図）
 図中の「rl」の表記は、トウモロコシ MON95275 に導入された Right Border Region 及び Left Border Region が導入用プラスミド PV-ZMIR525664 と比較して短くなっていることを意味する。また、*DvSnf7^P* における「P」は部分配列であることを意味する。

（4）遺伝子組換え栽培系統における導入遺伝子の安定性に関する事項

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に、5 世代のトウモロコシ MON95275 の穀粒から抽出されたゲノム DNA を用いて、次世代シーケンス解析を行った。その結果、各世代において導入された DNA 領域に起因する 2 つの接合領域のみが検出され、導入された DNA 領域が世代間で安定していることが確認された（参照 22）。

（5）ORF の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

① 境界領域における ORF の解析

トウモロコシ MON95275 に導入された DNA 領域の 5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列との接合部位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通りの読み枠（表3通り、裏3通り）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アミノ酸以上の意図しないORFが10個検出された（参照37）。

これらのORF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、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する80アミノ酸に対して35%を超える相同性を示す配列及び連続する8アミノ酸との相同性を示す配列は検出されなかった（参照37）。

また、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、毒性タンパク質データベース^f及びタンパク質データベース^gを用い、E-score $\leq 1 \times 10^{-5}$ を基準としたFASTA型アルゴリズムにより相同性検索を行った。その結果、既知毒性タンパク質と相同性を示す配列は検出されなかった。

② 導入されたDNA領域の解析

トウモロコシMON95275に導入されたDNA領域において、意図しないタンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と構造相同性を有するかを確認するため、導入されたDNA領域の6通りの読み枠（表3通り、裏3通り）から翻訳された全てのアミノ酸配列について、相同性検索を行った。

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、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する80アミノ酸に対して35%を超える相同性を示す配列は検出されなかった。また、既知のアレルゲンと連続する8アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索した結果、6通りの読み枠のうち、2つの読み枠におけるアミノ酸配列が一致を示した。このうち1つの読み枠におけるアミノ酸配列は、コムギのセリンカルボキシペプチダーゼIIと推定される配列(TSSSSSSS又はSSSSSSSS)及びスケトウダラのビテロジェニンAの部分配列(SSSSSSSS)との間にそれぞれ一致を示した。セリンカルボキシペプチダーゼIIは、ファージディスプレイを用いた*in vitro*のスクリーニングにおいて食品アレルギー患者の血清に由来するIgEとの結合が観測されたという報告(参照38)をもとにアレルゲンのデータベースに加えられたものであり、当該タンパク質がアレルギー誘発性を有する知見はなく、当該配列のアレルギー誘発性の懸念はないと思われる。また、ビテロジェニンは、魚卵の卵黄アレルゲン(β' -c)の前駆タンパク質であり、この β' -cのIgEエピトープとして同定されている5種類のペプチ

^e AD_2023: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) から2023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で、2,631配列を含む。

^f TOX_2023: Swiss-Prot database (URL: <https://www.uniprot.org/>、ダウンロード日: 2023年1月) から抽出された毒性タンパク質配列のデータベースで、7,227配列を含む。

^g PRT_2023: NCBI FTP server (https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi-asn1/protein_fasta/) から2023年1月にダウンロードしたタンパク質配列のデータベースで、242,830,012配列を含む。

ドに今回一致した部分配列 (SSSSSSSS) は該当していない (参照 40)。以上のことから、これらの 8 アミノ酸配列の一致は、アレルゲンに関わる構造相同性を反映したものであるとは考え難い。

残り 1 つの読み枠におけるアミノ酸配列は、ゴールデンハムスターの **major urinary protein-like lipocalin 2 precursor** の配列との間に一致を示した。しかしながら、このアミノ酸配列には、開始コドンがコードするメチオニンが欠如しているため、タンパク質を発現しないと考えられた。

また、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、毒性タンパク質データベース^fを用い、 $E\text{-score} \leq 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、*mpp75Aa1.1* 遺伝子が Q02307 の配列と、*vpb4Da2* 遺伝子が P13423 の配列とそれぞれ相同性を示したが、毒性発現に重要な受容体結合ドメインにおいて相同性が低かったことから、毒性をもつとは考えにくい (第 3 の 4 (1) ②参照)。さらに、タンパク質データベース^gを用い、 $E\text{-score} \leq 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、6 通りの読み枠すべてにおいて相同性を示す配列が検出された。このうち、2 つの読み枠において相同性を示したアミノ酸配列については、複数のストップコドンを含んでおり、残る 4 つの読み枠において相同性を示したアミノ酸配列は、導入された DNA 領域中の意図したタンパク質を産生する配列 (*mpp75Aa1* 遺伝子、*vpb4Da2* 遺伝子及び *DvSnf7* 遺伝子の部分配列) 及びタンパク質を産生しない配列 (35S プロモーター、*DaMV-1* エンハンサー及び *DaMV-2* エンハンサー) であり、非意図的な翻訳が生じないと考えられる。

以上のことから、仮にトウモロコシ MON95275 に導入された DNA 領域において意図しないタンパク質が産生され、又はその両末端近傍配列に跨る塩基配列に由来する領域が翻訳されたとしても、それらがアレルゲン、毒性タンパク質及び有害な生理活性タンパク質を産生する可能性は低いと考えられた。

2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

トウモロコシ MON95275 の根、葉、花粉、地上部及び穀粒における、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列の転写産物 (RNA) の発現量を Quanti Gene アッセイにより分析した (参照 41、42)。さらに、*Mpp75Aa1.1* タンパク質及び *Vpb4Da2* タンパク質の発現量を ELISA 法により分析した。結果は表 2 のとおりである。

表2 トウモロコシ MON95275 中に産生される遺伝子産物の部位、時期別産生量

($\mu\text{g/g}$ 乾物重)

遺伝子産物	採取部位	採取時期	平均値 (標準誤差) 最小値 - 最大値	定量下限/検出限界
DvSn17 遺伝子の部分配列の RNA	葉	2~4 葉期	48×10^{-3} (3.4×10^{-3}) 29×10^{-3} - 100×10^{-3}	3.7×10^{-4} / 0.85×10^{-4}
	根	2~4 葉期	46×10^{-3} (9.4×10^{-3}) 3.8×10^{-3} - 166×10^{-3}	1.3×10^{-4} / 0.30×10^{-4}
	地上部	黄熟期	20×10^{-3} (2.5×10^{-3}) 7.1×10^{-3} - 42×10^{-3}	0.81×10^{-4} / 0.18×10^{-4}
	穀粒	成熟期	0.28×10^{-3} (0.021×10^{-3}) 0.11×10^{-3} - 0.46×10^{-3}	0.21×10^{-4} / 0.047×10^{-4}
	花粉	雄穂抽出期 ~ 絹糸抽出期	0.47×10^{-3} (0.091×10^{-3}) 0.097×10^{-3} - 1.5×10^{-3}	0.26×10^{-4} / 0.059×10^{-4}
Mpp75Aa1.1 タンパク質	葉	2~4 葉期	100 (7.0) 43 - 200	0.125/0.023
	根	2~4 葉期	35 (4.3) 11 - 84	0.125/0.053
	地上部	黄熟期	16 (0.76) 12 - 25	0.125/0.039
	穀粒	成熟期	1.3 (0.086) 0.67 - 1.9	0.125/0.065
	花粉	雄穂抽出期 ~ 絹糸抽出期	<LOQ (NA) NA - NA	0.125/0.043
Vpb4Da2 タンパク質	葉	2~4 葉期	39 (1.8) 19 - 51	0.313/0.110
	根	2~4 葉期	14 (1.3) 3.4 - 26	0.313/0.128
	地上部	黄熟期	3.3 (0.13) 2.5 - 4.8	0.313/0.124
	穀粒	成熟期	1.2 (0.086) 0.42 - 1.9	0.157/0.067
	花粉	雄穂抽出期 ~ 絹糸抽出期	<LOQ (NA) NA - NA	0.157/0.082

*n=20

※ NA: 該当なし。

3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項

(1) 遺伝子産物がヒトのタンパク質一日摂取量において有意な量を占めるかについて

日本人一人が一日に摂取する「とうもろこし・加工品」の平均摂取量 1.0 g^a の原料を全てトウモロコシ MON95275 に置き換えて Mpp75Aa1.1 タンパク質及び Vpb4Da2 タンパク質の推定摂取量を計算すると、それぞれ $1.3 \mu\text{g}$ 及び $1.2 \mu\text{g}$ となり、その合計が一人一日当たりのタンパク質摂取量 71.4 g に占める割合は $3.5 \times 10^{-6}\%$ となる。したがって、一日のタンパク質の摂取量の有意な量

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（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合にはその遺伝子産物についても評価すること。）

- (1) 導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかであること。

mpp75Aa1.1 遺伝子の供与体である *Bre. laterosporus* のアレルギー誘発性の報告はない。*vpb4Da2* 遺伝子の供与体である *Bac. thuringiensis* の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）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。

Mpp75Aa1.1 タンパク質及び **Vpb4Da2** タンパク質がアレルギー誘発性をもつという報告はない。

- (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 **Mpp75Aa1.1** タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた **Mpp75Aa1.1** 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（タンパク質染色）分析を行った結果、**Mpp75Aa1.1** タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 30 秒後には消失したが、3.5 kDa から 6 kDa の位置に試験開始 2 分後までバンドが確認された。ウエスタンブロット分析では、**Mpp75Aa1.1** タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 30 秒後には消失し、3.5 kDa から 6 kDa の位置のバンドも検出されなかった（参照 26、43）。

b. 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた **Mpp75Aa1.1** 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、ウエスタンブロット分析を行った結果、**Mpp75Aa1.1** タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 15 分以内に消失したが、完全長とは異なる複数のバンドが試験開始 24 時間後まで検出された（参照 26）。

c. 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた **Mpp75Aa1.1** 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、各温度帯で 15 分間又は 30 分間加熱処理した後、WCR に対する 7 日間の給餌試験後の半数影響濃度（EC₅₀）を指標とした生物検定を行った。その結果、75℃又は 95℃で 15 分間又は 30 分間の

処理時間のいずれにおいても、用量反応関係が観測されず、EC₅₀を算出することができなかった（参照 44）。

また、SDS-PAGE（タンパク質染色）分析の結果、Mpp75Aa1.1 タンパク質の完全長と考えられるバンドは、95℃で 15 分間又は 30 分間加熱処理した場合にその強度が低下し、また、75℃又は 95℃で 15 分間又は 30 分間の処理時間のいずれにおいても、低分子量のバンドが増加したことが確認された（参照 44）。

② Vpb4Da2 タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた Vpb4Da2 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（タンパク質染色）分析を行った結果、Vpb4Da2 タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 30 秒後には消失したが、2.5 kDa から 6 kDa の位置に試験開始 5 分後までバンドが確認された。ウェスタンブロット分析では、Vpb4Da2 タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 30 秒後には消失し、2.5 kDa から 6 kDa の位置のバンドも検出されなかった（参照 45、43）。

b. 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた Vpb4Da2 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結果、Vpb4Da2 タンパク質の完全長と考えられるバンドは試験開始 5 分以内に消失したが、約 60 kDa より小さい複数のバンドが試験開始 1 時間後まで検出された（参照 45）。

c. 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた Vpb4Da2 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、各温度帯で 15 分間又は 30 分間加熱処理した後、WCR に対する 7 日間の給餌試験後の半数影響濃度（EC₅₀）を指標とした生物検定を行った。その結果、55℃、75℃又は 95℃で 15 分間又は 30 分間の処理時間のいずれにおいても、用量反応関係が観測されず、EC₅₀を算出することができなかった（参照 46）。

また、SDS-PAGE（タンパク質染色）分析の結果、Vpb4Da2 タンパク質の完全長と考えられるバンドは、95℃で 30 分間の加熱処理によりその強度が 10 分の 1 以下に低下し、また、55℃、75℃又は 95℃で 15 分間又は 30 分間の処理時間のいずれにおいても、低分子量のバンドが増加したことが確認された（参照 46）。

(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
与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関
する事項

Mpp75Aa1.1 タンパク質及び **Vpb4Da2** 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^hを用いて相同
性検索を行った。検索方法については、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 アミノ酸以上の配列が一
致する配列を検索した。

その結果、**Mpp75Aa1.1** タンパク質及び **Vpb4Da2** タンパク質について、既
知のアレルゲンとの相同性は認められなかった（参照 18）。

上記（1）から（4）まで及び前項 3 から総合的に判断し、**Mpp75Aa1.1** タン
パク質及び **Vpb4Da2** タンパク質については、アレルギー誘発性の可能性は低い
ことを確認した。

5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項（既存品種及び既存品 種に近縁な種に含まれる基質と反応する可能性に関する事項を含む。）

DvSnf7 遺伝子の部分配列の発現カセットの発現により産生される *DvSnf7*
dsRNA は、トウモロコシの内在性遺伝子に由来するものではなく、コウチュウ目
ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間で高度に保存されている遺伝子配
列であるため、既存品種であるトウモロコシの遺伝子の発現を抑制することはない
と考えられる。また、当該発現カセットから産生される *DvSnf7* dsRNA は、既
に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了しているトウモロコシ MON87411
系統^lにおいて発現する *DvSnf7* dsRNA の塩基配列と同じ配列であり、トウモロ
コシ中の転写産物の配列と *DvSnf7* 遺伝子の部分配列（*DvSnf7* dsRNA に相当す
る配列）との間に 21 塩基長の一致が存在しないことが確認されていることから、
DvSnf7 dsRNA がトウモロコシの内在性遺伝子の発現を抑制することによって
内在性遺伝子が関与する代謝系を変化させることはないと考えられる。

さらに、dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため（参照 47、
48）、*DvSnf7* dsRNA が新たなタンパク質を発現する可能性は極めて低い。

以上のことから、*DvSnf7* 遺伝子の部分配列の発現カセットの発現により産生
される *DvSnf7* dsRNA が既存品種の代謝系を変化させることはないと考えられ
る。

また、**Mpp75Aa1.1** タンパク質及び **Vpb4Da2** タンパク質が酵素活性をもつと
の報告はなく、トウモロコシ MON95275 がこれらのタンパク質の発現により、
新たな代謝経路又は代謝産物を作ることは考えにくく、次項に記載する構成成分
分析の結果からも、これらのタンパク質が代謝経路に影響しないことが確認され

^h AD_2021: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) から 2021 年 2 月にダウ
ンロードしたアレルゲン配列のデータベースで、2,348 配列を含む。

ている。

6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項

(1) 既存品種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 MON95275 と非組換えトウモロコシについて、穀粒及び地上部の主要構成成分、アミノ酸、脂肪酸、ミネラル類、ビタミン類、栄養阻害物質及び二次代謝産物の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 49）。

① トウモロコシ穀粒における構成成分

a. 主要構成成分

穀粒の主要構成成分（総食物繊維、粗タンパク質、粗脂肪、酸性及び中性デタージェント繊維、灰分、炭水化物）について分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

b. アミノ酸

穀粒のアミノ酸 18 成分について分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

c. 脂肪酸

穀粒の脂肪酸 9 成分について分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間でパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸及びアラキジン酸に統計学的有意差が認められたが、トウモロコシ MON95275 のこれら 7 項目の平均値は、文献値の範囲内であった（参照 2）。

d. ミネラル類

穀粒の無機質（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛）について分析を行った結果、カルシウムに統計学的有意差が認められたが、トウモロコシ MON95275 の平均値は、文献値の範囲内であった（参照 2）。

e. ビタミン類

穀粒のビタミン A（ β -カロテン）、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、ビタミン B₆（ピリドキシシン）に統計学的有意差が認められたが、トウモロコシ MON95275 の平均値は、文献値の範囲内であ

ⁱ トウモロコシ MON95275 と同じ遺伝的背景をもつ

った（参照 2）。

f. 栄養阻害物質

穀粒の栄養阻害物質（フィチン酸、ラフィノース）について分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

g. 二次代謝産物

穀粒の二次代謝産物（フェルラ酸、*p*-クマル酸）について分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

② トウモロコシ地上部における構成成分

地上部の粗タンパク質、粗脂肪、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、灰分、カルシウム及びリンについて分析を行った結果、対照の非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

(2) 遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項

トウモロコシ MON95275 は、「遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針」別添 1 ①「導入された遺伝子によって、既存品種の代謝系には影響なく、害虫抵抗性、除草剤耐性、ウイルス抵抗性などの形質が付与されるもの。」に分類されるものである。

7. 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、2023 年 6 月に米国食品医薬品庁（FDA）により食品及び飼料としての安全性の確認が終了した。

オーストラリア・ニュージーランドにおいては、2023 年 10 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）により食品としての利用が承認された。

カナダにおいては、2024 年 9 月にカナダ保健省（Health Canada）により食品としての利用が、カナダ食品検査庁（CFIA）により飼料としての利用が承認された。

欧州においては、欧州食品安全機関（EFSA）に対して食品及び飼料としての安全性審査を申請中である。

第 5. 第 1 から第 4 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 1 から第 4 までの事項により、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トウモロコシ MON95275 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）に関する食品健康影響評価指針」に基づき評価した結果、人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. OECD: Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). 2003
4. 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
5. AFSI. 2024. Crop Composition Database, Version 10.0. Agriculture & Food Systems Institute, Washington, D.C. <https://www.cropcomposition.org/> [Accessed December 3, 2024].
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. 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
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. 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
10. Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR525664 (社内文書)
11. Bolognesi, R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J.G. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G. Heck and G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* 7: e47534.
12. Bachman, P.M., R. Bolognesi, W.J. Moar, G.M. Mueller, M.S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J.P. Uffman, J. Warren, B.E. Wiggins and S.L. Levine. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research* 22: 1207-1222.
13. Kouadio J L, Duff S, Aikins M, Zheng M, Rydel T, Chen D et al.: Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a putative beta-pore

- forming protein from *Brevibacillus laterosporus* active against the western corn rootworm. *PLoS One* 2021; 16: e0258052
14. Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Mpp75Aa1.1 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000993) (社内文書)
 15. Kouadio J L, Zheng M, Aikins M, Duda D, Duff S, Chen D et al.: Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. *PLoS One* 2021; 16: e0260532
 16. Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Vpb4Da2 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000994) (社内文書)
 17. Bowen D, Yin Y, Flasiński S, Chay C, Bean G, Milligan J et al.: Cry75Aa (Mpp75Aa) Insecticidal Proteins for Controlling the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*, (Coleoptera: Chrysomelidae), Isolated from the Insect Pathogenic Bacteria *Brevibacillus laterosporus*. *Appl Environ Microbiol* 2021; 87
 18. Amended From TRR0000931: Updated Bioinformatics Evaluation of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 in MON 95275 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001416) (社内文書)
 19. Fling M E, Kopf J, and Richards C: Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 7095-106
 20. Coruzzi G, Broglie R, Edwards C, and Chua N H: Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Embo j* 1984; 3: 1671-9
 21. Hunt A G: Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1994; 45: 47-60
 22. Amended from TRR0001330: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON 95275 (REG-2019-0551) (社内文書)
 23. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
 24. 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.
 25. Huang, Y.-F., W.R. Jordan, R.A. Wing and P.W. Morgan. 1998. Gene expression induced by physical impedance in maize roots. *Plant Molecular Biology* 37: 921-930.
 26. Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*

- 313: 810-812.
27. 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.
 28. Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.
 29. Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2007b. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 2007/0124836 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
 30. Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002. ESCRT-20 III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell* 3: 271-282.
 31. Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. *Russian Journal of Genetics* 43: 1413-1414
 32. Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.
 33. Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 326: 277-290.
 34. Yin, Y., S. Flasiniski, W. Moar, D. Bowen, C. Chay, J. Milligan, J.-L. Kouadio, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, J. Zhang, G. Mueller, C. Preftakes, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2020. A new *Bacillus thuringiensis* protein for Western corn rootworm control. *PLoS ONE* 15: e0242791.
 35. 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.
 36. 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.
 37. Amended From TRR0000932: Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 95275 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001434) (社内文書)
 38. Weichel M, Vergoossen NJ, Bonomi S, Scibilia J, Ortolani C, Ballmer-Weber BK, Pastorello EA, Cramer R. 2006. Screening the allergenic repertoires of wheat and maize with sera from double-blind, placebo-controlled food challenge positive patients. *Allergy*. 61(1):128-35.

39. Nakajima O, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. 2016. Cas9 in Genetically Modified Food Is Unlikely to Cause Food Allergy. *Biol Pharm Bull.* 39(11):1876-1880.
40. 佐伯宏樹 2012 魚卵アレルギーにおける交差性成立機構の解明 科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書 平成 24 年 5 月 23 日 <https://kaken.nii.ac.jp/ja/file/KAKENHI-PROJECT-21580245/21580245seika.pdf> [Accessed February 7, 2025]
41. Assessment of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Protein Levels in Maize Leaf, Root, Forage, Grain, and Pollen Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Field Sites of United States Field Trials During 2019 (TRR0000722) (社内文書)
42. Assessment of DvSnf7.1 RNA Levels in OSL1, OSR1, Forage, Grain, and Pollen Maize Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Sites in the United States Field Trials during 2019 (TRR0000653) (社内文書) 26. Amended Report for TRR0000731: Assessment of the in vitro Digestibility of Escherichia coli-produced Mpp75Aa1.1 Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0000731) (社内文書)
43. Supplemental Information of TRR0000731 and TRR0000596: Western Blot Analysis of the Degradation of Vpb4Da2 and Mpp75Aa1.1 Proteins (社内文書)
44. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of Escherichia coli-produced Mpp75Aa1.1 Protein (TRR0000870) (社内文書)
45. Assessment of the in vitro Digestibility of Escherichia coli-produced Vpb4Da2 Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0000596) (社内文書)
46. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of Escherichia coli-produced Vpb4Da2 Protein (TRR0000871) (社内文書)
47. Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
48. Hinnebusch, A.G. 2011. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 434-467
49. Compositional Analyses of Maize Grain and Forage Harvested from MON 95275 Grown in the United States During the 2019 Season (MSL0030998) (社内文書)