

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた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 系統に係る食品健康影響評価（平成 27 年 4 月 22 日付け厚生労働省発食安 0422 第 1 号）については、平成 28 年 2 月 26 日に開催された第 146 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. 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 系統に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 28 年 4 月 19 日（火）開催の食品安全委員会（第 603 回会合）の翌日の平成 28 年 4 月 20 日（水）から平成 28 年 5 月 19 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

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
除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
MON87411 系統

2016年4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	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	7
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	7
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..	8
6. 安全な摂取に関する事項	8
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	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
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	12
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	13
5. 構築された発現ベクターに関する事項	13
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	15
第 6. 組換え体に関する事項	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.....	17
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.....	18
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.....	18
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	19
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.....	20
7. 宿主との差異に関する事項.....	20
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	22
9. 栽培方法に関する事項.....	22
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	22
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.....	22
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	22
<参照>.....	24

<審議の経緯>

- 2015年4月24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（厚生労働省発食安0422第1号）、関係書類の接受
- 2015年4月28日 第559回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2015年5月25日 第137回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年2月26日 第146回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年4月19日 第603回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2015年6月30日まで	2015年7月1日から
熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑
石井 克枝	石井 克枝
上安平 洵子	堀口 逸子
村田 容常	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>

2015年9月30日まで		2015年10月1日から	
澤田 純一（座長）		澤田 純一（座長）	
小関 良宏（座長代理）		小関 良宏（座長代理）	
宇理須 厚雄	手島 玲子	岡田 由美子	中島 春紫
岡田 由美子	中島 春紫	橘田 和美	樋口 恭子
橘田 和美	飯 哲夫	児玉 浩明	飯 哲夫
児玉 浩明	和久井 信	近藤 一成	山川 隆
近藤 一成		柘植 郁哉	和久井 信
		手島 玲子	

要 約

「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」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、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*) の *Snf7* 遺伝子 (*DvSnf7* 遺伝子) の一部を逆方向反復の形で導入して作出されており、二本鎖 RNA (dsRNA) を発現する。コウチュウ目害虫であるコーンルートワーム属種 (*Diabrotica* spp.) が本トウモロコシを摂取し、dsRNA が細胞内に取り込まれることにより、RNAi が誘導され、細胞機能の維持に必要な *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。また、*Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* 及び *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、改変 *Cry3Bb1* タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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リホサート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。

また、dsRNA の安全性については、イネ等の食用作物には長短の dsRNA が存在することが知られており dsRNA は安全に食されてきた経験があること、ヒトを含めた脊椎動物に経口摂取された RNA はリボヌクレアーゼ等多様な分解酵素により分解されること、ヒト転写物データベースには *DvSnf7* 遺伝子断片由来の dsRNA の標的となる配列は存在しないこと、植物中に存在する RNA 量に対して *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 量が非常に少ないこと等から、ヒトに対して意図しない影響を及ぼす可能性は低いとしている。

したがって、「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」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リホサート耐性トウモロコシ
MON87411 系統

性質：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「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」（以下「トウモロコシ MON87411」という。）は、ウエスタンコーンルートワームの *Snf7* 遺伝子 (*DvSnf7* 遺伝子) の一部を逆方向反復の形で導入して作出されており、二本鎖 RNA (dsRNA) を発現する。コウチュウ目害虫であるコーンルートワーム属種 (*Diabrotica* spp.) がトウモロコシ MON87411 を摂取し、dsRNA が細胞内に取り込まれることにより、RNAi が誘導され、細胞機能の維持に必要な *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。

また、*Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* に由来する改変 *cry3Bb1* 遺伝子が導入されており、改変 *Cry3Bb1* タンパク質を発現することで、コウチュ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。

さらに、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサート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* L.) のデント種 LH244 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

DvSnf7 遺伝子断片の供与体は、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*、以下「WCRW」という。) である。改変 *cry3Bb1* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* である。改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、*Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

DvSnf7 遺伝子断片は、WCRW の *DvSnf7* 遺伝子の一部領域を逆方向反復の形で導入することにより dsRNA を発現するように設計されている。dsRNA はトウモロコシ MON87411 の経口摂取を通じてコウチュウ目害虫であるコーン

ルートワーム属種の細胞内に取り込まれ、RNAi が誘導され、その結果 *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで殺虫活性を示す。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する改変 *Cry3Bb1* タンパク質を発現する。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する改変 *CP4 EPSPS* 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、世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。

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 6.2～17.3%、総脂質 1.7～5.9%、総食物繊維 9.0～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.5%である（参照 1）。

(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）の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.1～1.6%、ラフィノース 0.02～0.32%である（参照 1, 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 MON87411 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 MON87411 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 MON87411 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 MON87411 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 MON87411 は、*DvSnf7* 遺伝子断片、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の導入によって、*DvSnf7* 遺伝子断片由来 dsRNA、改変 *Cry3Bb1* タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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 MON87411 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 MON87411 は、導入された *DvSnf7* 遺伝子断片及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子が dsRNA 及び改変 *Cry3Bb1* タンパク質を発現することによって、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育することができるとされている。また、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子が改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することができるとされている。

なお、コウチュウ目害虫抵抗性は、異なった作用機作である RNAi 及び殺虫性タンパク質 (Bt タンパク質) の発現を併用して付与されており、WCRW がトウモロコシ MON87411 への抵抗性を獲得するリスクを軽減することが期待されているとしている。

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 (*Z. mays* L.) 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。現在では世界的に広く栽培されている。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシ種子には、フィチン酸、ラフィノースが含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシによるアレルギー誘発性の報告は少なく、重要なアレルギー誘発食品とは考えられていない。

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 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 3, 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が知られているが、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 MON87411 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の構築にはベクターD が用いられた。

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

ベクターD 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

ベクターD 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

ベクターD 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

ベクターD 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

ベクターD 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

DvSnf7 遺伝子断片の供与体は、WCRW である。改変 *cry3Bb1* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* である。改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は *Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(2) 安全性に関する事項

DvSnf7 遺伝子断片の供与体である WCRW は、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る（参照 5）。改変 *cry3Bb1* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* 及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. は、ヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

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若しくは合成方法に関する事項

DvSnf7 遺伝子断片は、WCRW から抽出した *Snf7* 遺伝子の RNA を逆転写した後、PCR 法にて合成した。*DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットは、*DvSnf7* 遺伝子断片（240 塩基）を、ヘアピン構造を形成するための介在配列（150 塩基）を挟んで逆方向に反復させる構成で作製されており、*DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットが転写されると、ヘアピン構造を有した dsRNA が発現する。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* からクローニングされた *cry3Bb1* 遺伝子に、殺虫活性を増強する目的で改変を加えたものである。改変 *Cry3Bb1* タンパク質は野生型 *Cry3Bb1* タンパク質と比較して、6 箇所のアミノ酸が置換されている。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現が最適となるように *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列を改変することによって構築された遺伝子である。クローニングの過程で、*cp4 epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

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、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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *DvSnf7* 遺伝子断片由来の dsRNA

i. *DvSnf7* 遺伝子断片を導入したトウモロコシ MON87411 の作用機作

トウモロコシ MON87411 は、WCRW の細胞機能の維持に必須である

DvSnf7 タンパク質をコードする *DvSnf7* 遺伝子由来の dsRNA を発現していることが確認されている (参照 6)。WCRW が dsRNA を摂取し、60 塩基対以上の dsRNA が効率的に中腸細胞より取り込まれる機構により細胞内で RNAi が誘導され、その結果、*DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制される。この作用は WCRW の中腸細胞だけでなく体組織でも観察されるとしている (参照 7)。*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により分解するための選別に関する ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) -III の構成タンパク質である。WCRW 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、WCRW は死に至るとしている (参照 8)。

ii. *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫スペクトル

14 種類の昆虫に対して、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA の殺虫活性を調べるために、合成した当該 dsRNA を混餌投与 (最高濃度 : 5,000 ng/mL diet) し、生物検定を行った。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 WCRW 及びサザンコーンルートワームにおける LC₅₀ (半数致死濃度) は、4.4 及び 1.2 ng/mL diet であり、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属するこの 2 種類の昆虫にのみ殺虫活性が認められた (参照 9)。この dsRNA の標的昆虫に対する特異性を確認するため、WCRW の近縁の 9 種類の昆虫の *DvSnf7* 遺伝子断片に相当する配列を特定し、相同性を調査した結果、コウチュウ目ハムシ科のヒゲナガハムシ亜科以外の亜種に属する昆虫の配列と *DvSnf7* 遺伝子断片との相同性は 82.1% 以下であり、これらの亜種に属する昆虫の *Snf7* 遺伝子と *DvSnf7* 遺伝子断片との間で 21 塩基が一致する配列はなかった (参照 9)。

iii. *DvSnf7* 遺伝子断片のヒトに対する安全性

イネ、インゲンマメ、オオムギ等の食用作物には長短の dsRNA が存在することが知られており、イネ子実にはヒトの細胞周期調整、代謝酵素等の重要な遺伝子配列と 100% の相同性がある低分子の RNA が存在することが報告されている (参照 10, 11)。これらのことから、dsRNA は安全に食されてきた経験があるとしている。実際に、トウモロコシ転写産物データベースとヒトの転写産物配列との相同性検索を行い、21 塩基以上が完全に一致する配列を検索した結果、トウモロコシの転写産物配列中に複数のヒト転写産物との 21 塩基以上の一致があることが示されている (参照 12)。

ヒトを含めた脊椎動物では、経口摂取された全ての核酸は、消化管内のリボヌクレアーゼ等により分解されるとしており、仮に消化管内で分解されなかったとしても血中に存在するリボヌクレアーゼにより分解されると考えられる。RNA 分子が細胞内へ取り込まれない限りは標的とする遺伝子の発現は抑制されないが、RNA 分子の生化学的特性から腸上皮組織細胞膜を透過できず、全組織へ運搬されることは困難である。したがって、トウモロコシ MON87411 の *DvSnf7* 遺伝子断片由来の dsRNA は、ヒトや哺乳動物の細胞内へ取り込まれ

る可能性は低いとしている（参照 13, 14, 15）。

ヒトに対する Off-target 効果を評価するため、ヒトの転写産物配列において *DvSnf7* 遺伝子断片に由来する連続する 21 塩基の一致が存在するかどうか相同性検索を行った。その結果、一致する配列は認められず、ヒト転写物データベースには *DvSnf7* 遺伝子断片由来の dsRNA の標的となる配列は存在しなかった（参照 16）。

また、経口摂取した RNA による哺乳動物への影響に関する研究の報告がある。マウスにイネ子実を摂取させた試験において、イネ由来の miRNA が、それと相同性を有するマウス遺伝子がコードするタンパク質の発現を抑制させた可能性を示唆する結果が報告されているが（参照 17）、この報告を検証する試験では同様の結果は再現されず、マウスに投与された餌の栄養的差異による結果とされている（参照 18）。また、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）は、これまで発表された科学的根拠からは、食品中に存在する dsRNA がヒトにとって有害であるという見解は支持されず、したがって、これまでの安全性評価法が適用されるとの見解を公表している（参照 19, 20）。また、霊長類に経口投与した RNA が miRNA として血液中に検出されることはないと報告されている（参照 21）。さらに、普遍的に植物中に存在する RNA 量に対して *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 量が非常に少ないこと（参照 22）からヒトに対して意図しない影響を及ぼす可能性は低いとしている。

・改変 *cry3Bb1* 遺伝子

改変 *cry3Bb1* 遺伝子がコードする改変 Cry3Bb1 タンパク質は、コウチュウ目害虫等に殺虫活性を示すタンパク質（Cry タンパク質）の一種である。Bt タンパク質は、標的昆虫に摂取されると消化されて活性コアタンパク質となり、これが中腸に作用し、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 23）。

改変 Cry3Bb1 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^a）を用いて FASTA 検索を行った結果、E-score が 1×10^{-5} 以下であるタンパク質が 1 個確認されたが、改変 Cry3Bb1 タンパク質と同様の機能的構造を共有しているとは考えられなかった。したがって、改変 Cry3Bb1 タンパク質と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 24）。

・改変 *cp4 epsps* 遺伝子

改変 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする改変 CP4 EPSPS タンパク質は、CP4 EPSPS タンパク質の改変タンパク質である。CP4 EPSPS タンパク質は、

^a TOX_2013: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版, 2009 年 12 月 15 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) をもとに作成したデータベースで、8,448 配列のサブセット。

EPSPS 活性を阻害する除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示すことができる。

改変 CP4 EPSPS 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_2013a) 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 25)。

(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-ZMIR10871 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、トウモロコシ MON87411 には検出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

DvSnf7 遺伝子断片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 *CaMV35S* プロモーター及びリーダー配列を基に作製された *e35S* プロモーターである (参照 26)。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシの物理的インピーダンス誘導タンパク質をコードする *pIIG* 遺伝子のプロモーターである (参照 27)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、イネの α チューブリンをコードする *OsTubA* 遺伝子ファミリーの 5' 末端非翻訳プロモーター由来の *TubA* プロモーターである (参照 28, 29)。

(2) ターミネーターに関する事項

DvSnf7 遺伝子断片発現カセットのターミネーターは、エンドウのリブローソム-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* 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域である (参照 30)。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギの熱ショックタンパク質 17 の 3' 末端非翻訳領域である (参照 31)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、イネの α チューブリンをコードする *OsTubA* 遺伝子ファミリーの 3' 末端非翻訳領域である (参照 28, 29)。

(3) その他

DvSnf7 遺伝子断片発現カセットには、発現を高めるためにトウモロコシの熱ショックタンパク質 70 遺伝子由来の *Hsp70* イントロンが挿入されている (参照 32)。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットは、発現を高めるコムギ葉緑素 a/b 結合タ

ンパク質の 5' 末端非翻訳リーダー領域である *Cab* リーダー配列、及び発現の制御に関わるイネのアクチン遺伝子の *Ract1* イントロン配列を含む（参照 33, 34）。

また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、発現を制御するイネの α チューブリンをコードする *OsTubA* 遺伝子の *TubA* リーダー配列、*TubA* イントロン配列及び改変 CP4 EPSPS タンパク質を細胞質から葉緑体へ移動させるために、シロイヌナズナの 5-エノールピルビルシキミ酸合成酵素（EPSPS）をコードする *ShkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする *CTP2* 標的配列が挿入されている（参照 35）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを有するベクターD に *DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットを挿入してベクターG を作製し、これに改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットを挿入することによって、導入用プラスミド PV-ZMIR10871 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 PV-ZMIR10871 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-ZMIR10871 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。

(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-ZMIR10871 の意図する挿入領域は、左側境界領域 (LB) から右側境界領域 (RB) 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 PV-ZMIR10871 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純化されている。

表1 トウモロコシ MON87411 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
(DvSnf7 遺伝子断片発現カセット)	
<i>E9</i> ターミネーター	ターミネーター領域 エンドウのリブ羅斯-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> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域
<i>DvSnf7</i>	WCRW 由来の <i>DvSnf7</i> 遺伝子の部分配列 (センス鎖)
ループ配列	<i>in silico</i> で設計されたヘアピン構造を形成するための配列
<i>DvSnf7</i>	WCRW 由来の <i>DvSnf7</i> 遺伝子の部分配列 (アンチセンス鎖)
<i>Hsp70</i>	トウモロコシの熱ショックタンパク質遺伝子由来のイントロン
<i>e35S</i> プロモーター	プロモーター領域 カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター及びリーダー配列
(改変 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>pIIG</i> プロモーター	プロモーター領域 トウモロコシの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
<i>Ract1</i>	イネのアクチン遺伝子の <i>Ract1</i> イントロン配列
改変 <i>cry3Bb1</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の改変 <i>Cry3Bb1</i> タンパク質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 17 の 3'末端非翻訳領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>TubA</i> プロモーター	プロモーター領域 イネの α チューブリンをコードする <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーの 5' 末端非翻訳プロモーター、5' 末端非翻訳リーダー及びイントロン配列
<i>CTP2</i>	シロイヌナズナの EPSPS タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS タンパク質をコードする遺伝子
<i>TubA</i> ターミネーター	ターミネーター領域 イネの α チューブリンをコードする <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーの 3' 末端非翻訳領域
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.</i>

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって *DvSnf7* 遺伝子断片発現カセット、改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した後、グリホサートを添加した培地で選抜して再生個体が得られた。次に、自殖により得た個体について、定量 PCR 分析によりホモ接合体を選抜した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、既存の品種との戻し交配及び自殖を行い、トウモロコシ MON87411 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 MON87411 のゲノムに挿入された T-DNA 領域のコピー数を確認するために、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) を行った。

NGS では、植物ゲノムを約 100 bp の DNA フラグメントに断片化し、冗長度 ^b75 以上で植物ゲノムの塩基配列を解析できるとしている。トウモロコシ MON87411 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、それぞれの平均冗長度は 113~140 であった。

JSA では、全ての DNA フラグメントと導入用プラスミドの塩基配列を blast 検索にて照合し、外骨格領域と相同性のある配列の有無及び T-DNA 領域と植物ゲノムとの接合領域を特定しその数でコピー数を確定するとしている。解析の結果、トウモロコシ MON87411 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、非組換えトウモロコシでは接合領域が 0 であった。トウモロコシ MON87411 の全ての DNA フラグメントに導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の外骨格領域と相同性のある配列はなかった。したがって、トウモロコシ MON87411 のゲノム中に T-DNA 領域が 1 コピー挿入され、導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の外骨格領域がゲノム中に存在しないことが確認された (参照 36)。トウモロコシ MON87411 の挿入 DNA の塩基配列を PCR 法にて解析し、導入プラスミドの T-DNA 領域と比較した結果、同一であることが確認された。

トウモロコシ MON87411 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であるかどうかを確認するために、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用いて PCR 分析及び塩基配列解析を行い、トウモロコシ MON87411 と非組換えトウモロコシを比較した。その結果、トウモロコシ MON87411 の T-DNA 領域の挿入部位に認められた宿主ゲノムの 118 bp の欠

^b 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

失を除き、トウモロコシ MON87411 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 36）。

トウモロコシ MON87411 のゲノムに DNA を挿入することによって宿主の内在性遺伝子が損なわれていないかどうかを確認するために、5'末端近傍配列（1,460 bp）、欠失した 118 bp 及び 3'末端近傍配列（1,803 bp）の計 3,381 bp について、EST データベース（EST_2014^c）、核酸データベース（NT_2014^d）、アミノ酸配列データベース（NR_2014^e）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クエリ配列全体の約 8%以下の長さで短く、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、相同性を示す既知のトウモロコシ由来のタンパク質は見いだされなかった（参照 37）。したがって、DNA の挿入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。

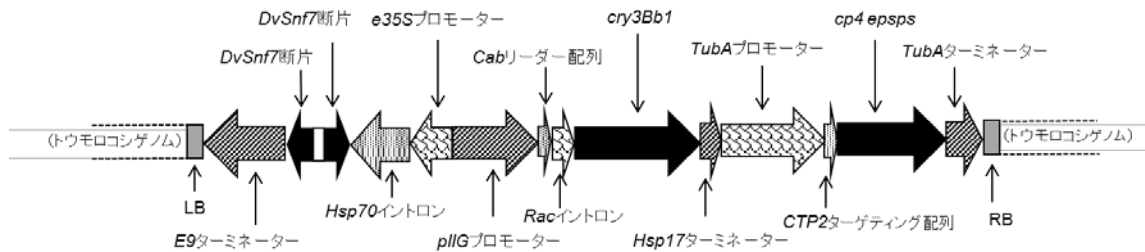


図1 トウモロコシ MON87411 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87411 の挿入 DNA 領域と 5'及び 3'末端近傍配列との接合部において意図しない ORF が生じていないことを確認するために、挿入 DNA 領域（11,248 bp）、5'末端近傍配列（1,460 bp）及び 3'末端近傍配列（1,803 bp）について六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 ORF が 8 個見いだされた。8 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_2013^f）、毒性タンパク質データベー

^c EST_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) EST 配列のデータベースで、64,526,527 配列のサブセット。

^d NT_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) 塩基配列のデータベースで、10,498,010 配列のサブセット。

^e NR_2011 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、10,272,453 配列のサブセット。

^f AD_2010 : Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、1,471 配列のサブセット。

ス (TOX_2013) 及びタンパク質データベース (PRT_2013^g) を用いて FASTA 検索を行った。また、AD_2013 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、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 (参照 38)。

トウモロコシ MON87411 の挿入 DNA 領域において、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同性を有するか調査するため、六つの読み枠について AD_2013、TOX_2013 及び PRT_2013 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有害な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 39)。

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

除草剤グリホサートを散布して栽培したトウモロコシ MON87411 の葉、穀粒、花粉、絹糸、地上部、茎葉及び根について、*DvSnf7* 遺伝子断片の RNA 発現量を QuantiGene[®] Plex 2.0 Assay^h を用いて分析した。また、改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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 40, 41)。

表 2 トウモロコシ MON87411 における *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA 発現量、改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量

(単位は ** ×10⁻³ µg/g 新鮮重、***µg/g 新鮮重)

分析組織*	<i>DvSnf7</i> 遺伝子断片の RNA 発現量**	改変 Cry3Bb1 タンパク質***	改変 CP4 EPSPS タンパク質***
葉	10.3~14.4	40~56	7.0~7.8
穀粒	0.091	3.5	1.7
花粉	0.103	29	15
絹糸	0.530	16	4.0
地上部	1.23~10.5	12~44	2.4~8.1
茎葉	0.310	10	1.0
根	0.353~3.15	7.9~25	2.2~6.5

* 葉は 3 葉期~絹糸抽出期、穀粒は成熟期、花粉は雄穂抽出期~絹糸抽出期、絹糸は絹糸抽

^g PRT_2010: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版, 2009 年 12 月 15 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、17,815,538 配列のサブセット。

^h *DvSnf7* 遺伝子断片アンチセンス鎖 (240nt) をプローブとして標的の RNA を一本鎖に変性させて定量している。

出期、地上部は3葉期～黄熟期、茎葉は成熟期、根は3葉期～成熟期の値を示した。
検出限界は *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA 発現量が $0.004 \times 10^{-3} \mu\text{g/g}$ 新鮮重、改変 Cry3Bb1 タンパク質が $0.035 \mu\text{g/g}$ 新鮮重、改変 CP4 EPSPS タンパク質が $0.068 \mu\text{g/g}$ 新鮮重である。

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 42）を全てトウモロコシ MON87411 に置き換えて改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS タンパク質の摂取量を計算すると、 $1.8 \mu\text{g}$ 及び $0.9 \mu\text{g}$ となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 68.0 g （参照 42）に占める割合は 2.6×10^{-8} 及び 1.3×10^{-8} 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。

なお、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA から新たにタンパク質が産生される可能性は低いと考えられる（参照 43）。

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

改変 *cry3Bb1* 遺伝子の供与体である *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kumamotoensis* は土壌中に存在するグラム陽性菌である。改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株に関して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

改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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 で発現させた改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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、両タンパク質とも SDS-PAGE 分析においては、試験開始後 15 秒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においても、同様に試験開始後 15 秒以内に両タンパク質とも消化されることが確認された（参照 44, 45）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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、改変 Cry3Bb1 タンパク質では、改変 Cry3Bb1 タンパク質の分解物が試験開始後 24 時間においても認められた

(参照 43)。改変 CP4 EPSPS タンパク質では、試験開始後 10 分以内に 50%以上が消化され、100 分で完全に消化されることが確認された(参照 46)。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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、改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS タンパク質は、75°C、15 分間及び 30 分間の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 47, 48)。

(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

改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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_2010 を用いて相同性検索を行った。その結果、*E-score* が 1×10^{-5} 以下及び連続する 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 24, 25)。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2010 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)～(4)及び前項3から総合的に判断し、改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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。

また、トウモロコシ MON87411 に導入された *DvSnf7* 遺伝子断片により発現する dsRNA からタンパク質が産生されることはないと考えられる。

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 MON87411 の穀粒から抽出されたゲノム DNA を用いて NGS/JSA 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 36)。

トウモロコシ MON87411 に導入された *DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットからの転写産物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 MON87411 の葉を用いてノーザンブロット分析を行った。その結果、各世代において約 1.3 Kb のバンド及び dsRNA 由来の siRNA と推察される約 21 塩基のバンドが検出された。約 1.3 Kb のバンドは *DvSnf7* 遺伝子断片発現カセットからの転写産物(968 塩基)ⁱに、転写後修飾による Poly-A の付加及びキャップ構造形成された

ⁱ *DvSnf7* 遺伝子センス及びアンチセンス鎖、ループ配列、*e35S* リーダー、*Hsp70* イントロンの

ものであると考えられたとしている。したがって、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物がいずれの世代でも発現していることが確認された（参照 49）。

また、改変 Cry3Bb1 タンパク質及び改変 CP4 EPSPS 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 MON87411 の葉についてウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの世代でも発現していることが確認された（参照 51）。

さらに、トウモロコシ MON87411 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 MON87411 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 52）。

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

・ *DvSnf7* 遺伝子断片

トウモロコシ転写産物データベースを用いて *DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA 内の 21 塩基配列との相同性を調査した結果、相同性を有するトウモロコシ mRNA は存在しないことが示された。したがって、*DvSnf7* 遺伝子断片の dsRNA が宿主トウモロコシ遺伝子の発現を抑制する可能性は低く、また、この遺伝子断片が新たなタンパク質を発現するとは考えられないことから、宿主の代謝系への影響はないとしている（参照 53）。

・ 改変 Cry3Bb1 タンパク質

改変 Cry3Bb1 タンパク質が酵素活性を持つとの報告はなく、新たな代謝系及び代謝産物を産生するとは考えられない。

・ 改変 CP4 EPSPS タンパク質

改変 CP4 EPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路（芳香族アミノ酸合成経路）の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩（PEP）とシキミ酸-3-リン酸塩（S3P）と特異的に反応することが知られている。したがって、改変 CP4 EPSPS タンパク質の作用機作は独立しており、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。

7. 宿主との差異に関する事項

アルゼンチンのほ場で栽培されたトウモロコシ MON87411 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 54）。

部分配列及び *E9* ターミネーターの部分配列より構成される（参照 50）。

(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、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が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。

(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が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。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いか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。

(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、亜鉛）及び茎葉のミネラル類（カルシウム、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が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。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

穀粒の葉酸、ナイアシン、ビタミン A、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン E 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いか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。

(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が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても ILSI データベースの範囲内であった。

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・飼料としての安全性審査の申請及び米国農務省（USDA）に対する無規制裁培のための申請が行われ、それぞれ、2014年10月及び2015年10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、2015年10月に安全性の確認が終了した。

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、2015年8月に安全性の確認が終了した。

欧州においては、2015年2月に欧州食品安全機関（EFSA）に食品、飼料及び輸入のための安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87411 の栽培方法は、生育期に除草剤グリホサ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 MON87411 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。

(参考)

申請者から、マウスを用いた *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA の 28 日間反復経口投与試験に関するデータが提出されたことから、これを確認した。

CD-1 系マウス（1 群雌雄各 10 匹）を用いた 28 日間反復強制経口投与試験が実施された。試験には、*in vitro* で合成した *DvSnf7* 遺伝子断片の RNA（968 塩基）を 1、10、100 mg/kg 体重/日の用量で投与した。対照として、ヌクレアーゼフリーの水又は RNA のネガティブコントロールとしてトルラ酵母から抽出した RNA を 100 mg/kg 体重/日で投与した。その結果、*DvSnf7* 遺伝子断片の RNA 投与に関連する影響は認められなかった（参照 55）。

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リホサート耐性トウモロコシ MON87411 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 ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life Sciences Institute
- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 Ciosi, M., N.J. Miller, S. Toepfer and T. Guillemaud. 2011. Stratified dispersal and increasing genetic variation during the invasion of Central Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Evolutionary Applications* 4:54-70.
- 6 Northern Blot Analysis of DvSnf7 RNA Expression in MON87411 (社内報告書)
- 7 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
- 8 Ramaseshadri, P., G. Segers, R. Flannagan, E. Wiggins, W. Clinton, O. Ilagan, B. McNulty, T. Clark and R. Bolognesi. 2013. Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. *PLoS ONE* 8: e54270.
- 9 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.
- 10 Ivashuta, S.I., J.S. Petrick, S.E. Heisel, Y. Zhang, L. Guo, T.L. Reynolds, J.F. Rice, E. Allen and J.K. Roberts. 2009. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and*

- Chemical Toxicology 47: 353-360.
- 11 Fukuhara, T., R. Koga, N. Aoki, C. Yuki, N. Yamamoto, N. Oyama, T. Udagawa, H. Horiuchi, S. Miyazaki, Y. Higashi, M. Takeshita, K. Ikeda, M. Arakawa, N. Matsumoto and H. Moriyama. 2006. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. *Archives of Virology* 151: 995-1002.
 - 12 Bioinformatic Comparison of a Corn sRNA Library versus the Human Transcriptome Using STELLAR (社内報告書)
 - 13 Petrick, J.S., B. Brower-Toland, A.L. Jackson and L.D. Kier. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176.
 - 14 Loretz, B., F. Föger, M. Werle and A. Bernkop-Schnürch. 2006. Oral gene delivery: Strategies to improve stability of pDNA towards intestinal digestion. *Journal of Drug Targeting* 14: 311-319.
 - 15 Sioud, M. 2005. On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2: 639-651.
 - 16 Bioinformatic Comparison of DvSnf7 versus the Human Transcriptome Using STELLAR (社内報告書)
 - 17 Zhang, L., D. Hou, X. Chen, D. Li, L. Zhu, Y. Zhang, J. Li, Z. Bian, X. Liang, X. Cai, Y. Yin, C. Wang, T. Zhang, D. Zhu, D. Zhang, J. Xu, Q. Chen, Y. Ba, J. Liu, Q. Wang, J. Chen, J. Wang, M. Wang, Q. Zhang, J. Zhang, K. Zen and C.-Y. Zhang. 2012a. Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: Evidence of cross-kingdom regulation by microRNA. *Cell Research* 22: 107-126.
 - 18 Dickinson, B., Y. Zhang, J.S. Petrick, G. Heck, S. Ivashuta and W.S. Marshall. 2013. Lack of detectable oral bioavailability of plant microRNAs after feeding in mice. *Nature Biotechnology* 31: 965-967.
 - 19 Heinemann, J.A., S.Z. Agapito-Tenfen and J.A. Carman. 2013. A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. *Environment International* 55: 43-55.
 - 20 FSANZ. 2013. Response to Heinemann et al on the regulation of GM crops and foods developed using gene silencing. Food Standards Australia New Zealand, Canberra, Australia.
 - 21 Witwer, K.W., M.A. McAlexander, S.E. Queen and R.J. Adams. 2013. Real-time quantitative PCR and droplet digital PCR for plant miRNAs in mammalian blood provide little evidence for general uptake of dietary miRNAs: Limited evidence for general uptake of dietary plant xenomiRs. *RNA biology* 10: 1080-1086.
 - 22 Thompson, J.D., D.J. Kornbrust, J.W.-D. Foy, E.C.R. Solano, D.J. Schneider, E.

- Feinstein, B.A. Molitoris and S. Erlich. 2012. Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified siRNAs targeting p53 RNA following intravenous administration. *Nucleic Acid Therapeutics* 22: 255-264.
- 23 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.
- 24 Updated Bioinformatics Evaluation of the Cry3Bb1 Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (社内報告書)
- 25 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (社内報告書)
- 26 Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Sanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218
- 27 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.
- 28 Qin, X., S. Gianì and D. Breviario. 1997. Molecular cloning of three rice α -tubulin isotypes: Differential expression in tissues and during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1354: 19-23.
- 29 Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, OsTubA1, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.
- 30 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 31 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.
- 32 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. *The EMBO Journal* 5: 451-458.
- 33 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.
- 34 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.
- 35 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

- 36 Amended Report for MSL0025314: Molecular Characterization of MON 87411 (社内報告書)
- 37 Bioinformatics Evaluation of MON 87411 Nucleotide Sequence Utilizing the EST_2014, NT_2014, and NR_2014 Databases (社内報告書)
- 38 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87411: Assessment of Putative Polypeptides (社内報告書)
- 39 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87411 Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (社内報告書)
- 40 Assessment of *DvSnf7* RNA Levels in Maize Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (社内報告書)
- 41 Assessment of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Protein Levels in Corn Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (社内報告書)
- 42 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室 2013 平成24年国民健康・栄養調査報告 厚生労働省 東京 p. 70
- 43 Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
- 44 Assessment of the *in vitro* Digestibility in Simulated Gastric and Intestinal Fluids of the Cry3Bb1.pvzmir39 Protein (社内報告書)
- 45 Assessment of the *in vitro* Digestibility of Purified *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Protein in Simulated Gastric Fluid (社内報告書)
- 46 Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSP synthase (社内報告書)
- 47 The Effect of Heat Treatment on Cry3Bb1 Immunodetection (社内報告書)
- 48 Amended Report for MSL0022764: Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (社内報告書)
- 49 Demonstration of the Presence of *DvSnf7* Transcript in Maize Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 87411 (社内報告書)
- 50 Armstrong, T.A., H. Chen, T.E. Ziegler, K.R. Iyadurai, A.G. Gao, Y. Wang, Z. Song, Q. Tian, Q. Zhang, J.M. Ward, G.C. Segers, G.R. Heck and J.M. Staub. 2013. Quantification of transgene-derived double-stranded RNA in plants using the QuantiGene nucleic acid detection platform. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 12557-12564.
- 51 Demonstration of the Presence of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Proteins in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87411 (社内報告書)
- 52 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87411 Across Three Generations (社内報告書)
- 53 Bioinformatic Comparison of the 240 Nucleotide *DvSnf7* Sequence with Eukaryotic Soil Microorganism and *Zea mays* Sequence Databases (社内報告書)

- 54 Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from Glyphosate Treated
MON 87411 and Control Grown in Argentina during 2011/2012 (社内報告書)
- 55 A 28 Day Oral Study in the Mouse with DvSnf7_968 RNA (社内報告書)