

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チョ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（DAS1131）に係る食品健康影響評価（令和5年7月3日付け厚生労働省発生食 0703 第2号）については、令和6年5月30日に開催された第250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。

2. チョ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（DAS1131）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

令和6年7月16日（火）開催の食品安全委員会（第947回会合）の翌日の令和6年7月17日（水）から令和6年8月21日（水）までの36日間。

2) 受付体

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

チョ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 (DAS1131)
(食品)

令和6年(2024年)7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	5
Ⅰ. 評価対象食品の概要	6
Ⅱ. 食品健康影響評価	6
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	6
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項	6
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	7
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 ...	7
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	8
第 3. 宿主に関する事項	8
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	8
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	8
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項	8
4. アレルギー誘発性に関する事項	8
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	9
1. 名称及び由来に関する事項	9
2. 性質に関する事項	9
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	10
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	14

1. 遺伝子導入に関する事項.....	14
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.....	17
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.....	19
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.....	21
9. 栽培方法に関する事項.....	21
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	21
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.....	21
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	21
<参照>.....	22

＜審議の経緯＞

2023年7月3日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品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0703第2号）、関係書類の接受
2023年7月11日	第905回食品安全委員会（要請事項説明）
2023年7月27日	第238回遺伝子組換え食品等専門調査会
2024年5月30日	第250回遺伝子組換え食品等専門調査会
2024年7月16日	第947回食品安全委員会（報告）

＜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＞

2023年9月30日まで	2024年3月31日まで
中島 春紫（座長）	児玉 浩明（座長）
山川 隆（座長代理）	佐々木 伸大（座長代理）
安達 玲子	伊藤 政博
岡田 由美子	岡田 由美子
小野 道之	小野 道之
小野 竜一	小野 竜一
佐々木 伸大	柴田 識人
近藤 一成	手島 玲子
樋口 恭子	樋口 恭子
藤原 すみれ	藤原 すみれ

2024年4月1日から

児玉 浩明（座長）

佐々木 伸大（座長代理）

伊藤 政博 手島 玲子

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

柴田 識人 百瀬 愛佳

爲廣 紀正

<第238回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

<第250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

「チョ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 (DAS1131)」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 ssp. mays* (L.) Iltis) のデント種B104系統を宿主とし、*Bacillus thuringiensis*に由来する改変 *cry1Da2* 遺伝子及び *Streptomyces sviveus*に由来する *dgt-28 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry1Da2* タンパク質を発現することでチョウ目害虫抵抗性が、DGT-28 EPSPSタンパク質を発現することで除草剤グリホサート耐性が付与される。

改変 *Cry1Da2* タンパク質は、感受性のあるチョウ目昆虫に摂食されると、殺虫活性のあるプロテアーゼ抵抗性コアタンパク質となる。コアタンパク質は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。DGT-28 EPSPSタンパク質は、トウモロコシが有する内在性EPSPSタンパク質とは異なり、除草剤グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、組換え体は、除草剤グリホサートの存在下でも生育することができるようになる。

「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。なかでもアレルギー誘発性評価の一環として実施した、挿入遺伝子発現タンパク質の物理化学的処理に対する感受性試験の結果、人工胃液処理及び人工胃液処理後の人工腸液処理によって、これらタンパク質が速やかに消化されることが示された。さらに加熱処理によってこれらタンパク質の殺虫活性又は酵素活性が低下することが示されたことから、これらタンパク質がアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。これらの結果から、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、「チョ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 (DAS1131)」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：チョ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
(DAS1131)

性質：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性

申請者：コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社

開発者：Pioneer Hi-Bred International, Inc., Member of Corteva Agriscience
Group of Companies (米国)

「チョ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 (DAS1131)」
(以下「トウモロコシDAS1131」という。)は、*Bacillus thuringiensis*に由来する
改変*cry1Da2*遺伝子及び*Streptomyces sviceus*に由来する*dgt-28 epsps*遺伝子を導
入して作出されており、改変*Cry1Da2*タンパク質を発現することでチョウ目害虫抵
抗性が、DGT-28 EPSPSタンパク質を発現することで除草剤グリホサート耐性が付
与される。

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B104系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変*cry1Da2*遺伝子及び*dgt-28 epsps*遺伝子の供与体は、それぞれ*B.*
*thuringiensis*及び*S. sviceus*である。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法

改変*cry1Da2*遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する改変*Cry1Da2*タンパ
ク質をコードする。

*dgt-28 epsps*遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与するDGT-28 EPSPS
タンパク質をコードする。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

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

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

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

トウモロコシ種子の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、粗タンパク質5.7～17.3%、粗脂質1.4～7.8%、粗繊維0.5～5.5%、灰分0.6～6.3%、炭水化物77.4～89.7%である（参照2）。

- (2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子に、毒性物質の産生性は知られていない。栄養阻害物質（対乾燥重量）については、フィチン酸定量限界未満～1.9%、ラフィノース定量限界未満～0.47%である（参照2）。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

- (1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシDAS1131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DAS1131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DAS1131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DAS1131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DAS1131は、改変*cry1Da2*遺伝子及び*dgt-28 epsps*遺伝子を導入して作出されており、改変*Cry1Da2*タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質を産生することが宿主との相違点である。

以上1～6より、トウモロコシDAS1131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DAS1131は、特定のチョウ目害虫に殺虫活性を有し、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。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* ssp. *mays* (L.) *Illis*) のデント種B104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、同じ*Zea*属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている（参照3）。栽培適性の異なる多くの品種が育成された結果、現在では世界的に広く栽培される作物となった（参照1）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシにおいては、有害生理活性物質のうちヒトの健康に悪影響を与える毒性物質の産生性が知られていないが、栄養阻害物質としては、フィチン酸、ラフィノースが含まれていることが知られている（参照4）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

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として報告されている（参照5、6、7、8）。しかしながら、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、9）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

トウモロコシは、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3）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1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、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3）、わが国において食用に供されることはない。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

トウモロコシDAS1131の作出に使用した導入用プラスミドPHP88492の外骨格領域（挿入DNA領域を除く部分）は、アグロバクテリウム（*Rhizobium radiobacter*）等由来のプラスミドpSB11等を基に作製された。

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PHP88492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10）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミドPHP88492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PHP88492の外骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害なタンパク質を産生する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PHP88492の外骨格領域にはスペクチノマイシンに対して耐性を付与する*spc*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PHP88492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

改変*cry1Da2*遺伝子及び*dgt-28 epsps*遺伝子の供与体は、それぞれ*B. thuringiensis*及び*S. sviveus*である。

(2) 安全性に関する事項

*B. thuringiensis*は、土壤中に存在するグラム陽性細菌であり、米国で生物農薬として使用されている（参照11、参照12）。

*S. sviveus*は、土壤中に広く存在し、ヒトに対する病原性は報告されていない。

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

（1）挿入遺伝子のクローニング又は合成方法に関する事項

導入された遺伝子は、それぞれの供与体のゲノムDNA又はcDNAからPCR法によってクローニングされた。

改変 *cry1Da2* 遺伝子は、*cry1Da2* 遺伝子に由来するコアタンパク質コード領域とC末端側の改変 *cry1Ab* 遺伝子の小断片から構成される。トウモロコシでの発現を最適化するために塩基配列を改変した。

dgt-28 epsps 遺伝子は、*S. sviveus* 由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) をコードする遺伝子に *Brassica napus* 及び *Brassica rapa* 由来のキメラ葉緑体輸送ペプチド (TraP8) をコードする配列が連結されている。トウモロコシでの発現を最適化するために塩基配列を改変した。

（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

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. 改変 *cry1Da2* 遺伝子

改変 *cry1Da2* 遺伝子は改変 *Cry1Da2* タンパク質をコードする。改変 *Cry1Da2* タンパク質は土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* 由来の *Cry* タンパク質から構成されるキメラタンパク質であり、*Cry1Da2* タンパク質に由来するコアタンパク質領域とC末端側の改変 *Cry1Ab* タンパク質の小断片から構成されており、ヤガ科及びタテハチョウ科に属するチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す（参照13）。改変 *Cry1Da2* タンパク質は、感受性のあるチョウ目昆虫に摂食されると腸管内のプロテアーゼにより一部が消化され、殺虫活性のあるプロテアーゼ抵抗性コアタンパク質となる。コアタンパク質は昆虫の中腸上皮細胞膜上の特定の受容体と結合し、細胞膜に細孔を形成して細胞溶解を引き起こし、中腸組織を損傷させることにより殺虫活性を発揮すると考えられている。これまで、*Cry* タンパク質又は *Cry* タンパク質を産生する遺伝子組換え植物の摂取が、鳥類、両生類、爬虫類及び哺乳類に対して悪影響を及ぼしたことはない（参照14）。なお、改変 *Cry1Da2* タンパク質を用いた結合試験の結果から、改変 *Cry1Da2* タンパク質は、試験を実施した *Cry1* タンパク質、*Cry2* タンパク質及び *Vip3* タンパク質が結合する受容体とは異なる受容体に結合することが示唆されている（参照15）。

改変 *Cry1Da2* タンパク質の生存率に与える影響について、チョウ目、コウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目、トビムシ目及びキジ目の6目17種の生物種に対する生物検定により評価した結果、特定のチョウ目昆虫の

みが感受性を示すことが確認された（参照16）。

b. *dgt-28 epsps* 遺伝子

dgt-28 epsps 遺伝子は DGT-28 EPSPS タンパク質をコードする。*S. sviveus* 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下「EPSPS タンパク質」という。）をコードする遺伝子 (*epsps*) に *B. napus* 及び *B. rapa* 由来のキメラ葉緑体輸送ペプチド (TraP8) をコードする配列が連結されている。また、トウモロコシでの発現を最適化するため塩基配列が改変されている。

EPSPS タンパク質は、植物及び微生物において、芳香族アミノ酸の生合成経路に関わる酵素であり、その可逆的競合阻害剤である除草剤グリホサート散布された植物は、結果としてタンパク質合成が妨げられるために枯死する。

トウモロコシ DAS1131 にて産生される DGT-28 EPSPS タンパク質は、ホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸から 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸への特異的な変換を触媒する。トウモロコシが有する内在性 EPSPS タンパク質とは異なり、DGT-28 EPSPS タンパク質は、除草剤グリホサートに対して非感受性であり、除草剤グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、トウモロコシ DAS1131 は除草剤グリホサートの存在下でも生育することができる（参照 17）。

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

改変 Cry1Da2 タンパク質及び DGT-28 EPSPS タンパク質と既知毒性タンパク質の相同性を検討するため、毒性タンパク質データベース^aを用いて、BLASTP (version 2.10.0+) によるアミノ酸配列検索を行った。*E*-value の閾値は 10^{-4} に設定した（参照 18）。その結果、いずれのタンパク質についても既知毒性タンパク質との間に相同性は認められなかった。

(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 PHP88492 の外骨格領域にはスペクチノマイシン耐性 (*spc*) 遺伝子が含まれているが、外骨格領域は DAS1131 中に導入されていない。

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

改変 *cry1Da2* 遺伝子発現カセットのプロモーター及び *dgt-28 epsps* 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 *ubiZM1* 遺伝子のプロモーター配列である。

^a UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されている既知毒性タンパク質のみで構成されたデータベース（2021年1月更新）（検索日：2021年9月）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cry1Da2* 遺伝子発現カセットのターミネーター及び *dgt-28 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *ubiZM1* 遺伝子のターミネーター配列である。

(3) その他

目的遺伝子の発現を高めるため、以下の配列を含む。

改変 *cry1Da2* 遺伝子発現カセット及び *dgt-28 epsps* 遺伝子発現カセットには、それぞれトウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *ubiZM1* 5'UTR 及び *ubiZM1* イントロンを含む (表1)。

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PHP88492は、プラスミドpSB11等より構成された外骨格領域と挿入DNA領域より作製された。

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PHP88492の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照10)。

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

第6-1-(2)に記載のとおりである。

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

導入用プラスミドPHP88492の意図する挿入領域は、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PHP88492は、抗生物質耐性マーカー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いる。

表1 トウモロコシDAS1131への挿入遺伝子発現カセット

構成DNA	由来及び機能
(改変 <i>cry1Da2</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター配列。植物体内での構成的発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> 5'UTR <i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子の5' 非翻訳領域とイントロン領域 (参照19)。
改変 <i>cry1Da2</i>	改変 <i>Cry1Da2</i> タンパク質をコードする遺伝子。 <i>B. thuringiensis</i> の <i>cry1Da2</i> 遺伝子に由来するコアタンパク質コード領域とC末端側の改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子の小断片からなる (参照13)。
<i>ubiZM1</i> ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のターミネーター領域 (参照19、20)。転写を停止する。
(<i>dgt-28 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター配列。植物体内での構成的発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> 5'UTR <i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子の5' 非翻訳領域とイントロン領域 (参照19)
<i>dgt-28 epsps</i>	<i>S. svinceus</i> 由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) をコードする遺伝子に <i>B. napus</i> 及び <i>B. rapa</i> 由来のキメラ葉緑体輸送ペプチド (TraP8) をコードする配列が連結されている (参照17、21)。トウモロコシでの発現を最適化するため塩基配列が改変されている。
<i>ubiZM1</i> ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子のターミネーター領域 (参照19、20)。転写を停止する。

6. DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項

非組換えトウモロコシB104系統の未熟胚に、プラスミドPHP88492を含むアグロバクテリウムを接種し、培養した。その後、除草剤グリホサート及びアグロバクテリウム除去用の抗生物質カルベニシリンを添加した培地で胚を培養することにより、DNAが導入された宿主を選抜した。植物体を再生し、T₀世代とした。T₀世代と既存品種との交配を行い、T₁世代を得た。その後、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を行い、トウモロコシDAS1131が得られた。安全性評価の対象はT₁世代以降とした。

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DAS1131の交配過程のT₁世代の葉から抽出したDNAを断片化し、そのうち導入用プラスミド由来の配列を含む断片について、次世代シーケンサーを用いてSouthern by Sequencing (SbS) 分析^bを行った。その結果、T-DNA領域の5'末端及び3'末端のそれぞれとトウモロコシDAS1131ゲノムとの接合部が特定された。この分析では、6個体それぞれの組換え体における平均カバレッジ深度は2449から4318までであったことから、信頼性に問題はなかった。したがって、トウモロコシDAS1131ゲノム中に意図したT-DNA領域が1コピー導入されていることが確認された。

トウモロコシDAS1131の交配過程のT₃世代のゲノムを用いて、DAS1131のゲノムDNAに挿入されたDNA全体及びその近傍の塩基配列をSanger法により決定した。その結果、右側及び左側境界領域にそれぞれ27塩基及び390塩基の欠損が、また、改変*cry1Da2*遺伝子上流の*ubiZM1*プロモーター内で1塩基置換が認められた。他の塩基配列は全てPHP88492のT-DNA領域配列と一致しており、各遺伝子発現カセットの各構成要素に欠損は認められなかった(参照22)。

挿入DNA領域の5'側近傍配列1289塩基及び3'側近傍配列1433塩基を決定した。これらの近傍配列について、トウモロコシのゲノムDNA配列データベースとblastn (version 2.10.0+)を用いて照合した(参照23)。その結果、5'側近傍配列中の1289塩基は1番染色体の配列と100%一致した(*E*-value=0)。また、3'側近傍配列中の1431塩基は1番染色体の配列と100%一致した(*E*-value=0)。このことから、挿入DNAの近傍配列はトウモロコシ1番染色体由来であると考えられた。

また、トウモロコシDAS1131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'末端近傍配列及び3'末端近傍配列について、データベース^cを用いてblastn及びblastx検索を行った。その結果、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。

^b キャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた解析手法。

^c NCBI (核酸データベース 2021年5月公表、ESTデータセット 2018年12月公表、非重複タンパク質データセット 2021年5月公表) (検索日: 2021年9月)

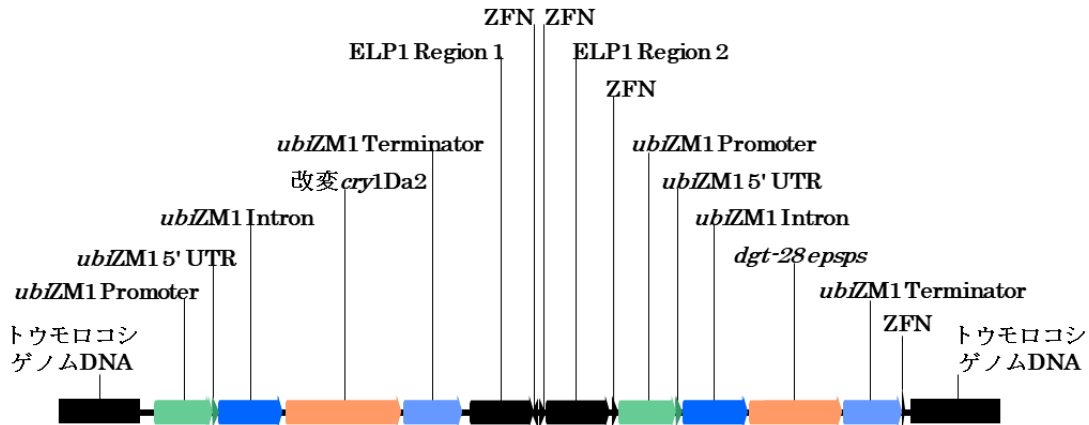


図1 トウモロコシDAS1131に挿入されたDNA (模式図)

(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DAS1131の挿入DNA領域と5'末端近傍配列及び3'末端近傍配列との接合部において意図しないオープンリーディングフレーム (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ORF検索を行ったところ723個のORFが検出された。

これらのORF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^aを用いて $E\text{-value}=1 \times 10^{-4}$ を指標としてblastp検索を行った (参照18)。その結果、既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった。

また、既知アレルゲンとの相同性については、アレルゲンデータベース^dを用いて、 $E\text{-value}$ の閾値は100として連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%を超える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、6つのORFで、80アミノ酸以上について35%を超えて一致する配列として collagen alpha-2(I) chain (GenBank Accession: BAB55663.1; NP_776945.1) 若しくはAra h 1 allergen (GenBank Accession: ADQ53858.1; P43238.1) が検出されたが、いずれのアライメントも読み枠が異なっていたり逆方向であったりして生物学的に意味のある相同性ではなく、エピトープとの一致がみられなかったことから擬陽性であると考えられた。以上のことから、DAS1131の挿入遺伝子領域及び近傍配列との接合領域において、潜在的に発現する可能性のあるペプチドが毒性又はアレルギー性を示す可能性は低いと考えられた。

^d COMprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE) ver 2019
(検索: 2021年9月)

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DAS1131の根、葉、花粉、茎、地上部及び子実について、改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質の発現量を調べるためELISA法を用いて分析を行った。結果は表2のとおりである（参照24）。

表2 トウモロコシDAS1131における改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質の部位、時期別産生量
(ng/mg乾物重)

遺伝子産物	採取部位	採取時期	定量下限値	平均値	最小値 - 最大値
改変Cry1Da2 タンパク質	根	9葉期	0.14	29	19 - 42
		開花期	0.14	20	11 - 29
		糊熟期	0.14	19	9.6 - 27
	葉	6葉期 ¹⁾	0.27	44	35 - 52
		9葉期	0.27	32	21 - 49
		開花期	0.27	33	20 - 48
		糊熟期	0.27	34	20 - 46
	花粉	開花期	0.54	41	34 - 53
	茎	開花期	0.090	21	17 - 24
	地上部植物体	糊熟期	0.090	24	11 - 30
子実	完熟期	0.14	8.1	4.2 - 12	
DGT-28 EPSPS タンパク質	根	9葉期	5.4	11	5.7 - 20
		開花期 ²⁾	5.4	7.6	<5.4 - 12
		糊熟期 ²⁾	5.4	3.8	<5.4 - 8.1
	葉	6葉期	22	43	27 - 78
		9葉期 ²⁾	22	40	<22 - 78
		開花期 ²⁾	22	71	<22 - 170
		糊熟期	22	68	22 - 140
	花粉	開花期 ²⁾	22	19	<22 - 31
	茎	開花期	3.6	19	11 - 30
	地上部植物体	糊熟期	7.2	32	17 - 54
子実	完熟期	5.4	25	14 - 39	

- 1) 1サンプルはPCR解析による組換え判定が陰性であったためn=23で算出した。
- 2) 一部のサンプルが定量限界未満であったため、当該サンプルの分析値は定量限界の1/2の値を用いて平均値を算出した。

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

トウモロコシDAS1131は、コーンスターチ等の原料となるデント種であり、「とうもろこし・加工品」の一人一日当たりの摂取量平均値^e1.0 g（参照25）を全てト

^e 令和元年国民健康・栄養調査報告（厚生労働省 令和2年12月）第5表の1（食品群別摂取量－食品群，年齢階級別，平均値，標準偏差，中央値－総数，1歳以上）穀類、その他の穀類・加工品、とうもろこし・加工品（食品群番号11）における1人1日当たり摂取量の平均値

ウモロコシDAS1131に置き換えて改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ8.1及び25 µgとなり、一人一日当たりのタンパク質の摂取量71.4 g（参照25）に占める割合はそれぞれ 0.1×10^{-6} 及び 0.4×10^{-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

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

改変cry1Da2遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* のアレルギー誘発性は知られていない。

dgt-28 epsps遺伝子の供与体である *S. svuceus* のアレルギー誘発性は知られていない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質がヒトに対しアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(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 改変 Cry1Da2 タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

DAS1131で生産される改変Cry1Da2タンパク質と生化学的に同等と考えられる *Pseudomonas fluorescens* で生産した改変Cry1Da2タンパク質を用いて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（CBB染色）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（CBB染色）分析においては、完全長の改変Cry1Da2タンパク質の約68 kDaのバンドは試験開始30秒後には消失したが、5 kDa以下の複数のバンドが試験開始60分後まで認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始30秒後まで改変Cry1Da2タンパク質の約68 kDaよりわずかに小さいバンドが認められたが、試験開始1分以内に消失することが確認された。また、約15kDaのバンドは試験開始5分以内に消失した（参照26）。

5 kDa以下の複数のバンドについて評価するため、人工胃液で1分間処理した後、引き続き人工腸液で処理（胃液腸液連続処理）した。その結果、5 kDa以下の複数のバンドは、いずれも人工腸液処理開始30秒以内に消失した（参照27）。

b. 人工腸液に対する感受性

P. fluorescens で生産した改変Cry1Da2タンパク質を用いて人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE（CBB染色）分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、分子量約68 kDaの改変

Cry1Da2タンパク質は反応開始30秒以内に消失したものの、68 kDa より僅かに小さいバンド及び約20 kDa以上の複数のバンドは60分後でも検出された（参照28）。

c. 加熱処理に対する感受性

*P.fluorescens*で生産した改変Cry1Da2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、純水を用いて調製した改変Cry1Da2タンパク質溶液を各温度で約30分から35分間加熱した後、チョウ目昆虫である*Spodoptera frugiperda*に混餌投与し致死率を測定した。その結果、改変Cry1Da2タンパク質を25℃及び50℃で処理した場合、非加熱対照と比較し有意な殺虫活性の低下は観察されなかったが、75℃以上の加熱処理を加えた場合、殺虫活性は検出されなかった（参照29）。このことから、改変Cry1Da2タンパク質は、加熱処理により殺虫活性が低下することが確認された。

② DGT-28 EPSPS タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

DAS1131で生産されるDGT-28 EPSPSタンパク質と生化学的に同等と考えられる*Escherichia coli*で生産したDGT-28 EPSPSタンパク質を用いて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（CBB染色）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（CBB染色）分析においては、完全長のDGT-28 EPSPSタンパク質の約45 kDaのバンドは試験開始30秒後には消失したが、5 kDa以下の複数のバンドが試験開始60分後まで認められた（参照30）。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始30秒後にはいずれのバンドも検出されなかった（参照30）。

5 kDa以下の複数のバンドについて評価するため、人工胃液で2分間処理した後、引き続き人工腸液で処理（胃液腸液連続処理）した結果、5 kDa以下の複数のバンドは、いずれも人工腸液処理開始30秒以内に消失した（参照31）。

b. 人工腸液に対する感受性

*E. coli*で生産したDGT-28 EPSPSタンパク質を用いて人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE（CBB染色）分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、分子量約45 kDaのDGT-28 EPSPSタンパク質は反応開始30秒後以内に消失した（参照32）。

c. 加熱処理に対する感受性

*E. coli*で生産したDGT-28 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、純水を用いて調製したDGT-28 EPSPSタンパク質

溶液を各温度で約30分から35分間加熱した後、酵素活性を測定した。DGT-28 EPSPSタンパク質を25°Cで処理した場合、非加熱対照と同等の酵素活性を示したが、37°Cの加熱処理を加えた場合、その酵素活性は33.4%まで低下し、50°C以上の加熱処理で酵素活性は検出されなかった（参照33）。このことから、DGT-28 EPSPSタンパク質は、加熱処理により酵素活性が低下することが確認された。

- (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」という。）との構造相同性に関する事項

改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質と既知アレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、COMPAREデータベースを用いて相同性検索を行った。検索には、連続する8アミノ酸以上で完全に一致する配列の検索方法と、FASTA (version 35.4.4) による連続する80アミノ酸残基以上で35%を超えて一致する配列の検索方法を用いた（参照34、35）。*E*-valueの閾値は100に設定した。

その結果、改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質に既知アレルゲンとの相同性は認められなかった（参照18）。

- (5) 遺伝子産物（タンパク質）のIgE 結合能の検討

上記（1）～（4）より、改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPSタンパク質のアレルギー誘発性を示唆するデータがなかったため、本事項についての検討は行わなかった。

上記（1）～（5）及び前項3から総合的に判断し、改変Cry1Da2タンパク質及びDGT-28 EPSPS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. 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DAS1131の葉から抽出されたゲノムDNAを用いてサザンブロット分析を行った。プローブとして*cry1Da2*及び*dgt-28 epsps*遺伝子の配列を用いた。その結果、各世代において想定された共通のバンドが検出され、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）。

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

Cry タンパク質の機能について数多くの研究がなされているが（参照 14）、Cry タンパク質が酵素活性を有することを示す報告はない。したがって、改変Cry1Da2 タンパク質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いと考えられる。

EPSPS タンパク質はホスホエノールピルビン酸及び 3-ホスホシキミ酸と特異

的に反応する酵素であり、通常の 40 倍の EPSPS タンパク質を生成する植物培養細胞においても、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている（参照 37）。

DGT-28 EPSPS タンパク質は、除草剤グリホサートに非感受性である以外は、構造的にも機能的にも EPSPS タンパク質と類似しており、同一の作用機作をもつ（参照 17）。したがって、DGT-28 EPSPS タンパク質の導入により宿主の代謝系が変化することはないと考えられる。

以上のことから、これらタンパク質が宿主の代謝経路に意図しない影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

実際、第 6－7 に示すように、子実中の主要構成成分等において、非組換えトウモロコシと DAS1131 との間に相違は認められなかった。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのは場で栽培されたトウモロコシ DAS1131 と宿主である非組換えトウモロコシについて、子実中の主要構成成分、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 38）。トウモロコシ DAS1131 には除草剤グリホサートの散布を行った。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（総食物繊維、粗タンパク質、粗脂質、粗繊維、酸性及び中性デタージェント繊維、灰分並びに炭水化物）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

脂肪酸 15 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でパルミトレイン酸に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は商業品種変動^eの範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

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

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）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でカルシウム、マンガン及び亜鉛に統計学的有意差が認め

^e 商業品種 184 品種の分析結果に基づき、信頼度 95% で分析値の 99% を含むよう設定した範囲。

られたが、いずれにおいても個々の測定値は商業品種の変動範囲内又は文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン類

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B₅ (パントテン酸)、ビタミンB₆ (ピリドキシン)、ビタミンB₉ (葉酸) 及びトコフェロール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でビタミンA及びビタミンB₅に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は商業品種変動の範囲内であった。

(6) 栄養阻害物質及び二次代謝産物

フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター、*p*-クマル酸、フェルラ酸、フルフラール及びイノシト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。

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) により食品及び飼料としての利用について2023年12月に承認された。EUにおいては、欧州食品安全機関 (EFSA) に対して食品・飼料としての利用についての安全性審査を申請中である。

その他、2カ国で安全性審査を申請中である。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシDAS1131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DAS1131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

「チョ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 (DAS1131)」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、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. (2005). トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー. 農文協. Pp.2-4, pp.56-59, p.127.
2. トウモロコシ子実中の構成成分文献値一覧 (社内文書)
3. OECD. (2003). Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, No. 27. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2003)11.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815758.pdf>).
Accessed on June 9th, 2022.
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. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2002) 25.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815196.pdf>).
Accessed on June 9th, 2022.
5. Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., Giuffrida, M.G., Ansaloni, R., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Fortunato, D. and Ortolani, C. (2000). The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106(4): 744-751.
6. Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Scibilia, J., Conti, A., Fortunato, D., Borgonovo, L., Bonomi, S., Primavesi, L. and Ballmer-Weber, B. (2009). Maize food allergy: Lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 93-102.
7. Volpicella, M., Leoni, C., Fanizza, I., Distaso, M., Leoni, G., Farioli, L., Naumann, T., Pastorello, E. and Ceci, L.R. (2017). Characterization of maize chitinase-A, a tough allergenic molecule. *Allergy* 72: 1423-1429.
8. Lee, S.-H., Benmoussa, M., Sathe, S.K., Roux, K.H., Teuber, S.S., and Hamaker, B.R. (2005). A 50 kDa maize γ -zein has marked cross-reactivity with the almond major protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7965-7970.
9. CODEX. (2018). General standard for the labelling of prepackaged foods. Codex Alimentarius Commission.
(https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B1-1985%252FCXS_001e.pdf).

Accessed on May 29th, 2024.

10. Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP88492 (STUDY ID: PHI-2020-140). (社内文書)
11. US EPA. (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): *Bacillus thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004.
(<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/0247.pdf>).
Accessed on June 9th, 2022.
12. US EPA. (2001). Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-incorporated protectants (October 15, 2001). United States Environmental Protection Agency.
(http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm).
Accessed on June 9th, 2022.
13. US Patent 9890390 [Tan et al., 2018]
14. OECD. (2007). Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* - derived insect control proteins. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.42. Organisation for economic co-operation and development.
ENV/JM/MONO(2007)14.
15. Cry1Da2 Binding Summary (STUDY ID: PHI-R018-Y23). (社内文書)
16. Spectrum of Activity and Non-Target Organism Analysis. (社内文書)
17. Griffin, S.L., Chekan, J.R., Lira, J.M., Robinson, A.E., Yerkes, C.N., Siehl, D.L., Wright, T.R., Nair, S.K. and Cicchillo, R.M. (2021). Characterization of a Glyphosate-Tolerant Enzyme from *Streptomyces svecius*: A Distinct Class of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 69(17):5096-5104.
18. Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2021-173/225). (社内文書)
19. Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*. 18: 675-689.
20. US Patent 9688996 [Kumar et al., 2017]
21. WO Patent 2013116700 [Lira et al., 2013]
22. Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DAS-Ø1131-3 Maize (STUDY ID: PHI-2020-173). (社内文書)
23. Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2021-171/230). (社内文書)
24. Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2020-019/700). (社内文書)

25. 令和元年国民健康栄養調査 厚生労働省2019
26. Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Cry1Da2 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-098). (社内文書)
27. Characterization of Cry1Da2 Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY ID: PHI-2021-100). (社内文書)
28. Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Cry1Da2 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-101). (社内文書)
29. Determination of the Biological Activity of Heat-Treated Cry1Da2 Protein Incorporated in an Artificial Diet and Fed to *Spodoptera frugiperda* (STUDY ID: PHI-2021-072). (社内文書)
30. Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of DGT-28 EPSPS Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-099). (社内文書)
31. Characterization of DGT-28 EPSPS Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY ID: PHI-2021-102). (社内文書)
32. Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of DGT-28 EPSPS Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-103). (社内文書)
33. Determination of the Enzymatic Activity of Heat-Treated DGT-28 EPSPS Protein (STUDY ID: PHI-2021-145). (社内文書)
34. FAO/WHO. (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. January 22-25, 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. (http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/topics/ec_jan2001.pdf). Accessed on June 9th, 2022.
35. CODEX. (2003). Codex Alimentarius Commission, Alinorm 03/34. Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome, Italy, June 30-July 5, 2003. pp.57-60.
36. Characterization of DAS-Ø1131-3 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (SYUDY ID: PHI-2021-051). (社内文書)
37. Smart, C.C., Johänning, D., Müller, G. and Amrhein, N. (1985). Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry*. 260(30): 16338-16346.

38. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event
DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2020-021/021). (社内文書)