

府食第385号
令和3年6月29日

厚生労働大臣
田村 憲久 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋
(公印省略)

食品健康影響評価の結果の通知について

令和2年9月24日付け厚生労働省発生食0924第3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「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 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1のとおりです。

また、本件に関して行った国民からの意見・情報の募集において、貴省に関連する意見・情報が別添2のとおり寄せられましたので、お伝えします。

記

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 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。

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統

2021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. 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	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	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	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	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.....	20
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.....	21
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.....	23
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	23
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.....	23
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	23
<参照>	24

＜審議の経緯＞

- 2020 年 9 月 28 日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食 0924 第 3 号）、関係書類の接受
- 2020 年 10 月 13 日 第 793 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2020 年 10 月 26 日 第 204 回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021 年 1 月 28 日 第 207 回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021 年 3 月 23 日 第 809 回食品安全委員会（報告）
- 2021 年 3 月 24 日から 4 月 22 日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2021 年 6 月 23 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
- 2021 年 6 月 29 日 第 822 回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

＜食品安全委員会委員名簿＞

佐藤 洋（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

中島 春紫（座長）
児玉 浩明（座長代理）
安達 玲子 近藤 一成
飯島 陽子 手島 玲子
岡田 由美子 樋口 恭子
小関 良宏 山川 隆
小野 竜一 吉川 信幸
橘田 和美

要 約

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 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、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株、*Streptomyces viridochromogenes*、*Sphingobium herbicidovorans* 及び *Rhizobium radiobacter* CP4 株由来の、それぞれ改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、ジカンバモノオキシゲナーゼ、ホスフィノスリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ、 α -ケトグルタル酸依存性非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼ及び 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素を発現することで、除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサートを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。また、雄穂形成初期にグリホサートを散布することで雄性不稔を誘発し、効率的なハイブリッド種子の生産を可能にする。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分、有害成分の比較の結果等について確認した結果、非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 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：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統

性 質：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer CropScience LP（ドイツ）

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統」（以下「トウモロコシ MON87429」という。）は、改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、ジカンバモノオキシゲナーゼ（改変 MON87429 DMO タンパク質）、ホスフィノスリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ（PAT タンパク質）、 α -ケトグルタル酸依存性非ヘム鉄依存性ジオキシゲナーゼ（FT_T タンパク質）及び 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（改変 CP4 EPSPS タンパク質）を発現することで、除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサートを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。また、雄穂形成初期にグリホサートを散布することで雄性不稔を誘発し、効率的なハイブリッド種子の生産を可能にする。

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.) Ittis）のデント種 LH244 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株、*Streptomyces viridochromogenes*、*Sphingobium herbicidovorans* 及び *Rhizobium radiobacter* CP4 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *dmo* 遺伝子は、除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON87429 DMO タンパク質をコードする。*pat* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質をコードする。*ft_t* 遺伝子は、アリルオキシアルカノエート

系除草剤耐性を付与する FT_T タンパク質をコードする。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（デント種）の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、粗タンパク質 5.7～17.3%、粗脂質 1.4～7.8%、総食物繊維 6.7～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.7%である(参照 2)。

- (2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）に、毒性物質の産生性は知られていない。栄養阻害物質（対乾燥重量）については、フィチン酸 0.1～1.9%、ラフィノース 0.02～0.47%である(参照 2、3)。

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 MON87429 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 MON87429 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 MON87429 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 MON87429 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 MON87429 は、改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、改変 MON87429 DMO タンパク質、PAT タンパク質、FT_T タンパク質及び改変 CP4 EPSPS タンパク質を産生することが宿主との相違点である。

以上から、トウモロコシ MON87429 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 MON87429 は、除草剤ジカンバ、グルホシネート、グリホサート及びアリルオキシアルカノエート系除草剤であるキザロップエチル及び 2,4-D の影響を受けずに生育することができる。

また、導入された CaMV *35S* プロモーターと雄性組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列を付加することにより、雄性生殖組織において改変 CP4 EPSPS タンパク質は発現しないか、発現しても微量であり、本系統は除草剤グリホサート散布条件下で雄性不稔になるとされている(参照 4、5)。この形質を利用して、効率的なハイブリッド種子の生産を可能にする。なお、「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統」が 2013 年に安全性審査を終了している。

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* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は、同属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている(参照 6)。栽培適性の異なる多くの品種が育成された結果、現在では世界的に広く栽培される作物となった(参照 1)。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシには、有害生理活性物質のうち、ヒトの健康に悪影響を与える毒性物質についての産生性は知られていない。他方、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 3)。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシの Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれる分子量 9 kDa のタンパク質、50 kDa の γ -ゼイン、30 kDa のキチナーゼ-A、16 kDa のトリプシンインヒビター及び 26 kDa の α -ゼイン前駆体が食物アレルギーとして報告されている（参照 7～11）が、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発食品とは考えられていない（参照 3）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

トウモロコシには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られている（参照 6）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クム属が知られているが（参照 6）、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 MON87429 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の外側骨格領域は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成された。

2. 性質に関する事項

（1）DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の外側骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 12）。

（2）制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の外側骨格領域の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

（3）既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の外側骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PV- ZMHT519224 の外側骨格領域にはスペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対して耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV- ZMHT519224 の外側骨格領域には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、それぞれ *Ste. maltophilia* DI-6 株、*Str. viridochromogenes*、*Sph. herbicidovorans* 及び *R. radiobacter* CP4 株である。

(2) 安全性に関する事項

Ste. maltophilia は、環境中に存在し、ヒトの日和見病原性の細菌であるが、感染がみられるのは免疫不全の患者に限られている(参照 13)。

Str. viridochromogenes は、環境中に存在する腐生性及び土壌伝播性の細菌である(参照 14)。

Sph. herbicidovorans は、土壌中に存在する一般的な細菌である(参照 15)。

R. radiobacter は、土壌中に存在する一般的な細菌である。

いずれの細菌もヒトや家畜等に対する病原性を示す報告はない。

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子は、*Ste. maltophilia* DI-6 株の野生型 *dmo* 遺伝子配列を基に合成された。改変 MON87429 DMO タンパク質は、野生型 DMO タンパク質の N 末端側から 2 番目にロイシンが挿入されている。

pat 遺伝子は、*Str. viridochromogenes* の野生型 *pat* 遺伝子配列を基に合成された。

ft_t 遺伝子は、*Sph. herbicidovorans* の R-2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸ジオキシゲナーゼ(*Rdpa*)遺伝子配列に、酵素反応速度と除草剤 2,4-D に対する基質親和性を改良するために改変を加えた(参照 16)。FT_T タンパク質は、野生型 *RdpA* タンパク質のアミノ酸配列と比較して 30 箇所のアミノ酸が置換されている。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*R. radiobacter* CP4 株よりクローニングし、植物中での発現が最適となるように塩基配列に改変を加えた。改変 CP4 EPSPS タ

ンパク質は、N 末端側から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。また、同タンパク質には完全長のタンパク質に加え最初のメチオニンが切り離されたタンパク質も含まれる。

(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

①改変 *dmo* 遺伝子

改変 *dmo* 遺伝子がコードする改変 MON87429 DMO タンパク質は、ジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) の改変タンパク質である。DMO は、ジカンバから除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA) とホルムアルデヒドを生成する脱メチル化反応を触媒する酵素である(参照 17)。

改変 *dmo* 遺伝子は葉緑体輸送ペプチド (APG6) のコード配列と結合されており、トウモロコシ MON87429 で発現する改変 MON87429 DMO タンパク質は、APG6 由来の 1 アミノ酸が N 末端に付加されたタンパク質と APG6 由来のアミノ酸が全て切り離された 2 種類のタンパク質を含む。

改変 MON87429 DMO 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について確認するために、毒性タンパク質データベース^aを用いて E-score $<1\times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 18)。

②*pat* 遺伝子

pat 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、グルホシネートをアセチル化し、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートを生成する。グルタミン合成酵素は植物体内のアンモニアの蓄積に関与するとされており、グルホシネートと結合するが、*N*-アセチルグルホシネートとは結合できないため、トウモロコシ MON87429 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる(参照 19)。

PAT 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^aを用いて E-score $<1\times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った結果、1 種類のタンパク質に集約される 18 個のアミノ酸配列が検出されたが、有害なタンパク質とは考えられなかった(参照 20)。

③*ft_t* 遺伝子

ft_t 遺伝子がコードする FT_T タンパク質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤 (キザロホップエチル及び 2,4-D) を酸化し、除草活性のない

^a TOX_2018:GeneBank protein database, 223 版の一部配列 (2018 年 1 月)

化合物に変換するため、トウモロコシ MON87429 はアリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育することが可能となる。

FT_T 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を用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 18)。

④改変 *cp4 epsps* 遺伝子

EPSPS タンパク質は、タンパク質の合成に必須の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つである。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする改変 CP4 EPSPS タンパク質は、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。その結果、トウモロコシ MON87429 は除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することが可能となる。

なお、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットに存在する CaMV 35S プロモーターと雄性組織特異的に発現する内在性 siRNA (mts-siRNA) の標的配列を付加することにより、雄性生殖組織において改変 CP4 EPSPS タンパク質は発現しないか、発現しても微量であるように制御されている(参照 4、5)。mts-siRNA 標的配列は、トウモロコシの雄穂で特異的に発現する mts-siRNA の認識配列を 3' 末端非翻訳領域に持つ遺伝子 EU974548 の部分配列である(参照 5)。

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_2010) を用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 21)。

(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- ZMHT519224 は、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有するが、本遺伝子は外側骨格領域に存在し、トウモロコシ MON87429 には導入され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. 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 *dmo* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ジュズダマ (*Coix lacryma-jobi*) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター及び 5' 末端非翻訳領域及びイントロン配列 (*Clj.Ubq* プロモーター) である(参照 22)。

pat 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*Erianthus ravennae* 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター及び 5' 末端非翻訳領域及びイントロン配列 (*Ea.Ubq* プロモーター) である(参照 22)。

ft_t 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ダンチク (*Arundo donax*) 由来の

ユビキチン遺伝子のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域及びイントロン配列 (*Ad.Ubq* プロモーター) である(参照 22)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の *35S* プロモーター及び 5'末端非翻訳領域である(参照 23)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットの *Mt* ターミネーターは、イネ (*Oryza sativa*) のメタロチオネイン様タンパク質をコードする *OsMt* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である(参照 24)。

pat 遺伝子発現カセットの *Fba* ターミネーターは、アワ (*Setaria italica*) 由来のフルクトースビスリン酸アルドラーゼをコードする *Fba* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である(参照 24)。

ft_t 遺伝子発現カセットの *Nam* ターミネーターは、イネ (*O. sativa*) 由来の no apical meristem タンパク質ドメインをコードする *Nam* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である(参照 24)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの *Grp3* ターミネーターは、イネ (*O. sativa*) 由来のグリシンリッチ RNA 結合タンパク質をコードする *GRP3* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である(参照 24)。

(3) その他

改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *ft_t* 遺伝子発現カセットは、目的タンパク質を葉緑体へ輸送するため、それぞれシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *Apg6* 遺伝子及び *Mdh* 遺伝子のターゲティング配列を含む。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは、目的遺伝子の発現制御の目的でコムギ (*Triticum aestivum*) 由来の *Cab* リーダー配列及びイネ (*O. sativa*) 由来の *Ract1* イントロン配列(参照 25、26)を、目的タンパク質を葉緑体へ輸送するためにシロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の *CTP2* ターゲティング配列を含む。また、目的遺伝子の発現制御の目的で、mts-siRNA 標的配列として、トウモロコシ (*Z. mays*) に由来する EU974548 遺伝子の cDNA の 3'末端非翻訳領域の改変部分配列を含む。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド PV- ZMHT519224 は、PV- ZMHT519224 を構成する外骨格領域からなる中間プラスミドのマルチクローニングサイトに、T-DNA 領域を挿入することにより作製された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PV- ZMHT519224 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- ZMHT519224 の T-DNA 領域に既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性物質と相同性を持つ目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）の有無を、データベース（AD_2018、TOX_2018 及び PRT_2018）を用いて、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索した。その結果、相同性を示す、既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性物質は検出されなかった(参照 27)。

既知のアレルゲンとの相同性検索の結果、連続する 80 アミノ酸以上で 35% 以上の相同性を示す配列は検出されなかったが、連続する 8 アミノ酸が一致した既知のアレルゲンとしてブタクサ (*A. artemisiifolia*) の Art v 1 が検出された。この配列は mts-siRNA 標的配列の逆相補鎖に位置し、ストップコドン間にスタートコドンがなく発現する可能性の低いこと及び野菜果物などの多くの非アレルゲンタンパク質に遍在することなどからアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられた(参照 27)。

- (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- ZMHT519224 の意図する挿入領域は、T-DNA 領域の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までである。

- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド PV- ZMHT519224 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。

表 1 トウモロコシ MON87429 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
(pat 遺伝子発現カセット)	
<i>Ea. Ubq</i> プロモーター	<i>E. ravennae</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター及び 5' 末端非翻訳領域及びイントロン配列 植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>pat</i>	<i>Str. viridochromogenes</i> に由来する PAT タンパク質をコードする遺伝子配列

構成 DNA	由来及び機能
<i>Fba</i> ターミネーター	<i>Setaria italica</i> 由来の <i>Fba</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域 転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
(改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>Clj. Ubq</i> プロモーター	<i>Coix lacryma-jobi</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、 5'末端非翻訳領域及びイントロン配列 植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>APG6</i>	シロイヌナズナ由来の葉緑体輸送ペプチド領域をコードする <i>Apg6</i> 遺伝子のターゲティング配列 目的タンパク質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>dmo</i>	<i>Ste. maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシダーゼをコードする 遺伝子配列
<i>Mt</i> ターミネーター	イネ由来のメタロチオネイン様タンパク質をコードする <i>OsMt</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
(ft _t 遺伝子発現カセット)	
<i>Ad. Ubq</i> プロモーター	ダンチク由来のユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳 領域及びイントロン配列 植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>MDH</i>	シロイヌナズナ由来の葉緑体輸送ペプチド領域をコードする <i>Mdh</i> 遺伝子のターゲティング配列 目的タンパク質を葉緑体へと輸送する。
<i>ft_t</i>	<i>Sph. herbicidovorans</i> 由来の <i>Rdpa</i> 遺伝子を改変した遺伝子 から発現する FOPs 及び 2,4-D ジオキシゲナーゼ (FOPs and 2,4-D dioxy genase version T: FT_T) をコードする遺伝子配 列
<i>Nam</i> ターミネーター	イネ由来の <i>Nam</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス由来の <i>35S</i> プロモーター及び 5'末端非翻訳領域 植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。トウモロコシを含む 単子葉植物の花粉における活性はごくわずか。
<i>Cab</i>	コムギ由来の葉緑素 a/b 結合タンパク質の 5'末端非翻訳リー ダー領域 目的遺伝子の発現を活性化させる。
<i>Ract1</i>	イネ由来のアクチン 1 遺伝子の <i>Ract1</i> イントロン配列 目的遺伝子の発現の制御に関わる。
<i>CTP2</i>	シロイヌナズナ由来の葉緑体輸送ペプチド領域をコードする

構成 DNA	由来及び機能
	<i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 目的タンパク質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) CP4 株由来の CP4 EPSPS をコードする遺伝子配列
mts-siRNA の 標 的配列	トウモロコシ由来の EU974548 遺伝子の雄性組織特異的低分 子干渉 RNA に認識される 3'末端非翻訳領域の部分配列
<i>Grp3</i> ターミナー ター	イネ由来の <i>Grp3</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R.</i> <i>radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、グリホサート耐性をマーカーとして用いて選抜し、形質転換再生個体を得た(参照 28)。次に、自殖により得た個体について、T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域を持たない個体を PCR 法を用いて選抜し、トウモロコシ MON87429 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 MON87429 のゲノムに挿入された T-DNA 領域のコピー数、導入用プラスミド PV-ZMHT519224 由来の非意図的な配列の有無及び挿入近傍配列を確認するために、シーケンス解析及び PCR 分析を行った。

トウモロコシ MON87429 から読まれたリードの冗長度^bは 108 (中央値)、非組換えトウモロコシから読まれたリードの冗長度は 121 (中央値)であった。シーケンス解析で得た塩基配列 (リード) 全てを、導入用プラスミド PV-ZMHT519224 と照合し、コピー数を確定した。その結果、トウモロコシ MON87429 では、T-DNA 領域 5'及び 3'末端配列を含む 2 つの接合領域が特定され、T-DNA 領域が 1 箇所に 1 コピー挿入されたことが示された(参照 29)。一方で、非組換えトウモロコシではこれらの接合領域は確認されなかった。また、トウモロコシ MON87429 において導入用プラスミド PV-ZMHT519224 由来の非意図的な配列は確認されなかった(参照 29)。さらに、トウモロコシ MON87429 の挿入領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの T-DNA 領域と比較した結果、両者は同一であることが確認された。

^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。本試験では、1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標とし、その中央値が 75 以上となる条件で解析を実施。

次に、トウモロコシ MON87429 への挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、MON87429 の挿入 DNA 近傍配列の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列に特異的なプライマーを作成し、非組換えトウモロコシを用いて PCR 分析及び塩基配列の解析を行った後、これをトウモロコシ MON87429 の近傍配列と比較した。その結果、トウモロコシ MON87429 の T-DNA 領域の挿入部位に認められた宿主ゲノムの 54 bp の欠失並びに MON87429 系統の導入遺伝子の 5'末端とトウモロコシゲノム配列の間における 29 bp の付加及び 3'末端とトウモロコシゲノム配列の間における 31 bp の付加が認められた。しかし、それ以外は、トウモロコシ MON87429 の近傍配列と非組換えトウモロコシの塩基配列は一致しており、導入遺伝子の近傍配列が宿主ゲノム由来であることが確認された(参照 29)。

また、トウモロコシ MON87429 のゲノムに DNA を挿入することにより宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列 (1,000 bp)、欠失した 54 bp 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) の計 2,054 bp について、EST データベース (EST_2018^c)、核酸データベース (NT_2018^d) 及びアミノ酸配列データベース (NR_2018^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、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-6}$ かつ 95%以上の相同性を有する配列が認められたが、これらの配列は短い配列か、導入遺伝子挿入部位の下流に位置していた。また、blastx 検索において、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-8}$ の配列が確認されたが、いずれもトウモロコシ MON87429 の導入遺伝子挿入部位の下流に位置していた。したがって、導入遺伝子挿入部位においてトウモロコシ内在性の既知の遺伝子は破壊されているとは考えられなかった(参照 30)。

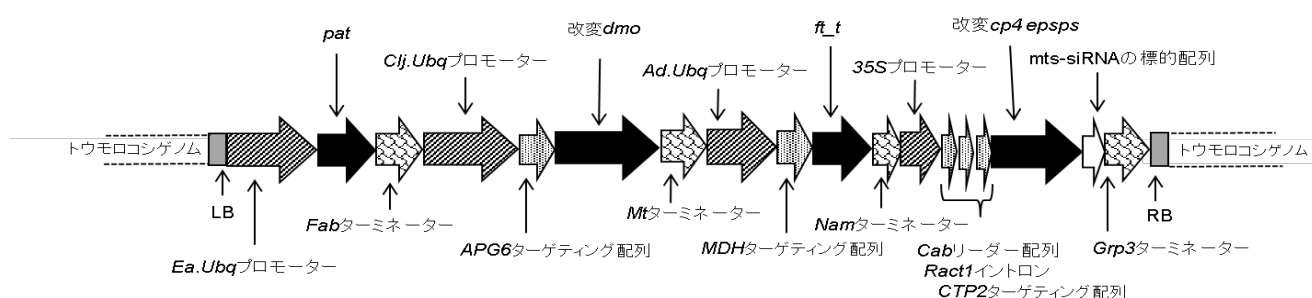


図1 トウモロコシ MON87429 に挿入された DNA (模式図)

(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

^c EST_2018 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2018 年 1 月 16 日時点) EST 配列のデータベースで、76,967,358 配列のサブセット

^d NT_2018 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2018 年 1 月 17 日時点) 塩基配列のデータベースで、45,538,299 配列のサブセット

^e NR_2018 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2018 年 1 月 17 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、139,213,787 配列のサブセット

する事項

トウモロコシ MON87429 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 ORF が生じていないことを確認するために、6 つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 8 アミノ酸以上の接合部を跨ぐ ORF が 14 個認められた(参照 31)。14 個の ORF と既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース (AD_2018^f)、毒性タンパク質データベース (TOX_2018^g) 及びタンパク質データベース (PRT_2018^h) を用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。また、AD_2014 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認められなかった。

トウモロコシ MON87429 の挿入 DNA 領域において、6 つのフレームから目的以外の新規タンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び生理活性のあるタンパク質と構造相関性を有するか調査するため、AD_2018、TOX_2018 及び PRT_2018 を用いて上記と同様の基準にて相同性検索を行った。AD_2018 及び TOX_2018 データベースによる検索結果は第 5-5-(2) 及び第 5-2-(3) に記載のとおりである。PRT_2018 データベースによる検索の結果、既知の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 27)。

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 MON87429 の地上部、穀粒、葉及び根について、改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 及び改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量をマルチプレックスイムノアッセイ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 32)。

^f AD_2018: 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、1,706 配列のサブセット

^g TOX_2018: PRT_2014 から検索し、構築したデータベースで、10,419 配列のサブセット。

^h PRT_2018: GenBank (GenBank protein database, 199 版、2014 年 1 月 24 日) に登録されているタンパク質のアミノ酸配列から構成されるデータベースで、32,476,608 配列のサブセット

表2 トウモロコシ MON87429 における改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 及び改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量（単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重）

分析組織	改変 MON87429 DMO タンパク質の発現量*	PAT タンパク質の発現量**	FT_T タンパク質の発現量***	改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量****
地上部	21	1.3	97	7.6
穀粒	2.4	0.84	47	0.63
葉	35	5.8	440	54
根	2.3	2.0	41	10

* 定量限界は、 $0.14 \mu\text{g/g}$ 乾燥重である。 ** 定量限界は、 $0.03 \mu\text{g/g}$ 乾燥重である。

*** 定量限界は、 $0.036 \mu\text{g/g}$ 乾燥重である。

**** 地上部、穀粒及び葉と根の定量限界は、それぞれ 0.30 、 0.34 及び $0.11 \mu\text{g/g}$ 乾燥重である。

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日に摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 1.0 g (参照 33) を全てトウモロコシ MON87429 に置き換えて改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 及び改変 CP4 EPSPS タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ $2.1 \mu\text{g}$ 、 $0.74 \mu\text{g}$ 、 $41 \mu\text{g}$ 及び $0.55 \mu\text{g}$ 、となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.4 g (参照 33) に占める割合は各タンパク質を合計した場合、 6.4×10^{-7} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Ste. maltophilia* DI-6 株、*Str. viridochromogenes*、*Sph. herbicidovorans* 及び *R. radiobacter* CP4 株に、アレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 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

トウモロコシ MON87429 にて発現する改変 MON87429 DMO、PAT 及び改

変 CP4 EPSPS タンパク質の物理化学的処理に対する感受性は、既に安全性審査の終了した改変 MON87419 DMO 及び改変 MON88701 DMO タンパク質、PAT タンパク質並びに改変 CP4 EPSPS タンパク質の物理化学的処理に対して感受性を示す結果と同等であると考えられた。

① 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた FT_T タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析においては、完全長の FT_T タンパク質は試験開始後 0.5 分以内に消化されるが、約 4 kDa のフラグメントが 0.5 分後から 60 分後にわたり認められた。また、ウェスタンブロット分析では、約 4 kDa のフラグメントは検出されず、完全長の FT_T タンパク質は試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 34)。

約 4 kDa のフラグメントについて評価するため、人工胃液処理を 2 分間行った後、0 分～2 時間にわたり人工腸液を処理し、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、約 4 kDa のフラグメントは、人工腸液処理 0.5 分以内に消化されることが確認された(参照 34)。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた FT_T タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された(参照 34)。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた FT_T 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、マルチプレックスイムノアッセイを行った。その結果、75℃、15 分間の加熱処理に対して免疫反応性が消失し(参照 35)、加熱処理に対し感受性を示すことが示唆された。

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

改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 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_2018ⁱ を用いて相同性検索を行った。その結果、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を示す既知のアレルゲン、連続する 80 アミノ酸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及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった。

上記（１）～（４）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 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。

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 MON87429 の穀粒から抽出されたゲノム DNA を用いてシーケンス解析を行った結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 個検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された(参照 29)。

また、改変 MON87429 DMO、PAT、FT_T 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 MON87429 の穀粒について、ウェスタンブロット分析を行った結果、非遺伝子組換え体では発現していないが、供試した 5 世代ではいずれの世代でもそれぞれのタンパク質が発現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

・改変 MON87429 DMO タンパク質

トウモロコシにおいて DMO タンパク質の基質となりうる化合物を検討した結果、植物に存在している化合物中で最も構造的にジカンバに類似している *o*-アニス酸でも、DMO タンパク質により代謝されないことが確認されている(参照 37, 38)。

改変 MON87429 DMO タンパク質は、野生型 DMO タンパク質のアミノ酸配列と比較して、N 末端側から 2 番目にロイシンが挿入されている。この挿入に加えて APG6 由来のアミノ酸が全て切り離されたもの及び N 末端に 1 アミノ酸が付加されたものの 2 種類が存在するが、N 末端領域は、立体構造において触媒部位から離れているため DMO タンパク質の基質特異性に影響しないと考えられた。

以上から、改変 MON87429 DMO タンパク質が内在性化合物を代謝して宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

・PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-ホスフィノスリシンをアセチル化することによって、除草剤としての機能を失わせる。その反応は、L-ホスフィノスリシンに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

・FT_T タンパク質

FT_T タンパク質が宿主の内在性化合物を代謝する可能性を基質反応性試験にて検討した。アリルオキシアルカノエート系除草剤の基本構造を有するジクロロプロップ (DCP) と構造的に相同性を有する化合物を、まず、データ

ベース NAPRALERTⁱ(参照 39)を用いてスクリーニングし、次に FT_T タンパク質の活性部位に結合するかドッキングシミュレーションにより選定した。その結果、38 化合物が選定され、入手可能な 32 化合物を用いて基質反応性試験を行ったところ、FT_T タンパク質は 32 化合物のいずれに対しても活性がないことが示された。したがって、FT_T タンパク質が内在性化合物を代謝して宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

・ 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、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

・ mts-siRNA の標的配列

mts-siRNA の標的配列をクエリーとした BLAST 検索により、相同性を有するトウモロコシ内在性遺伝子を同定した結果、EU974548 遺伝子のクラスターと考えられる 7 つの遺伝子が検出された(参照 5)。これら 7 つの内在性遺伝子の雄穂における mRNA 量を測定した結果、トウモロコシ MON87429 と非組換えトウモロコシに統計学的有意差は認められなかったことから、他の内在性遺伝子の mRNA 量にも影響を与えないと考えられた。したがって、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の mRNA が mts-siRNA の標的配列を有することにより宿主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

米国のほ場で栽培され、除草剤グルホシネート、キザロホップエチル、ジカンバ及び 2,4-D を処理したトウモロコシ MON87429 及び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 40)。

(1) 主要構成成分

穀粒及び地上部の主要構成成分（粗タンパク質、粗脂質、炭水化物、酸性、中性デタージェント繊維（穀粒及び地上部）、灰分及び総食物繊維（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かったか、認められた場合にも平均値は ILSI データベースの範囲内であった。

ⁱ 植物を含む生物由来の抽出物及び天然化合物のデータベース

(2) 脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 9 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が認められなかったか、認められた場合にもそれらの平均値は ILSI データベースの範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ミネラル類

穀粒のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛）及び地上部のミネラル類（カルシウム、リン）について分析を行った結果、銅、鉄、マグネシウムにおいて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た。なお、それらの平均値は 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

穀粒のビタミン A（ β -カロチン）、ビタミン B₁（チアミン）、ビタミン B₂（リボフラビン）、ビタミン B₃（ナイアシン）、ビタミン B₆（ピリドキシン）、ビタミン B₉（葉酸）及びビタミン E（ α -トコフェロール）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかったか、認められた場合にも、平均値は ILSI データベースの範囲内であった。

(6) 二次代謝産物

穀粒のフェルラ酸及び *p*-クマル酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(7) 有害生理活性物質

穀粒のフィチン酸及びラフィノースについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

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、いずれも 2020 年 8 月に安全性が確認された。

米国においては、食品・飼料のための申請が、2019 年 2 月に米国食品医薬品庁（FDA）に対して、無規制裁培のための申請が、同年 6 月に米国農務省（USDA）に対して行われた。

欧州においては、食品、飼料及び輸入のための安全性審査の申請が、2019 年 9 月に欧州食品安全機関（EFSA）に対して行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、食品としての安全性審査の申請がオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して行われ、2020 年 12 月に安全性が確認された。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87429 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 MON87429 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

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 戸澤英男. トウモロコシ ―歴史・文化、特性・栽培、加工・利用―. 農山漁村文化協会. 2005.
2. ILSI. ILSI Crop Composition Database (Version 6.0). ILSI Research Foundation. 2016.
3. OECD. ENV/JM/MONO(2002)14 Module II: Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin)-Tolerant Transgenic Plants. 2002b.
4. Hamilton D A, Roy M, Rueda J, Sindhu R K, Sanford J, and Mascarenhas J P: Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Mol Biol* 1992; 18: 211-8
5. Yang H, Qi Y, Goley M E, Huang J, Ivashuta S, Zhang Y et al.: Endogenous tassel-specific small RNAs-mediated RNA interference enables a novel glyphosate-inducible male sterility system for commercial production of hybrid seed in *Zea mays* L. *PLoS One* 2018; 13: e0202921
6. OECD. ENV/JM/MONO(2003)11 CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF *ZEA MAYS* SUBSP. *MAYS* (MAIZE). 2003.
7. Pastorello E A, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari A M, Scibilia J et al.: Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 775-83
8. Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B et al.: IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy* 2002; 57: 98-106
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. 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
11. 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
12. Sequence of Genetic Elements in PV ZMHT519224. (社内文書)
13. Lira F, Berg G, and Martinez J L: Double-Face Meets the Bacterial World: The Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Front Microbiol* 2017; 8: 2190

14. Goodfellow M and Williams S T: Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1983; 37: 189-216
15. Chaudhary D K, Jeong S W, and Kim J: *Sphingobium naphthae* sp. nov., with the ability to degrade aliphatic hydrocarbons, isolated from oil-contaminated soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67: 2986-93
16. Larue C T, Goley M, Shi L, Evdokimov A G, Sparks O C, Ellis C et al.: Development of enzymes for robust aryloxyphenoxypionate and synthetic auxin herbicide tolerance traits in maize and soybean crops. *Pest Manag Sci* 2019; 75: 2086-94
17. Chakraborty S, Behrens M, Herman P L, Arendsen A F, Hagen W R, Carlson D L et al.: A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* 2005; 437: 20-8
18. Bioinformatics Evaluation of the DMO and FT_T Proteins in MON 87429 Utilizing the AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases. (社内文書)
19. OECD. ENV/JM/MONO(2002)25 Consensus Document on Compositional. Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites. 2002a.
20. Bioinformatics Evaluation of the PAT Protein Utilizing the AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases. (社内文書)
21. Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases. (社内文書)
22. Cornejo M J, Luth D, Blankenship K M, Anderson O D, and Blechl A E: Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant molecular biology* 1993; 23: 567-81
23. Odell J T, Nagy F, and Chua N H: Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 1985; 313: 810-2
24. Hunt A: Messenger RNA 3' End Formation in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1994; 45: 47-60
25. Lamppa G K, Morelli G, and Chua N H: Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Mol Cell Biol* 1985; 5: 1370-8
26. McElroy D, Zhang W, Cao J, and Wu R: Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* 1990; 2: 163-71
27. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87429 Utilizing the AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases. (社内文書)
28. Huang M D, Wei F J, Wu C C, Hsing Y I, and Huang A H: Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. *Plant Physiol*

- 2009; 149: 694-707
29. Amended from MSL0028866: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Maize (MON 87429). (社内文書)
 30. Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87429: BLASTn and BLASTx Analyses Utilizing the EST_2018, NT_2018, and NR_2018 Databases. (社内文書)
 31. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the MON 87429 Insert: Assessment of Putative Peptides. (社内文書)
 32. Amended Report for MSL0029693: Assessment of DMO, PAT(pat), FT_T and CP4 EPSPS Protein Levels in Maize Tissues Collected from MON 87429 Produced in United States Field Trials During 2017. (社内文書)
 33. 厚生労働省. 平成 29 年国民健康・栄養調査報告 (平成 30 年 12 月公表). 2018a.
 34. Assessment of the in vitro Digestibility of Escherichia coli (E. coli)-produced FT_T Protein by Pepsin and Pancreatin. (社内文書)
 35. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of Escherichia coli-produced MON 87429 FT_T Protein. (社内文書)
 36. Amended Report for MSL0029498: Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, DMO, PAT and FT_T Proteins in Maize Grain Samples across Multiple Generations of MON 87429. (社内文書)
 37. D'Ordine R L, Rydel T J, Storek M J, Sturman E J, Moshiri F, Bartlett R K et al.: Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. J Mol Biol 2009; 392: 481-97
 38. Dumitru R, Jiang W Z, Weeks D P, and Wilson M A: Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. J Mol Biol 2009; 392: 498-510
 39. Bisson J, McAlpine J B, Graham J, and Pauli G F. NAPRALERT, from an historical information silo to a linked resource able to address the new challenges in Natural Products Chemistry and Pharmacognosy, Corvallis, OR. 2016.
 40. Compositional Analyses of Maize Grain and Forage Harvested from MON 87429 Grown in the United States During the 2017 Season. (社内文書)

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統」に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）についての意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 令和3年3月24日～令和3年4月22日

2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送

3. 提出状況 3件

4. 意見・情報及び食品安全委員会の回答

	意見・情報※	食品安全委員会の回答
1	ヒトへの悪影響の大きいグリホサート等に耐性のある遺伝子組換えを施したトウモロコシと聞いただけで、自然の摂理に反したもので、食欲が減退します。すでにトウモロコシでは206もの遺伝子組換え品が承認されているようですが、トウモロコシを食べるには相当の勇気が要りそうです。 ・いくら、1日当たりの摂取量が僅少とはいえ、わずか数十年程度の知見に限られている遺伝子組換え品については、中期的な影響はまだまだ判断できないはずです。遺伝子組換え品は、100%の安全性が断言できるまで、使用を禁止すべきです。 ・参照資料のうち13文書は、申請者が提出した資料。申請者の出した資料は、通りやすいように何らかの改変や「いいとこどり」などがあるものであり、それを完全否定できない限り社内資料を評価	食品安全委員会は、国民の健康の保護が最も重要であるという基本的認識の下、規制等のリスク管理を行う行政機関から独立して、科学的知見に基づき客観的かつ中立公正に食品健康影響評価を行っています。この食品健康影響評価は、食品安全基本法第11条第3項に基づき、その時点において到達されている水準の科学的知見に基づいて行うこととしております。 また、食品健康影響評価は、申請者の提出した資料をもとに行いますが、これまでの科学的知見や海外での評価結果も踏まえ、資料の内容についての問題点、疑問点については説明や再提出を求めるとともに、調査会の審議において、資料の内容が不足していると判断された場合は、追加試験等のデータを含め必要な追加資料の提出を求めています。 本トウモロコシについては、「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

	に用いるべきではない。 ・日本ではすでに 400 近い遺伝子組換え成分が承認されており、この数字はダントツの世界一のレベルと思われるが（違っていたら訂正ください）、これ以上増やすのはやめていただき、いったんすべての遺伝子組換え品の流入を停止いただきたい。	全委員会決定）に基づき評価を行った結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断しました。 なお、遺伝子組換え食品等の使用に関する御意見は、リスク管理に関するものと考えられることから、厚生労働省へお伝えします。
2	ゲノム編集または遺伝子組み換えの飼料/食品について、市場承認のために提出されている書類には、以下、重大な欠陥があり、健康と環境に対する安全性が実証されていることを要求する基準を満たしているとは考えられない状態です。 ○リスク評価のための試験における除草剤の適用が実際の農業の実践に対応していないこと ○食餌試験用に調製された材料が食物連鎖に入る材料とは異なること ○散布による残留物の安全性試験のための重要なデータが欠落していること ○相補的な除草剤の適用に関連した累積的・組み合わせ的な影響、及び、除草剤と植物（成分）の相互作用と長期的な影響であること https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-019-0274-1	いただきました御意見は、農薬（除草剤）のものであり、遺伝子組換え食品の安全性評価を内容とした本食品健康影響評価の審議結果案には直接関係するものではないと考えられます。 なお、農薬の使用や残留基準、遺伝子組換え食品の使用に関する御意見は、リスク管理に関するものと考えられることから、農林水産省及び厚生労働省へお伝えします。 残留物の安全性については、3 件目の御意見に対する回答と同様です。
3	評価書中の 6 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項で、FT_T タンパク質による内在性化合物の代謝を検討されています。FT_T タンパク質の基質特異性は他の導入遺伝子の産物のタンパク質の基質特異性に比べて低く、使用が予定されているキザロホップエチル	本トウモロコシに使用されるアリロキシアルカノエート系除草剤は、キザロホップエチル及び 2,4-D とされております。 これらの除草剤を使用した場合に残留する可能性のある代謝物を検討したうえで、作物への残留を確認しております。その結果、代謝物であるキ

や2,4-D 以外のアリルオキシアルカノエート系除草剤を代謝するようには思えます。これら除草剤の代謝産物はフェノールと思われますが、いずれも FT_T タンパク質を産生する植物以外では植物からも動物からも生成しない、この遺伝子組み換え体に特異的な代謝物と思います。評価書には記載が無いようなのですが、異なるアリルオキシアルカノエート系除草剤由来のフェノール代謝物の安全性の検討結果をお示しいただきたいと思っています。検討されていないのであれば、検討が不要な根拠を示してください。除草剤耐性のないトウモロコシに使用可能な同系統の代謝産物を心配しています。特にフルロキシピルという除草剤が米国で使用されているようで、その代謝物の構造に懸念を持ちました。	ザロホップ P 及び 2,4-DCP の残留は、検出限界未満であることを確認しております。
---	--

※ 頂いた意見・情報はそのまま掲載しています。