



府食第19号  
平成29年1月17日

厚生労働大臣  
塩崎 恭久 殿

食品安全委員会  
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成28年9月5日付け厚生労働省発生食0905第1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「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシMON87419系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシMON87419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

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性  
トウモロコシ MON87419 系統

2017年1月

食品安全委員会

## 目 次

	頁
<審議の経緯> .....	3
<食品安全委員会委員名簿> .....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿> .....	3
要 約 .....	4
I. 評価対象食品の概要 .....	5
II. 食品健康影響評価 .....	5
第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相 違に関する事項 .....	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項 .....	5
2. 宿主の食経験に関する事項 .....	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項 .....	5
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項 ...	6
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品として の性質に関する事項 .....	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項 .....	6
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項 .....	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 .	7
6. 安全な摂取に関する事項 .....	7
7. 近縁の植物種に関する事項 .....	7
第4. ベクターに関する事項 .....	8
1. 名称及び由来に関する事項 .....	8
2. 性質に関する事項 .....	8
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項 .....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 .....	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項 .....	9
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項 .....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 .....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項 .....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項 .....	13

第6. 組換え体に関する事項 .....	13
1. 遺伝子導入に関する事項 .....	13
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項 .....	16
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項 .....	17
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 .....	19
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>

- 2016年9月5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0905第1号）、関係書類の接受
- 2016年9月13日 第622回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年9月28日 第153回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年10月19日 第154回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年11月22日 第630回食品安全委員会（報告）
- 2016年11月24日から12月23日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2017年1月11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へ報告
- 2017年1月17日 第635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>

- | 2017年1月6日まで | 2017年1月7日から |
|-------------|-------------|
| 佐藤 洋（委員長）   | 佐藤 洋（委員長）   |
| 山添 康（委員長代理） | 山添 康（委員長代理） |
| 熊谷 進        | 吉田 緑        |
| 吉田 緑        | 山本 茂貴       |
| 石井 克枝       | 石井 克枝       |
| 堀口 逸子       | 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>

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

## 要 約

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 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 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ及びホスフィノスリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼを発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの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。

したがって、「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 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：除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 系統  
性質：除草剤ジカンバ耐性及び除草剤グルホシネート耐性  
申請者：日本モンサント株式会社  
開発者：Monsanto Company（米国）

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 系統」（以下「トウモロコシ MON87419」という。）は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子（改変 *dmo* 遺伝子）及び *Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ（改変 MON87419 DMO タンパク質）及び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）を発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの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* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統である。

##### (2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、*pat* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* である。

##### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *dmo* 遺伝子は、除草剤ジカンバを不活性化する酵素である改変 MON87419 DMO タンパク質を発現する。*pat* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質を発現する。

改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 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、タンパク質 5.7～17.3%、総脂質 1.4～7.8%、総食物繊維 8.7～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.7%である（参照 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 0.1～1.6%、ラフィノース 0.02～0.44%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 MON87419 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 MON87419 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 MON87419 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 MON87419 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 MON87419 は、改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の導入によって、改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT 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 MON87419 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 MON87419 は、導入された改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT タンパク質を発現することによって、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育することができることとされている。

## 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 4）。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毒性物質についてはその産生性が知られていないが、栄養阻害物質としては、フィチン酸、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 5、6）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 4）が、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

### 6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。トウモロコシは、食品分野においてコーン油及びコーンスターチ等の原料として幅広く利用されている。

### 7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、テオシント及びトリプサカム属が知られているが（参照 4）、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 MON87419 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMHT507801 の外側骨格領域は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来のプラスミド RK2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-ZMHT507801 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。

#### (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-ZMHT507801 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-ZMHT507801 の外側骨格領域の塩基配列は明らかになっており（参照7）、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-ZMHT507801 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-ZMHT507801 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* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、*pat* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* である。

#### (2) 安全性に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は植物の根圏や土壌等の自然環境中及び食品中に存在しており、健康なヒトに感染して悪影響を及ぼすことは知られていない（参照8）。

*pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* が属する *Streptomyces* 属は食経験がないが、土壌等に存在しており、これらを通じてヒトは接触経験が

あると考えられる。また、ヒトに対する病原性を持つという報告はない（参照 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

### (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 *S. maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子をクローニングすることにより構築された遺伝子である。野生型 DMO タンパク質のアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目にロイシンが挿入されている。

*pat* 遺伝子は、*S. viridochromogene* からクローニングした遺伝子である。

なお、*cp4 epsps* 遺伝子は、選抜マーカーとして導入用プラスミドの T-DNA II 領域にクローニングされたが、育成過程で分離されトウモロコシ MON87419 には含まれていない。

挿入 DNA の構成要素は表 1 及び表 2 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

#### ・改変 *dmo* 遺伝子

改変 *dmo* 遺伝子がコードする改変 MON87419 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、除草剤ジカンバから 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 10）。

トウモロコシ MON87419 で発現する改変 MON87419 DMO タンパク質は、葉緑体輸送ペプチド (CTP4) 由来の 12 個のアミノ酸が N 末端に付加されたタンパク質 (改変 MON87419 DMO+12 タンパク質) 及び CTP4 由来の 7 個のアミノ酸が N 末端に付加されたタンパク質 (改変 MON87419 DMO+7 タンパク質) を含む（参照 11）。

改変 MON87419 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 (TOX\_2014<sup>a</sup>) を用いて FASTA 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 12）。

---

<sup>a</sup> TOX\_2014: GenBank (GenBank protein database, 199 版、2014 年 1 月 24 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) から検索して集めた 10,570 配列のサブセット。

・ *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、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、阻害されることはない。その結果、トウモロコシ MON87419 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 13)。

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 (TOX\_2014<sup>a</sup>) を用いて FASTA 検索を行い、得られた結果を精査したところ、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 12)。

(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-ZMHT507801 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 MON87419 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

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の完全長転写物の *PCISV* プロモーターである(参照 14)。

*pat* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*Andropogon gerardii* 由来のユビキチン遺伝子の *Ubp* プロモーターである(参照 15)。

(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ターミネーターは、コムギ (*Triticum aestivum*) の熱ショックタンパク質をコードする *Hsp17* 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域である(参照 16)。

*pat* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、イネ (*Oryza sativa*) の  $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター (*Ara5*) をコードする RA5B 前駆体遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域である(参照 17)。

(3) その他

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットは、目的遺伝子の発現を高めるため、コムギ葉緑素 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 18、19)。

*pat* 遺伝子発現カセットは、目的遺伝子の発現を高めるため、*A. gerardii* 由来のユビキチン遺伝子の 5' 末端非翻訳領域の *Ubq* リーダー配列及び *Ubq* イ

ントロン配列を含む（参照 15）。

#### 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-ZMHT507801 は、外側骨格領域、境界領域及び T-DNA II 領域により構成される中間プラスミドのマルチクローニングサイトに、T-DNA I 領域を挿入することにより構築された。

#### 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-ZMHT507801 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 7）。

##### (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-ZMHT507801 の塩基配列は明らかになっており、挿入された T-DNA I 領域に目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (ORF) は含まれていない（参照 12、20）。

##### (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-ZMHT507801 の意図する挿入領域は、T-DNA I 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-ZMHT507801 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（参照 7）。

表1 トウモロコシ MON87419 への挿入 DNA (T-DNA I 領域)

構成要素	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来の DNA 領域
( <i>pat</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>Ubg</i> プロモーター	プロモーター領域 <i>Andropogon gerardii</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター配列
<i>Ubg</i>	<i>A. gerardii</i> 由来のユビキチン遺伝子の 5' 末端非翻訳リーダー領域
<i>Ubg</i>	<i>A. gerardii</i> 由来のユビキチン遺伝子のイントロン配列
<i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (PAT タンパク質) をコードする <i>pat</i> 遺伝子
<i>Ara5</i> ターミネーター	ターミネーター領域 イネ由来の $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター ( <i>Ara5</i> ) をコードする RA5B 前駆体遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域
(改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>PCISV</i> プロモーター	プロモーター領域 Peanut chlorotic streak caulimovirus の完全長転写物のプロモーター配列
<i>Cab</i>	コムギの葉緑素 a/b 結合タンパク質の 5' 末端非翻訳リーダー領域
<i>Ract1</i>	イネのイネアクチン 1 遺伝子の <i>Ract1</i> イントロン配列
<i>CTP4</i>	ペチュニア由来の EPSPS タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>dmo</i>	<i>S. maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) をコードする改変 <i>dmo</i> 遺伝子
<i>Hsp17</i> ターミネーター	ターミネーター領域 コムギの熱ショックタンパク質 ( <i>Hsp17</i> ) の 3'末端非翻訳領域
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来の DNA 領域

表2 トウモロコシ MON87419 への挿入 DNA② (T-DNA II : 選択マーカーとして一時的に導入)

構成要素	機能及び由来
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来の DNA 領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	

<i>Ract1</i> プロモーター	プロモーター領域 イネのアクチン1 遺伝子の <i>act1</i> のプロモーター
L- <i>Ract1</i>	イネのアクチン1 遺伝子の <i>act1</i> の 5' 非翻訳領域リーダー配列
I- <i>Ract1</i>	イネのアクチン1 遺伝子の <i>act1</i> インترون配列
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ由来の EPSPS タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子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 株の改変 CP4 EPSPS タンパク質をコードする遺伝子
<i>nos</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) pTi 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来の DNA 領域

## 6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用ベクターPV-ZMHT507801 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。次に、自殖により得た個体について、改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域をホモで有し、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域を持たない個体を PCR 分析を用いて選抜した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、自殖及び既存の品種との交配又は戻し交配を行い、トウモロコシ MON87419 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 MON87419 のゲノムに挿入された T-DNA I 領域の挿入箇所数、コピー数、T-DNA II 領域及び外側骨格配列の有無を確認するために、次世代シーケンス技術及びバイオインフォマティクスによる接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis: NGS/JSA) 並びに PCR 分析及び PCR 産物の塩基配列解析を行った。

トウモロコシ MON87419 及び非組換えトウモロコシからゲノムを抽出し、NGS/JSA を行った結果、両ゲノムから読まれたリードの冗長度<sup>b</sup>は平均で 135 及び 118 であり、両トウモロコシのゲノム解析はできたと判断された。NGS で得た塩基配列 (リード) 全てを、導入用プラスミド PV-ZMHT507801 と照合

<sup>b</sup> 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。

し、導入用プラスミドと相同性がある配列と相同性がない配列の両方をもつリードを導入遺伝子との接合領域として検出し、重複を確認することで、接合領域の検出数、すなわちコピー数として確定した。その結果、トウモロコシ MON87419 では、T-DNA I 領域の 5' 及び 3' 末端配列を含む 2 つの接合領域が特定されたが、非組換えトウモロコシではこれらの接合領域は確認されなかった。また、トウモロコシ MON87419 の NGS の結果から得られたリード配列と導入用プラスミド PV-ZMHT507801 との配列について相同性解析を行った結果、T-DNA I 領域の冗長度は中央値が 145、最低冗長度が 41 であることを確認し、トウモロコシ MON87419 において T-DNA I の全領域にリードが検出されたものの、T-DNA II 領域及び外側骨格領域と相同性のある配列は確認されなかった。以上のことから、トウモロコシ MON87419 のゲノム中に T-DNA I 領域が 1 箇所につき 1 コピー挿入され、導入プラスミドの T-DNA II 領域及び外側骨格領域はゲノム中に存在しないことが確認された(参照 21)。さらに、トウモロコシ MON87419 の挿入領域について PCR 分析及び PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの T-DNA I 領域と比較した結果、両者は同一であることが確認された。

次に、トウモロコシ MON87419 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、MON87419 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のち、これをトウモロコシ MON87419 の近傍配列と比較した。その結果、トウモロコシ MON87419 の T-DNA I 領域の挿入部位に認められた宿主ゲノムの 602 bp の欠失を除き、トウモロコシ MON87419 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 21)。

また、トウモロコシ MON87419 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 (1,246 bp)、欠失した 602 bp 及び 3'末端近傍配列 (1,251 bp) の計 3,099 bp について、EST データベース (EST\_2014<sup>c</sup>)、核酸データベース (NT\_2014<sup>d</sup>) 及びアミノ酸配列データベース (NR\_2014<sup>e</sup>) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索において、95%以上の相同性を有する配列が認められたが、これらの配列は相同性を示した部分が 100 bp 以下の配列と短い場合、導入遺伝子挿入部位から 400 bp 以上離れていた。また、blastx 検索において、相同性を有する配列が確認されたが、クエリー配列との部分的一致で

---

<sup>c</sup> EST\_2014 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) EST 配列のデータベースで、75,091,877 配列のサブセット。

<sup>d</sup> NT\_2014 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) 塩基配列のデータベースで、20,846,064 配列のサブセット。

<sup>e</sup> NR\_2014 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2014 年 1 月 24 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、34,985,996 配列のサブセット。



あり、内在性遺伝子の存在を示すものではないと考えられた。トウモロコシゲノムマップ<sup>f</sup>を用いて、内在性遺伝子の破壊の有無を確認した結果、遺伝子挿入部位から最も近い位置にあるトウモロコシ EST はそれぞれ 880 bp 及び 3,335 bp 離れて存在していることから、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（参照 22、23）。

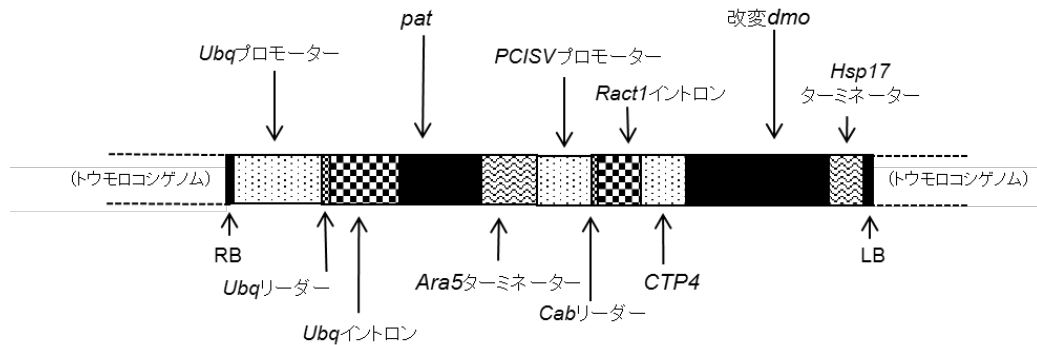


図1 トウモロコシ MON87419 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87419 の挿入 DNA 領域 (6,762 bp) と 5'末端近傍配列 (1,246 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,251 bp) との接合部において意図しない ORF が生じていないかどうかを確認するために、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 アミノ酸以上の接合部を跨ぐ ORF が 11 個見いだされた（参照 24）。11 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\_2014<sup>g</sup>)、毒性タンパク質データベース (TOX\_2014<sup>h</sup>) 及びタンパク質データベース (PRT\_2014<sup>i</sup>) を用いて FASTA 検索を行った。また、AD\_2014 及び TOX\_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見いだされず、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列も見いだされなかった。PRT\_2014 による相同性検索の結果、相同性の高いフレームが 5'末端近傍に見られたが、クエリー配列との部分的一致であり、毒性タンパク質とは考えられなかった。

トウモロコシ MON87419 の挿入 DNA 領域において、六つのフレームから

<sup>f</sup> Pytozome v10.3 *Zea Mays* 6a assembly

<sup>g</sup> AD\_2014: 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。

<sup>h</sup> TOX\_2014: PRT\_2014 から検索し、構築したデータベースで、10,419 配列のサブセット。

<sup>i</sup> PRT\_2014: GenBank (GenBank protein database, 199 版、2014 年 1 月 24 日)に登録されているタンパク質のアミノ酸配列から構成されるデータベースで、32,476,608 配列のサブセット。

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有害な生理活性のあるタンパク質と構造相関性を有するか調査するため、AD\_2014、TOX\_2014 及び PRT\_2014 を用いて FASTA アルゴリズムにより相同性を検索した結果、既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び生理活性のあるタンパク質との相同性は認められなかった（参照 20）。

## 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 MON87419 の葉、根、地上部及び穀粒について、改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT 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 3 のとおりである（参照 25）。

表 3 トウモロコシ MON87419 における改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

(単位は  $\mu\text{g/g}$  新鮮重)

分析組織*	改変 MON87419 DMO タンパク質の発現量**	PAT タンパク質の発現量 ***
葉	3.7	1.5
根	0.81	0.84
地上部	1.8	1.6
穀粒	0.17	0.85

\* 葉及び根は 3 葉期、地上部は黄熟期、穀粒は成熟期の値を示した。

\*\*検出限界は、葉が 0.027、根が 0.038、地上部 0.024、穀粒が 0.022  $\mu\text{g/g}$  新鮮重である。

\*\*\*検出限界は、葉が 0.043、根が 0.037、地上部 0.014、穀粒が 0.007  $\mu\text{g/g}$  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 26）を全てトウモロコシ MON87419 に置き換えて改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT タンパク質の摂取量を計算すると、0.085 µg 及び 0.425 µg（合計 0.510 µg）となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 68.9 g（参照 26）に占める割合は  $7.4 \times 10^{-9}$  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* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* DI-6 及び *S. viridochromogenes* 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 MON87419 DMO タンパク質及び PAT 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 MON87419 の種子より抽出した改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT タンパク質、並びに *E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 タンパク質及び PAT タンパク質とのそれぞれの同等性が確認されていることから（参照 27、28）、*E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 タンパク質及び PAT タンパク質を以下の分析に用いた。

##### ① 人工胃液に対する感受性

###### ・改変 MON87419 DMO+12 タンパク質

*E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析において試験開始後 2 分以内に約 3 kDa のフラグメントが認められたが、5 分後には消化されることが確認された。また、ウェスタンブロット分析において改変 MON87419 DMO+12 タンパク質のバンドの他に複数の薄いバンドが消化前に観察されたが、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 29）。

###### ・PAT タンパク質

*E. coli* で発現させた PAT タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析において試験開始後 0.5 分以内に消化され、試験開始後 5 分まで約 3 kDa のフラグメントが認められたが、10 分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 30）。

② 人工腸液に対する感受性

・改変 MON87419 DMO+12 タンパク質

*E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 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。また、試験開始 5 分後に約 12 kDa 及び約 21 kDa のバンドが観察されたが、15 分以内には消失することが確認された（参照 29）。

・PAT タンパク質

*E. coli* で発現させた PAT 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 30）。

③ 加熱処理に対する感受性

・改変 MON87419 DMO+12 タンパク質

*E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 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、55°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 31）。

・PAT タンパク質

*E. coli* で発現させた PAT 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、75°C、15 分間及び 55°C、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 32）。

(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 MON87419 DMO+12 タンパク質及び PAT 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\_2014 を用いて相同性検索を行った。その結果、*E-score* が  $1 \times 10^{-5}$  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 12）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD\_2014 を用いて相同性検索を行った結果、改変 MON87419 DMO+12 タンパク質及び PAT タンパク質において連続する 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。

改変 MON87419 DMO+12 タンパク質のアミノ酸配列には改変 MON87419 DMO+7 タンパク質の配列も含まれること及び上記（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT 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 MON87419 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 21）。

また、改変 MON87419 DMO タンパク質及び PAT 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 MON87419 の穀粒について、非組換え体及び *E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 タンパク質及び PAT タンパク質を対照とし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 33）。

さらに、トウモロコシ MON87419 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 MON87419 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 34）。

## 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 MON87419 DMO タンパク質

DMO タンパク質が植物の代謝経路に与える影響について、植物体中に存在する化合物のうち、ジカンバと構造が類似する化合物（カルボキシル基、メトキシ基及びクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物）が DMO タンパク質の基質となる可能性を検討した。その結果、トウモロコシにおいてクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物の報告はなく、また、カルボキシル基及びメトキシ基を含む化合物として *o*-アニス酸が存在するが、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としている（参照 35、36）。

改変 MON87419 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 末端に CTP4 由来の 12 アミノ酸及び 7 アミノ酸が付加され、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。これらのアミノ酸配列の違いが存在する N 末端領域は、触媒領域と立体構造的に離れていることから（参照 35）、DMO タンパク質の基質特異性に影響しないと考えられた。

したがって、改変 MON87419 DMO タンパク質が、ジカンバ以外の化合物を代謝し、植物の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと判断された。

### ・PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-グルホシネート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-グルホシネートに特異的で、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（参照 37、38）、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。

## 7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたトウモロコシ MON87419 と宿主である非組換えトウモ

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

（1）主要構成成分

穀粒及び地上部の主要構成成分（タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維、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。

（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、9 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かった。残りの 13 種類については定量限界値未満であった。

（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が認められなかった。

（4）ミネラル類

穀粒のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛）及び地上部のミネラル類（カルシウム、リン）について分析を行った結果、銅については、定量限界値未満であった。銅を除くミネラル類については、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 のデータベースに基づく範囲内であった（参照 40）。

（5）ビタミン類

穀粒の葉酸（ビタミン B<sub>9</sub>）、ナイアシン（ビタミン B<sub>3</sub>）、ビタミン A、ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>2</sub>、ビタミン B<sub>6</sub>及びビタミン E（ $\alpha$ -トコフェロール）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

（6）二次代謝産物

穀粒のフェルラ酸、*p*-クマル酸及びフルフラールについて分析を行った結果、フェルラ酸及び *p*-クマル酸については、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められなかった。フルフラールについては定量限界未満であった。

（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かった。

## 8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査の申請及び米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請が行われ、それぞれ 2016 年 3 月に安全性認可を受けた。

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）に対して食品及び環境・飼料の安全性審査の申請が行われ、それぞれ 2016 年 2 月に安全性認可を受けた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、2015 年 8 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2016 年 9 月に安全性認可を受けた。

## 9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87419 の栽培方法は、生育期に除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネ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 MON87419 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

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 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 2005 トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用— 社団法人農山漁村文化協会 東京
2. ILSI. 2014. Crop Composition Database, Version 5.0. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed April 22, 2015].
3. OECD. 2002a. 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.
4. OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.27. Organisation of Economic Co-operation and Development, Paris, France.
5. 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.
6. 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.
7. Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT507801 (社内報告書)
8. Ryan, R.P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M.B. Avison, G. Berg, D. van der Lelie and J.M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7: 514-525.
9. Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
10. Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
11. N-terminal sequence analysis of the Dicamba Mono-Oxygenase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 (SCR-2016-0322) (社内報告書)
12. Bioinformatics Evaluation of the DMO and PAT Proteins in MON 87419 Utilizing the AD\_2014, TOX\_2014 and PRT\_2014 Databases (MSL0025907)



(社内報告書)

13. OECD. 2002b. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
14. Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
15. Joung, Y.H. and K. Kamo. 2006. Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus*. *Plant Cell Rep* 25: 1081-1088.
16. 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.
17. Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
18. Lamma, 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.
19. 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.
20. Amended Report for MSL0025770: Bioinformatics Evaluation of MON 87419 Utilizing the AD\_2014, TOX\_2014 and PRT\_2014 Databases (MSL0026123) (社内報告書)
21. Amended Report for MSL0025438: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Corn MON 87419 (MSL0025902) (社内報告書)
22. Bioinformatics Evaluation of MON 87419 Utilizing the EST\_2014, NT\_2014, and NR\_2014 Databases (MSL0025771) (社内報告書)
23. An Expanded Bioinformatic Evaluation of the DNA Sequence Flanking the Insertion Site in MON 87419 (RAR-2015-0467) (社内報告書)
24. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87419: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0025920) (社内報告書)
25. Assessment of DMO and PAT Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from Maize MON 87419 Produced in United States Field Trials During 2013 (MSL0025758) (社内報告書)
26. 厚生労働省 2013 平成 25 年国民健康・栄養調査 厚生労働省
27. Amended Report for MSL0025999: Characterization of the Dicamba Mono-Oxygenase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-

- Produced and *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced Dicamba Mono-Oxygenase Proteins (MSL0026361) (社内報告書)
28. Characterization of the Phosphinothricin N-Acetyltransferase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli* (*E. Coli*)-Produced Phosphinothricin N-Acetyltransferase Proteins (MSL0026031) (社内報告書)
  29. Amended Report for MSL0025997: Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia coli*-Produced MON 87419 DMO Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0026364) (社内報告書)
  30. Amended Report for MSL0025998: Assessment of the *in vitro* Digestibility of Phosphinothricin N-Acetyltransferase (*pat*) Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0026362) (社内報告書)
  31. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-Produced MON 87419 Dicamba Mono-Oxygenase Protein (MSL0026534) (社内報告書)
  32. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-Produced Phosphinothricin N-Acetyltransferase Protein (MSL0026533) (社内報告書)
  33. Amended Report for MSL0025597: Demonstration of the Presence of DMO and PAT Proteins in Maize Seed Samples across Multiple Generations of MON 87419 (MSL0026348) (社内報告書)
  34. Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Herbicide Tolerant Corn MON 87419 Across Three Generations (MSL0025519) (社内報告書)
  35. D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
  36. Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
  37. Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.
  38. Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.
  39. Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from Dicamba and Glufosinate Treated MON 87419 Grown in the United States during 2013 (MSL0025559) (社内報告書)
  40. ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life

Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/>  
[Accessed May 9, 2014].