

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシ
ネート耐性トウモロコシ (DP23211)
(食品)

令和4年(2022年)12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	7
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	9
7. 近縁の植物種に関する事項	9
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	10
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	10
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	13
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	14
5. 構築された発現ベクターに関する事項	14
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	16
第 6. 組換え体に関する事項	16

1. 遺伝子導入に関する事項	16
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	18
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	19
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	19
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	21
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.....	21
7. 宿主との差異に関する事項	22
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項	23
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	24
<参照>	25

<審議の経緯>

- 2021年2月9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0209第16号）、関係書類の接受
- 2021年2月16日 第805回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年3月24日 第209回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年7月28日 第226回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年10月24日 第229回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年12月6日 第881回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- | | |
|--------------|------------------|
| 2021年6月30日まで | 2021年7月1日から |
| 佐藤 洋（委員長） | 山本 茂貴（委員長） |
| 山本 茂貴（委員長代理） | 浅野 哲（委員長代理 第一順位） |
| 川西 徹 | 川西 徹（委員長代理 第二順位） |
| 吉田 緑 | 脇 昌子（委員長代理 第三順位） |
| 香西 みどり | 香西 みどり |
| 堀口 逸子 | 松永 和紀 |
| 吉田 充 | 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>

- | | |
|--------------|--------------|
| 2021年9月30日まで | 2022年3月31日まで |
| 中島 春紫（座長） | 中島 春紫（座長） |
| 児玉 浩明（座長代理） | 山川 隆（座長代理） |
| 安達 玲子 近藤 一成 | 安達 玲子 小野 竜一 |
| 飯島 陽子 手島 玲子 | 岡田 由美子 近藤 一成 |
| 岡田 由美子 樋口 恭子 | 小関 良宏 樋口 恭子 |
| 小関 良宏 山川 隆 | 小野 道之 藤原 すみれ |
| 小野 竜一 吉川 信幸 | |
| 橋田和美 | |

- 2022年4月1日から
- 中島 春紫（座長）
- 山川 隆（座長代理）
- 安達 玲子 近藤 一成
- 岡田 由美子 佐々木 伸大
- 小野 道之 樋口 恭子
- 小野 竜一 藤原 すみれ

<第 226 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 229 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）

要 約

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)」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 PHR03 系統を宿主とし、*Diabrotica virgifera virgifera* に由来する *DvSSJ1* 遺伝子断片、*Pseudomonas chlororaphis* に由来する *ipd072Aa* 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、*DvSSJ1*dsRNA 及び IPD072Aa タンパク質を発現することでコウチュウ目害虫抵抗性が、PAT タンパク質を発現することで除草剤グルホシネート耐性が付与される。

「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、「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)」については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

(申請内容)

名 称：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP23211)

性 質：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性

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)

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)」(以下「トウモロコシ DP23211」という。)は、*Diabrotica virgifera virgifera* に由来する *DvSSJ1* 遺伝子断片、*Pseudomonas chlororaphis* に由来する *ipd072Aa* 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、*DvSSJ1*dsRNA 及び IPD072Aa タンパク質を発現することでコウチュウ目害虫抵抗性が、PAT タンパク質を発現することで除草剤グルホシネ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 PHR03 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

DvSSJ1 遺伝子断片、*ipd072Aa* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の供与体は、それぞれ *D. virgifera virgifera*、*P. chlororaphis* 及び *S. viridochromogene* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

DvSSJ1 遺伝子断片は、*D. virgifera virgifera* (ウェスタンコーンルートワーム、以下「WCR」という。)の *DvSSJ1* 遺伝子の部分配列を逆向きに反復して構築されており、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する *DvSSJ1*dsRNA を発現する。WCR がトウモロコシ DP23211 を摂取すると RNAi が誘導されて *DvSSJ1* タンパク質の発現が抑制される結果、WCR の中腸上皮細胞の機能が損なわれ死に至る。*ipd072Aa* 遺伝子は、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する IPD072Aa 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。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いた T-DNA の挿入後、リコンビナーゼによる部位特異的組換え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、3）。

(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、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 DP23211 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 DP23211 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 DP23211 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 DP23211 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 DP23211 は、*DvSSJ1* 遺伝子断片、*ipd072Aa* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入して作出されており、*DvSSJ1dsRNA*、*IPD072Aa* タンパク質及び PAT 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 DP23211 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 DP23211 は、コウチュウ目害虫に殺虫活性を有し、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できる。

なお、2種の異なる作用機作によるコウチュウ目害虫抵抗性機構の組合せであることから、一方の作用に対する抵抗性を獲得した害虫に対しても殺虫効果を有する。

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.) *Illis*) のデント種 PHR03 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 5）。

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、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 及び還元可溶性の 50 kDa タンパク質が食物アレルギーとして報告されている（参照 6、7、8、9、10）。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 5）。

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 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4)、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 DP23211 の作出に使用した導入用プラスミド PHP74643 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* (*Agrobacterium tumefaciens*)) 等由来のプラスミド pSB1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 PHP74643 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11)。

(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 PHP74643 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 PHP74643 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 PHP74643 の外骨格領域にはスペクチノマイシン及びテトラサイクリンに対して耐性を付与する *spc* 遺伝子及び *tetA* 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 PHP74643 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

DvSSJ1 遺伝子断片、*ipd072Aa* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の供与体は、それぞれ *D. virgifera virgifera*、*P. chlororaphis* 及び *S. viridochromogene* である。

(2) 安全性に関する事項

D. virgifera virgifera は、コウチュウ目ハムシ科に属する昆虫であり（参照 12）、ヒトに対する病原性は報告されていない。

P. chlororaphis は、米国及び欧州で生物農薬として使用されており、植物、家畜及びヒトへの病原性は認められていない（参照 13）。

S. viridochromogenes 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（参照 14）。

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

DvSSJ1 遺伝子断片は、*D. virgifera virgifera* 由来の Smooth Septate Junction 1 遺伝子の部分配列を PCR 法にてクローニングし、コネクター配列を介して逆位に反復するよう合成した。

ipd072Aa 遺伝子は、*P. chlororaphis* の cDNA ライブラリーより単離した。

pat 遺伝子は、*S. viridochromogenes* の野生型 *pat* 遺伝子配列を基に合成した。

選抜マーカーとして用いた *pmi* 遺伝子は *Escherichia coli* 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI タンパク質) をコードし、PCR 法にてクローニングした。

(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 *DvSSJ1* 遺伝子断片

WCR 防除のため RNAi 機構を介した標的遺伝子を探索することを目的として、WCR 由来の dsRNA を用いたスクリーニングを行った結果、*DvSSJ1* 遺伝子が選定された（参照 12）。*DvSSJ1* 遺伝子がコードする *DvSSJ1* タンパク質は、ショウジョウバエの SSJ^a 形成に必須のタンパク質 SSK (SNAKESKIN) のオルソログと考えられ、*DvSSJ1* タンパク質も WCR 中腸上皮の SSJ 形成に

^a Smooth Septate Junction：上皮細胞の形態及び細胞間隙

関与していると示唆されている（参照 12）。WCR がトウモロコシ DP23211 を摂取し、*DvSSJ1dsRNA* が中腸上皮細胞に取り込まれると RNAi 機構を介して *DvSSJ1* タンパク質の発現が抑制される。その結果、WCR において、SSJ 形成が阻害され中腸上皮細胞の機能が損なわれることにより殺虫活性を示すと考えられている（参照 12、15）。

② *ipd072Aa* 遺伝子

WCR に殺虫効果を示す新たなタンパク質を同定するため、土壌細菌を用いてスクリーニングした結果、IPD072Aa タンパク質が単離精製された（参照 16）。IPD072Aa タンパク質を摂取した WCR では、中腸上皮細胞が破壊されることが確認され、IPD072Aa タンパク質は中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合して作用すると考えられた。

トウモロコシ DP23211 は、Bt タンパク質（Cry34Ab1/Cry35Ab1 タンパク質及び Cry3Bb1 タンパク質）に対する抵抗性を有する WCR に対しても殺虫活性を示した（参照 16）。また、中腸上皮刷子縁膜小胞を用いた結合試験の結果、IPD072Aa タンパク質はこれらの Bt タンパク質と競合しないことが示された（参照 17）。したがって、IPD072Aa タンパク質とこれらの Bt タンパク質は WCR の中腸の異なる受容体に結合することが示唆された。

IPD072Aa タンパク質と既知毒性タンパク質の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^bを用いて、 $E\text{-value} < 1 \times 10^{-4}$ を指標として検索を行った結果、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（参照 18）。

③ *pat* 遺伝子

pat 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分である L-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。その結果、トウモロコシ DP23211 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 14）。

PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース^cを用いて $E\text{-value} < 1 \times 10^{-4}$ を指標として検索を行なった結果、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（参照 19）。

④ *pmi* 遺伝子

pmi 遺伝子は PMI タンパク質をコードし、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に変換する酵素である。トウモロコシはマンノースを炭素源として利用できないが、PMI タンパク質の産生により炭素源としてマ

^b 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。2019 年 1 月更新。保持配列数 7,510。

ンノースを含む培地において生長することが可能になるため、組換え植物の選抜マーカーとして用いた（参照 20）。

PMI タンパク質と既知毒性タンパク質の相同性の有無を確認するために、タンパクデータベース^cを用いて E -value $< 1 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った結果、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（参照 21）。

⑤ *DvSSJ1*dsRNA 及び IPD072Aa タンパク質の殺虫活性スペクトラム

*DvSSJ1*dsRNA 及び IPD072Aa タンパク質は、同様に WCR の中腸上皮細胞を標的として効果を示すが、それぞれの作用点が異なるため、直接相互作用することはないと考えられた。

in vitro で合成した *DvSSJ1*dsRNA の混餌投与試験の結果、WCR 及びその近縁種 (*Diabrotica undecimpunctata*) に対して殺虫活性が認められたが、そのほかの昆虫に対して殺虫活性は認められなかった。また、*in silico* 解析においても各昆虫の *Ssk* 遺伝子オルソログと *DvSSJ1* 遺伝子断片の塩基配列を比較したところ、WCR 及び *D. undecimpunctata* においてのみ連続する 21 塩基の一致が認められた。これらの結果は矛盾しなかった（参照 22）。

Ssk 遺伝子のオルソログは脊椎動物や植物には認められていない（参照 12）。*DvSSJ1* 遺伝子断片と 21 塩基で一致する配列はヒトの転写産物^d中に認められなかったことから、*DvSSJ1*dsRNA がヒトの遺伝子を標的とする可能性は低いと考えられた（参照 23）。dsRNA は植物及び動物に由来する全ての食品中に含まれており、ヒトに経口摂取された RNA はヌクレアーゼによって分解される。

大腸菌を用いて合成した IPD072Aa タンパク質の混餌投与試験の結果、WCR に対して殺虫活性が認められたが、そのほかのコウチュウ目及びチョウ目昆虫には認められなかった（参照 24）。

⑥ IPD072Aa タンパク質のヒトへの影響

ヒト腸管上皮細胞株である T84 及び Caco-2 を用いて、IPD072Aa タンパク質ばく露による細胞のバリア機能及び生存率への影響を分析した。5 µg/ml、50 µg/ml 及び 500 µg/ml の IPD072Aa タンパク質溶液に両細胞を 48 時間ばく露した結果、T84 については、50 µg/ml 及び 500 µg/ml の IPD072Aa タンパク質へのばく露によりバリア機能及び生存率への影響が認められたが、5 µg/ml の IPD072Aa タンパク質へのばく露による影響は認められなかった。Caco-2 については、500 µg/ml の IPD072Aa タンパク質へのばく露による FITC-イヌリンの透過性の増加が認められたことを除き、5 µg/ml、50 µg/ml 及び 500 µg/ml の IPD072Aa タンパク質へのばく露によるバリア機能及び生存率への影響は認められなかった（参照 25）。

IPD072Aa タンパク質の一日平均摂取量は、日本人一人が一日に摂取する「と

^c NCBI タンパク質データベース 及び Entrez® に登録されている既知毒性タンパク質データベース

^d NCBI GRCh38 データセット (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>)

うもろこし・加工品」^e。(参照 26) の原料を全て DP23211 に置き換えて推定摂取量を計算すると、2.1 μg となる (第 6 の 3 参照)。また、IPD072Aa タンパク質は胃液及び腸液により速やかに消化されると考えられる (第 6 の 4 の (3) 参照)。これらのことから、食品の摂取を通じて、ヒトの腸管上皮が未消化の IPD072Aa タンパク質に、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超える濃度で長時間連続して曝される可能性は極めて低いと考えられる。^f

更に、申請者から参考として提出された哺乳類を用いた反復経口投与毒性試験等においても、IPD072Aa タンパク質又は DP23211 の殻粒の摂取による影響は認められなかった (参照 27、28、29)。

(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 PHP74643 の外骨格領域にはテトラサイクリン耐性 (*tetA*) 遺伝子及び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 DP23211 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

DvSSJ1dsRNA 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。

ipd072Aa 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Banana Streak Virus Acuminata Yunnan 株由来の BSV(AI) 遺伝子のプロモーター配列である。

pat 遺伝子発現カセットのプロモーターは、イネ (*O. sativa*) 由来の *os-actin* 遺伝子のプロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

DvSSJ1dsRNA 発現カセットのターミネーターは、*Z. mays* 由来の Z27G 遺伝子のターミネーター配列である。

ipd072Aa 遺伝子発現カセットのターミネーターは、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の *at-T9* 遺伝子のターミネーター配列である。

pat 遺伝子発現カセットのターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S 遺伝子のターミネーター配列である。

^e 平成 29 年国民健康・栄養調査報告 (厚生労働省 平成 30 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

^f 空腹時の人の胃液は最低で 20ml 程度とされていることから、人の胃液中の IPD072Aa タンパク質の最大濃度は 0.105 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と推定される。ただし、1 日あたりの胃液の分泌量は約 1000~2000ml (南山堂医学大辞典第 20 版 90)、腸液の分泌量は約 2,400ml (南山堂医学大辞典第 20 版 1618) とされ、実際には更に低濃度になるものと考えられる。なお、胃の切除を行った人は、一度に摂取する食物の量を減らすよう指導される事から、健康成人に比べ IPD072Aa タンパク質の摂取量はより少ないと推定される。

(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。

DvSSJ1dsRNA 発現カセットには、*Z. mays* 由来の *ubiZM1* 5'UTR 及び *ubiZM1* イントロンを、*ipd072Aa* 遺伝子発現カセットには、*Z. mays* 由来の *zm-HPLV9* イントロンを、*pat* 遺伝子発現カセットには、*O. sativa* 由来の *os-actin* イントロンを含む。

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 PHP74643 は、プラスミド pSB1 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 PHP74643 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 11）。

(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 PHP74643 の意図する挿入領域は、T-DNA 領域のうち FRT1 から FRT87 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 PHP74643 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 DP23211 への挿入遺伝子発現カセット

構成 DNA	由来及び機能
(pmi 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>) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター配列
<i>ubiZM1</i> 5'UTR <i>ubiZM1</i> インترون	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、目的遺伝子の発現を活性化
<i>pmi</i>	大腸菌 (<i>E. coli</i>) 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ(PMIタンパク質)をコード
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビター II 遺伝子 (<i>pinII</i>) のターミネーター領域
(pat 遺伝子発現カセット)	
<i>os-actin</i> プロモーター	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のプロモーター領域
<i>os-actin</i> インترون	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のイントロン領域
<i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PATタンパク質) をコード
CaMV 35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S ターミネーター領域
(DvSSJ1dsRNA 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>) 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター配列
<i>ubiZM1</i> 5'UTR <i>ubiZM1</i> インترون	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。目的遺伝子の発現を活性化
<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片	ウェスタンコーンルートワーム (<i>D. virgifera virgifera</i>) 由来の Smooth Septate Junction 1 遺伝子の部分配列。本発現カセットにおいて、逆位に反復した 2 つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片がループ配列によって接続され、1 分子の mRNA として転写
<i>zm-Adh1</i> インترون ループ配列	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のアルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 領域 (Dennis <i>et al.</i> , 1984) の部分配列。2 つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片を接続するループ配列
<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片 (相補鎖)	<i>D. virgifera virgifera</i> 由来の <i>DvSSJ1</i> 遺伝子の部分配列の相補鎖
Z27G ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) W64 系統由来のガンマゼイン遺伝子のターミネーター領域
(ipd072Aa 遺伝子発現カセット)	

BSV (AY) プロモーター	Banana streak virus 由来のプロモーター領域
<i>zm</i> -HPLV9 インترون	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の推定カルモジュリン 5 遺伝子のイントロン領域
<i>ipd072Aa</i>	<i>P. chlororaphis</i> 由来の IPD072Aa タンパク質をコード
<i>at</i> -T9 ターミネーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のマンノース結合タンパク質スーパーファミリーに属する推定タンパク質遺伝子のターミネーター領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

(1) *zm*-SEQ9/*zm*-SEQ 8 系統の作出

非組換えトウモロコシ PHR03 系統に、プラスミド PHP56614 をパーティクルガン法により導入した。プラスミド PHP56614 から一過的にエンドヌクレアーゼが発現し、宿主ゲノムの内在性 *zm*-SEQ9 及び *zm*-SEQ8 配列間で特異的に二重鎖を切断する。プラスミド PHP56614 はリコンビナーゼの標的配列 (FRT1 及び FRT87) を含む挿入標的配列 (Landing Pad sequence; 以下「LP 配列」という。)、並びに LP 配列の両端に *zm*-SEQ9 及び *zm*-SEQ8 配列を有している。同一配列である宿主ゲノムの *zm*-SEQ9 及び *zm*-SEQ8 配列で相同組換えが生じ LP 配列がゲノム DNA に挿入される。その結果、1 コピーの LP 配列がゲノム DNA に挿入された植物を選抜し *zm*-SEQ9/*zm*-SEQ 8 系統とした (参照 30)。

(2) トウモロコシ DP23211 の作出

zm-SEQ9/*zm*-SEQ 8 系統の未熟胚に、アグロバクテリウム法により導入用プラスミド PH74643 を導入した。マンノースを添加した培地で胚を生育させ、導入用プラスミド PH74643 の T-DNA 領域内のリコンビナーゼ遺伝子が発現して、T-DNA 領域中の FRT1 及び FRT87 と *zm*-SEQ9/*zm*-SEQ8 系統の LP 配列中の FRT1 及び FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され、T-DNA 領域のうち挿入 DNA 領域のみが *zm*-SEQ9/*zm*-SEQ 8 系統に導入された個体を選抜した (参照 30)。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 DP23211 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 DP23211 のゲノムに挿入された挿入 DNA のコピー数及び外骨格領域の有無を確認するために、Southern by Sequence (SbS^g) 分析を行った。その結果、平均カバレッジ深度は 181 から 186 までであったことから、信頼性に問題はなかった。LP 配列の 5' 末端及び 3' 末端とトウモロコシ DP23211 ゲノムとの接合領域がそれぞれ 1 箇所特定され、また、挿入 DNA 領域の 5' 末端及び 3' 末端はそれぞれ LP 配列と接合しており部位特異的組換えによって挿入 DNA 領域が LP 配列中の意図した位置に挿入されたことが確認された(参照 31)。したがって、トウモロコシ DP23211 ゲノム中に挿入 DNA 領域が 1 コピー導入されていることが確認された。導入用プラスミド PHP74643 の外骨格領域及び *zm-SEQ9/zm-SEQ8* 系統系作出時に用いたプラスミドに由来する DNA 断片の混入のないことを SbS 分析にて確認した(参照 31)。さらに、トウモロコシ DP23211 の挿入 DNA 領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの挿入 DNA 領域と比較した結果、両者は同一であることが確認された(参照 30)。

次に、トウモロコシ DP23211 の挿入 DNA の近傍配列がトウモロコシ由来であるかどうかを確認するために、トウモロコシ DP23211 の LP 配列挿入 5' 末端近傍配列 (1,488 bp) 及び 3' 末端近傍配列 (2,201bp) の塩基配列を決定し、これをトウモロコシゲノム配列データベース^hと照合した。その結果、トウモロコシ DP23211 の挿入 DNA の近傍配列がトウモロコシ由来であることが確認された(参照 32)。

また、トウモロコシ DP23211 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ⁱ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(参照 32)。

^g 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：カバレッジ値が 35 以下の場合は、バックグラウンドと判断される。

^h Maize (B73) Public Genome Assembly, version 4, 2016 年 3 月公表。

ⁱ NCBI (核酸データベース ver2019、EST データセット ver2018、非重複タンパク質データセット ver2019)

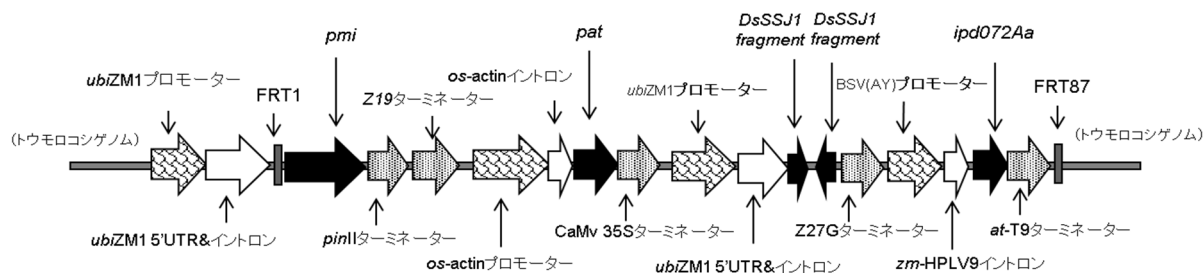


図1 トウモロコシ DP23211 に挿入された DNA (模式図)

(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 DP23211 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 30 アミノ酸以上の ORF が 289 個見いだされた (参照 33)。

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を用いて $E\text{-value}=1\times 10^{-4}$ を指標として blastp 検索を行った。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^jを用いて、 $E\text{-score}=1\times 10^{-4}$ を指標として連続する 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アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索した。その結果、既知アレルゲンと連続する 8 アミノ酸以上の一致を有する ORF が 1 個見出された。この ORF は *pat* 遺伝子発現カセット中の *os-actin* プロモーター及び *os-actin* イントロンの接続領域の相補鎖に位置し、8 個及び 12 個のグリシンが連続する 2 ヶ所の配列が既知のアレルゲンであるトウモロコシ由来エンドキチナーゼ A のアミノ酸配列と一致していた。当該 ORF の上流にはプロモーターがなく、開始コドンも含まれていないことから翻訳される可能性は低いと考えられた (参照 33)。

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 DP23211 の根、葉、花粉、地上部及び子実について、*DvSSJ1* dsRNA の産生量を、特異的プローブを用いて *DvSSJ1* 遺伝子断片により転写される 210 bp の RNA 配列を定量する方法にて分析した。また、IPD072Aa タンパク質及び PAT 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 34、35)。

^j Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) ver 2019

表2 トウモロコシ DP23211 における *DvSSJ1*dsRNA の産生量、
並びに IPD072Aa タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

分析組織*	<i>DvSSJ1</i> dsRNA (ng/g 乾物重)	IPD072Aa タンパク質 (ng/mg 乾物重)	PAT タンパク質 (ng/mg 乾物重)	PMI タンパク質 (ng/mg 乾物重)
根	11.5～51.3	19～31	0.65～7.7	2.6～12
葉	13.2～64.6	1.6～16	<0.11～7.8	0.3～29
花粉	0.987	0.65	58	33
地上部	10.8～21.9	7.9～16	1.1～9.2	3.6～9.4
子実	4.13	2.1	5.1	4.3

* 根は、6 葉期～完熟期、葉は 9 葉期～完熟期、花粉は絹糸抽出期、地上部は絹糸抽出期～完熟期、子実は完熟期の値を示した。

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 DP23211 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 1.0 g^e（参照 26）を全てトウモロコシ DP23211 に置き換えて IPD072Aa タンパク質、PAT タンパク質及び PMI タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ 2.1、5.1 及び 4.3 µg となり、一人一日当たりのタンパク質の摂取量 69.4 g（参照 26）に占める割合はそれぞれ 3.0×10^{-8} 、 7.3×10^{-8} 及び 6.2×10^{-8} 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

DvSSJ1 遺伝子断片の供与体である *D. virgifera* のアレルギー誘発性は知られていない。

ipd072Aa 遺伝子の供与体である *P. chlororaphis* のアレルギー誘発性は知られていない。*pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* のアレルギー誘発性は知られていない。*pmi* 遺伝子の供与体である *E.coli* 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

IPD072Aa タンパク質、PAT タンパク質及び PMI 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。

^e 平成 29 年国民健康・栄養調査報告（厚生労働省 平成 30 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

(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 IPD072Aa タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

IPD072Aa 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、両試験において、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 36）。

b. 人工腸液に対する感受性

IPD072Aa 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、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両試験において、試験開始後 20 分以内に消化されることが確認された（参照 37）。

c. 加熱処理に対する感受性

IPD072Aa 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、121℃・30 分間の加熱処理により免疫反応性は非加熱対照の 5%に低下した（参照 38）。

② PAT タンパク質

既に安全性審査の手続きを経たトウモロコシ DP-004114-3 等に導入された遺伝子がコードするタンパク質と同一であることから、PAT タンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられる。

③ PMI タンパク質

既に安全性審査の手続きを経たトウモロコシ Event5307 系統等に導入された遺伝子がコードするタンパク質と同一であることから^k、アレルギー誘発性はトウモロコシ Event5307 系統等と同等と考えられる。

(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

IPD072Aa 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、アレルゲンデータベース^lを用いて相同性検索を行った。その結果、*E*-value が 1×10^{-4} を指標に連続する 80 アミノ酸以上の配

^k 申請者は、トウモロコシ DP23211 中で産生される PMI タンパク質については、意図しないアミノ酸配列の変化等は生じていないことを実験的に確認しており、遺伝子配列は Event5307 系統等と同一であるとしている。

^l COMPARE ver2019

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出されなかった。また、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出されなかった。(参照 39、40)。

PMI タンパク質については、*Rana species* CH2001 (カエルの一種) 由来の α -パルブアルブミン(参照 41) との間に 8 アミノ酸の一致が認められたため、以下(5)の試験が行われ、Event5307 系統等において既に評価されている^k。

(5) 遺伝子産物(タンパク質)の IgE 結合能の検討

PMI タンパク質と α -パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE との結合試験が行われた結果、両者の間に交差反応が生じないことが確認された(参照 42)。

上記(1)～(5)及び前項3から総合的に判断し、IPD072Aa タンパク質、PAT タンパク質及び PMI 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 DP23211 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 43)。

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

DvSSJ1dsRNA は *Ssk* 遺伝子のオルソログである *DvSSJ1* 遺伝子に対して RNAi を誘導する。*Ssk* 遺伝子は節足動物の細胞接着に関与し、そのオルソログはトウモロコシには存在しない(参照 12)。トウモロコシのゲノム配列を解析した結果、*DvSSJ1dsRNA* に含まれる全ての 21 塩基配列と完全に一致する配列は認められなかった(参照 44)ことから、*DvSSJ1dsRNA* が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

IPD072Aa タンパク質の属するタンパク質ファミリーを構成するタンパク質はいずれも微生物に由来しており(参照 16)、トウモロコシ由来のタンパク質とは類似していないと考えられる。また、IPD072Aa タンパク質に、酵素タンパク質で認められる既知のモチーフ等との相同性は認められなかった(参照 16)ことから、IPD072Aa タンパク質が酵素活性を有する可能性は低く、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いと考えられた。

PAT タンパク質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化する反応を触媒する酵素である。高い基質特異性を有し、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない(参照 14)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た。

PMI タンパク質はマンノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸との異性化を触媒する酵素である。高い基質特異性を有しており、他の天然基質は知られ

ていない（参照 45）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た。

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 DP23211 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 46）。トウモロコシ DP23211 には除草剤グルホシネ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、総脂質、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ステアリン酸、アラキジン酸及びエイコセン酸に統計学的有意差が認められたが、いずれにおいても個々の測定値は商業品種変動^m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でチロシン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範囲内であった。

（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マグネシウム及びリンに統計学的有意差が認められたが、いずれにおいても個々の測定値は商業品種変動範囲内であった。

（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 B₆に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は文献値の範囲内であった。

^m 商業品種 144 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。

(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、*p*-クマル酸、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。フルフラールについては定量限界以下であった。

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) に対して食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁 (CFIA) に対して飼料・環境としての安全性審査の申請が行われ、2021 年 9 月に承認された。

オーストラリア・ニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2021 年 4 月に承認された。

その他、3 か国・地域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 DP23211 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 DP23211 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ (デント種) と同じである。

第 7. 第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までにより、安全性の知見が得られている。

(参考)

マウスを用いた急性経口毒性試験 (2,000 mg/kg の IPD072Aa タンパク質を強制経口投与)、マウスを用いた飼料混入投与 (100、300、1,000 mg/kg/日の IPD072Aa タンパク質を混餌投与) による 28 日間反復経口投与毒性試験及びラットを用いた 90 日間反復経口投与毒性試験 (飼料へのトウモロコシ DP23211 (穀粒) の配合率 50%又は 33%) を行った結果、いずれの試験においても IPD072Aa タンパク質に起因する異常は認められなかった。(参照 27、28、29)。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)」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. トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー. 農山漁村文化協会. 2005.
2. ILSI. International Life Sciences Institute Crop Composition Database (Version 7.0). 2019.
3. トウモロコシ子実中の構成成分文献値一覧. (社内文書)
4. OECD. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO (2003)11. 2003.
5. OECD. 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. 2002.
6. 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
7. Pastorello E A, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C et al.: The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 106: 744-51
8. 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
9. 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
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. Puumalainen T J, Poikonen S, Kotovuori A, Vaali K, Kalkkinen N, Reunala T et al.: Napins, 2S albumins, are major allergens in oilseed rape and turnip rape. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 426-32
12. Hu X, Richtman N M, Zhao J Z, Duncan K E, Niu X, Procyk L A et al.: Discovery of midgut genes for the RNA interference control of corn rootworm. *Sci Rep* 2016; 6: 30542
13. Anderson J A, Staley J, Challender M, and Heuton J: Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. *Transgenic Res* 2018; 27: 103-13
14. OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. 1999.

15. Hu X, Steimel J P, Kapka-Kitzman D M, Davis-Vogel C, Richtman N M, Mathis J P et al.: Molecular characterization of the insecticidal activity of double-stranded RNA targeting the smooth septate junction of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). PLoS One 2019; 14: e0210491
16. Schellenberger U, Oral J, Rosen B A, Wei J Z, Zhu G, Xie W et al.: A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. Science 2016; 354: 634-37
17. IPD072AA PROTEIN BINDING SITES. (社内文書)
18. Comparison of the IPD072Aa Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database. (社内文書)
19. Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database. (社内文書)
20. Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck A R, and Hansen G: The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Rep 2000; 19: 798-803
21. Phosphomannose Isomerase- Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. (社内文書)
22. DvSSJ1 LC₅₀ AND SPECTRUM ANALYSIS. (社内文書)
23. Comparison of the DvSSJ1 Fragment to the Human Transcriptome. (社内文書)
24. Boeckman C J, Huang E, Sturtz K, Walker C, Woods R, and Zhang J: Characterization of the Spectrum of Insecticidal Activity for IPD072Aa: A Protein Derived from *Pseudomonas chlororaphis* with Activity Against *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). J Econ Entomol 2019; 112: 1190-96
25. IPD072Aa Protein Hazard Assessment as Determined Using the In Vitro Human Intestinal Epithelial Cell Line Assay. (社内文書)
26. 厚生労働省. 平成 29 年国民健康・栄養調査報告. 2018; p. 58, 68.
27. Carlson A B, Mathesius C A, Ballou S, Boeckman C J, Gunderson T A, Mirsky H P et al.: Safety assessment of coleopteran active IPD072Aa protein from *Pseudomonas chlororaphis*. Food Chem Toxicol 2019; 129: 376-81
28. 28-Day Oral (Dietary) Toxicity Study of IPD072Aa in CD-1 Mice (社内文書)
29. Smith B L, Zimmermann C S, Carlson A B, Mathesius C A, Mukerji P, McNaughton J L et al.: Evaluation of the safety and nutritional equivalency of maize grain with genetically modified event DP-Ø23211-2. GM Crops Food 2021; 12: 396-408
30. Description of Transformation Method and Familiarity of PAT and PMI Proteins for Maize Event DP-Ø23211-2. (社内文書)
31. Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-Ø23211-2 Maize. (社内文書)
32. Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-Ø23211-2. (社内文書)
33. Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-Ø23211-2. (社内文書)

- 書)
34. DvSSJ1 double-stranded RNA Concentration of a Maize Line Containing Event DP-Ø23211-2: U.S. and Canada Test Sites. (社内文書)
 35. Expressed Trait Protein Concentrations of a Maize Line Containing Event DP-Ø23211-2: U.S. and Canada Test Sites. (社内文書)
 36. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of IPD072Aa Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis. (社内文書)
 37. Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of IPD072Aa Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis. (社内文書)
 38. Characterization of the Effect of Heat Treatment on IPD072Aa Protein Using Enzyme Linked Immunosorbent (ELISA) Analysis. (社内文書)
 39. Comparison of the Amino Acid Sequence of the IPD072Aa Protein to the Amino Acid Sequences of Known and Putative Protein Allergens. (社内文書)
 40. Comparison of the Amino Acid Sequence of the PAT Protein to the Amino Acid Sequence of Known and Putative Protein Allergens. (社内文書)
 41. Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, and Hentges F: Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: definition of alpha-parvalbumin as the allergen in cause. *Allergy* 2002; 57: 1053-8
 42. Phosphomannose Isomerase - Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergen. (社内文書)
 43. Characterization of DP-Ø23211-2 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis. (社内文書)
 44. Assessment of Putative Off-Target Genes with Significant Identity to Putative DvSSJ1 siRNA Sequences Derived from Maize Event DP-Ø23211-2. (社内文書)
 45. Freeze H H. Phosphomannose isomerase In Taniguchi N, Honke K, and Fukuda M (eds.), *Handbook of glycosyltransferases and related genes.* , 1 ed. Springer. 2002; p. 595-99
 46. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing the Event DP-Ø23211-2: U.S. and Canada Test Sites. (社内文書)