

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネー
ト耐性トウモロコシ (DP910521)
(食品)

令和5年(2023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
＜第 240 回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿＞	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	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	7
第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	7
第 3. 宿主に関する事項	7
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項 .	7
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	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.....	14
1. 遺伝子導入に関する事項.....	14
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	16
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	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.....	21
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.....	22
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	22
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	22
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	23
<参照>.....	24

＜審議の経緯＞

2023 年 8 月 22 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 0822 第 3 号）、関係書類の接受

2023 年 8 月 29 日 第 911 回食品安全委員会（要請事項説明）

2023 年 9 月 20 日 第 240 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2023 年 12 月 12 日 第 923 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

山本 茂貴（委員長）

浅野 哲（委員長代理 第一順位）

川西 徹（委員長代理 第二順位）

脇 昌子（委員長代理 第三順位）

香西 みどり

松永 和紀

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＞

2023 年 9 月 30 日まで

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子

岡田 由美子

小野 道之

小野 竜一

佐々木 伸大

近藤 一成

樋口 恭子

藤原 すみれ

2023 年 10 月 1 日から

児玉 浩明（座長）

佐々木 伸大（座長代理）

伊藤 政博

岡田 由美子

小野 道之

小野 竜一

柴田 識人

手島 玲子

樋口 恭子

藤原 すみれ

＜第 240 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

「チョ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 (DP910521)」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.) Itis) のデント種 PH184C 系統を宿主とし、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry1B.34* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子及び *Escherichia coli* に由来する *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、Cry1B.34 タンパク質を発現することでチョウ目害虫抵抗性が、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、PMI タンパク質を発現することで形質転換体の選抜マーカーが付与される。

Cry1B.34 タンパク質はキメラタンパク質であり、*Spodoptera frugiperda* (フォールアーミーワーム) を含む特定のチョウ目昆虫に摂食されると、殺虫活性のあるプロテアーゼ抵抗性コアタンパク質となる。コアタンパク質は昆虫の中腸上皮細胞膜上の受容体と結合して中腸組織を損傷させることにより殺虫活性を発揮する。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較の結果等について確認した。なかでもアレルギー誘発性評価の一環として実施した、Cry1B.34 タンパク質の物理化学的処理に対する感受性試験の結果、人工胃液処理、及び人工胃液処理後の人工腸液処理によって、このタンパク質が速やかに消化されることが示された。さらに加熱処理によってこのタンパク質の活性が低下することが示された。以上のことから、挿入遺伝子が発現するタンパク質がアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。これらの結果から、本系統には非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP910521)」については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

(申請内容)

名 称：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP910521)

性 質：チョ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)

「チョ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 (DP910521)」
(以下「トウモロコシ DP910521」という。)は、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry1B.34* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子及び *Escherichia coli* (K-12 株) に由来する *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、*Cry1B.34* タンパク質を発現することでチョウ目害虫抵抗性が、*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、*PMI* タンパク質を発現することで形質転換体の選抜マーカーが付与される。

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 PH184C 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

cry1B.34 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の供与体は、それぞれ *B. thuringiensis*、*S. viridochromogenes* 及び *E. coli* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cry1B.34 遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する *Cry1B.34* 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。

pmi 遺伝子は、形質転換体の選抜マーカーを付与する *PMI* タンパク質をコードする。

これらの遺伝子は、パーティクルガン法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

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

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

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

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

- （2）宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

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

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

- （1）収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシ DP910521 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 DP910521 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 DP910521 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 DP910521 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ DP910521 は、*cry1B.34* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI 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 DP910521 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 DP910521 は、特定のチョ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。

第 3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 PH184C 系統である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は、同じ *Zea* 属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている（参照 3）。栽培適性の異なる多くの品種が育成された結果、現在では世界的に広く栽培される作物となった（参照 1）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシにおいては、有害生理活性物質のうちヒトの健康に悪影響を与える毒性物質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 4）。

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 並びに 50 kDa の γ -ゼイン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 5、6、7、8）。しかしながら、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発性のある食品とは考えられていない（参照 4、9）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

トウモロコシは、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られている（参照 3）が、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは世界の主要穀物の1つで、古くから多くの食経験がある。トウモロコシは、食品分野においてコーン油、コーンスターチ等の原料として幅広く利用されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、テオシント及びトリプサクム属が知られているが(参照 3)、わが国において食用に供されることはない。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

トウモロコシ DP910521 の作出に使用した導入用プラスミド PHP79620 の外骨格領域(挿入 DNA 領域を除く部分)は、大腸菌 (*E. coli*) 等由来のプラスミド pUC19 を基に作製された。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド PHP79620 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照 10)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PHP79620 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 PHP79620 の外骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PHP79620 の外骨格領域にはアンピシリンに対して耐性を付与する *bla* 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 PHP79620 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

cry1B.34 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の供与体は、それぞれ *B. thuringiensis*、*S. viridochromogenes* 及び *E. coli* (K-12 株) である。

(2) 安全性に関する事項

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

S. 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 13)。

E. coli (K-12 株) は、哺乳類の腸に広く存在し、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

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

cry1B.34 遺伝子は、*cry1B* 遺伝子のドメイン I 及びドメイン II 領域、*cry1Ca1* 遺伝子のドメイン III 領域及び *cry9Db1* 遺伝子の C 末端コード領域から構成される。植物での発現を最適化するために塩基配列を改変されている。

pat 遺伝子は、*S. viridochromogenes* 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) をコードする遺伝子である。

pmi 遺伝子は、*E. coli* 由来のマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI タンパク質) をコードする遺伝子である。

(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

① 遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能

a. *cry1B.34* 遺伝子

cry1B.34 遺伝子は *Cry1B.34* タンパク質をコードする。*Cry1B.34* タンパク質は土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* 由来の *Cry* タンパク質のドメインから構成されるキメラタンパク質であり、*Cry1B* タンパク質由来のドメイン I 及びドメイン II と *Spodoptera frugiperdia* (フォールアーミーワーム) に対して高い殺虫活性を有する *Cry1Ca1* タンパク質由来のドメイン III が組み合わされている。

Cry1B.34 タンパク質は、フォールアーミーワームを含む特定のチョウ目昆虫に摂食されると、殺虫活性のあるプロテアーゼ抵抗性コアタンパク質となる。コアタンパク質は昆虫の中腸上皮細胞膜上の受容体と結合して中腸組織を損傷させることにより殺虫活性を発揮する。

b. *pat* 遺伝子

pat 遺伝子は PAT タンパク質をコードする。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、N-アセチル-L-グルホシネートに変えて無毒化する（参照 13）。このため、トウモロコシ DP910521 は除草剤グルホシネートの存在下でも生育することができる。

c. *pmi* 遺伝子

pmi 遺伝子は PMI タンパク質をコードする。PMI タンパク質は、マンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換する。PMI タンパク質を産生する植物は、炭素源としてマンノースを含む培地において生長することが可能なため、組換え植物の選抜マーカーとして用いられる（参照 15）。

② 発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性

Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI タンパク質と既知毒性タンパク質の相同性を検討するため、毒性タンパク質データベース^aを用いて、blastp (version 2.11.0+) によるアミノ酸配列検索が行われた。*E*-value の閾値は 10 に設定された（参照 16）。

その結果、いずれのタンパク質についても既知毒性タンパク質との間に相同性は認められなかった。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PHP79620 の外骨格領域にはアンピシリン耐性 (*bla*) 遺伝子が含まれているが、外骨格領域は DP910521 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

cry1B.34 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ラミウム奇形葉関連ウイルス由来の LLDV 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* プロモーター配列である。*pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *ubiZM1*

^a UniprotKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されている既知毒性タンパク質のみで構成されたデータベース (2021 年 1 月更新) (検索日 2021 年 11 月)。

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

cry1B.34 遺伝子発現カセットのターミネーターは、イネ (*O. sativa*) 由来の *os-ubi* 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* ターミネーター配列である。*pmi* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ジャガイモ (*S. tuberosum*) 由来の *pinII* ターミネーター配列である。

(3) その他

目的遺伝子の発現を高めるため、以下の配列を含む。

cry1B.34 遺伝子発現カセットには、ミラビリスマザイクウイルス由来の *MMV* エンハンサー、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *zm-i6* インtron及び *zm-extensin* 5' UTR を含む。*pat* 遺伝子発現カセットには、イネ (*O. sativa*) 由来の *os-actin* インtronを含む。*pmi* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *ubiZM1* 5'UTR 及び *ubiZM1* インtron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 PHP79620 は、プラスミド pUC19 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 PHP79620 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 10)。

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

第6-1-(2)に記載のとおりである。

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

意図する挿入領域は、導入用プラスミド PHP79620 のうち *FRT1* から *FRT87* までの挿入 DNA 領域である。

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

導入用プラスミド PHP79620 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 導入用プラスミド PHP79620 の挿入 DNA 領域の構成要素（一部その他省略）

構成 DNA	由来及び機能
(その他)	
FRT1	出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) 由来の FLP タンパク質標的部位 (参照 17)。
(pmi 遺伝子発現カセット)	
<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) をコードする遺伝子 (参照 15)。コーディング領域の 5'側に 4 塩基、3'側に 36 塩基の非翻訳領域を含む。
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>Solanum 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 (参照 18)。転写を停止する。
(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。植物体内での構成的発現を誘導する。
<i>os-actin</i> イントロン	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) をコードする遺伝子 (参照 19)。
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 (参照 20、参照 21)。転写を停止する。
(cry1B.34 遺伝子発現カセット)	
MMV エンハンザー	ミラビリスマザイクウイルス由来のエンハンサー領域 (参照 22)
LLDAV プロモーター	ラミウム奇形葉関連ウイルス由来のプロモーター配列 (参照 23)。植物体内での構成的発現を誘導する。
<i>zm-i6</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の翻訳開始因子 6 遺伝子のイントロン領域 (参照 24)。
<i>zm-extensin</i> 5' UTR	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来のエクステンシン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR)
<i>cry1B.34</i>	Cry1B.34 タンパク質をコードする遺伝子。 <i>B. thuringiensis</i> の <i>cry1B</i> 遺伝子及び <i>cry1Ca1</i> 遺伝子に由来するコアタンパク質コード領域と <i>cry9Db1</i> 遺伝子に由来する C 末端側コード領域からなる (参照 25、参照 26)
<i>os-ubi</i> ターミネーター	イネ (<i>O. sativa</i>) 由来のユビキチン遺伝子のターミネーター領域 (参照 27)。転写を停止する。
(その他)	
FRT87	出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>) 由来の FLP タンパク質標的部位 (参照 28)。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

DP910521 の作出においては、2 回の形質転換を経て導入用プラスミド PH79620 の挿入 DNA 領域を、部位特異的組換えにより非組換えトウモロコシ PH184C 系統のゲノム DNA に挿入した。1 回目の形質転換では、宿主である非組換えトウモロコシ PH184C 系統の細胞にパーティクルガン法により 4 つのプラスミドを導入し、FRT1 及び FRT87 を含む挿入標的配列 (Landing Pad sequence : 以下「LP 配列」という。) を、ゲノム DNA の内在性 *zm*-SEQ138 及び *zm*-SEQ139 に部位特異的組換えにより導入した。2 回目の形質転換では、この *zm*-SEQ138/139 系統の細胞に挿入遺伝子発現カセットを含むプラスミド PHP79620 を含む 4 つのプラスミドをパーティクルガン法により導入した。その結果、PHP79620 中の FRT1 及び FRT87 と、既にゲノムに挿入されている 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、PHP79620 のうち挿入 DNA 領域だけがゲノム DNA 上の LP 配列中に挿入された。

さらに、炭素源としてマンノースを添加した培地で胚を生育させることにより選抜を行い、得られたカルスから植物体を再生し、T₀ 世代とした。T₀ 世代と既存品種との交配を行い、T₁ 世代を得た。その後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、自殖及び既存の品種との交配を行い、トウモロコシ DP910521 が得られた。安全性評価の対象は T₁ 世代以降とした。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

トウモロコシ DP910521 の交配過程の T₁ 世代の葉から抽出した DNA を断片化し、そのうち導入用プラスミド由来の配列を含む断片について、次世代シーケンサーを用いて Southern by Sequence (SbS) 分析^bを行った (参照 29)。その結果、PHP79620 由来の配列が認められた 6 つの陽性個体のいずれについても PHP79620 由来の配列として挿入 DNA 領域だけが認められ、外側骨格領域の配列は認められなかった。DP910521 中に LP 配列の 5' 末端及び 3' 末端とトウモロコシゲノム DNA との接合領域がそれぞれ 1 か所特定されたことから、実際に DP910521 中に LP 配列が 1 コピー含まれることが確認された。さらに、挿入 DNA 領域由来の配列とトウモロコシゲノム DNA との接合は認められなかったことから、LP 配列以外の場所への非意図的な挿入は生じていないことが確認された。なお、DP910521 にて実施した SbS 分析では、組換え体における平均カバレッジ深度が 999 から 1,809 であったことから、十分な信頼性を確保していると考えられた。これらのことから、トウモロコシ DP910521 ゲノム DNA 中に意図した挿入 DNA 領域が 1 コピー導入されていることが確認された。

また、DP910521 及び *zm*-SEQ138/139 系統の作出において用いられた他のプラスミドについても分析を行い、これらのプラスミドに由来する意図しない DNA 断片が DP910521 中に残存していないことが確認された (参照 29)。

トウモロコシ DP910521 の交配過程の BC₁F₂ 世代のゲノムを用いて、DP910521 のゲノム DNA に挿入された DNA 全体及びその近傍の塩基配列を Sanger 法により決定した。その結果、挿入 DNA 領域は意図したとおり LP 配列中に挿入されていることが確認された (参照 30)。

挿入 DNA 領域の 5' 側近傍配列 1,097 塩基及び 3' 側近傍配列 1,054 塩基が決定され、これらの近傍配列について、トウモロコシのゲノム DNA 配列データベースと blastn (version 2.10.0+) を用いて照合した (参照 31)。その結果、5' 側近傍配列中の 1,097 塩基は 1 番染色体の配列と 100%一致した (*E*-value=0)。また、3' 側近傍配列中の 1,054 塩基も 1 番染色体の配列と 99%一致した (*E*-value=0)。このことから、挿入 DNA の近傍配列はトウモロコシ 1 番染色体由来であると考えられた。

また、トウモロコシ DP910521 の作出に用いた *zm*-SEQ138/139 系統において、ゲノムに LP 配列の 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している。加えて、DP910521 の挿入 DNA 領域の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列について、データベース^cを用いて blastn 及

^b キャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた解析手法。

^c NCBI (核酸データベース 2021 年 7 月公表、EST データセット 2018 年 12 月公表、非重複タンパク質データセット 2021 年 7 月公表) (検索日: 2021 年 11 月)

び blastx 検索を行った。その結果、DNA が挿入された部位に内在性の遺伝子は存在していないと考えられた。

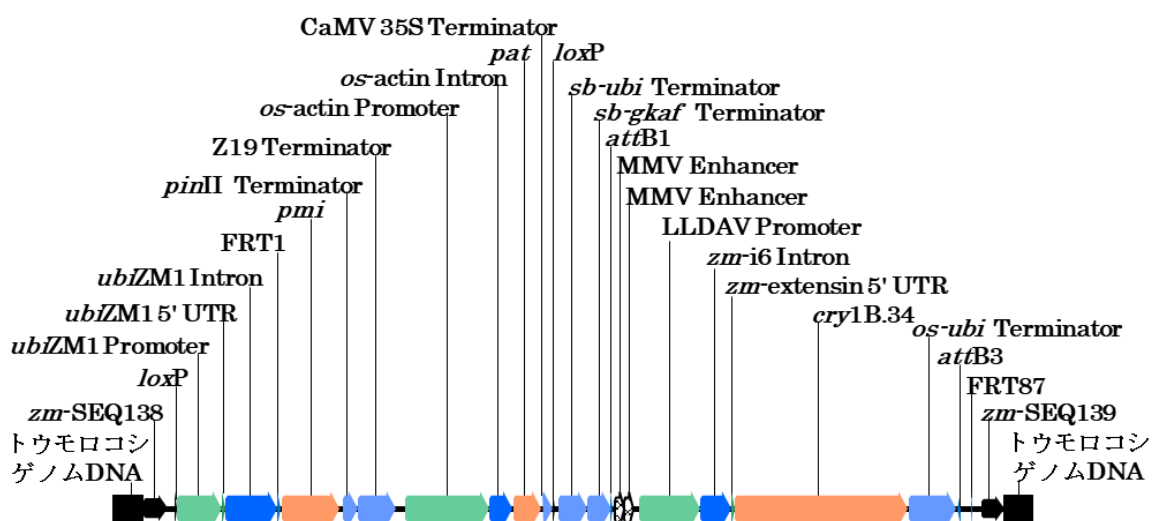


図1 トウモロコシ DP910521 のゲノム DNA 中に挿入された DNA (模式図)

(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 DP910521 の挿入 DNA 領域は部位特異的組換えによって LP 配列中に意図したとおり挿入されている。DP910521 に挿入されている DNA の全体及びその両末端近傍配列との接合部位において、終止コドンから終止コドンまで 8 アミノ酸以上のペプチドをコードする ORF を検索した結果、925 個の ORF が検出された。これらの ORF について、既知毒性タンパク質及び既知アレルゲンとのアミノ酸配列を比較した (参照 16)。

これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、毒性タンパク質データベース^a 及び NCBI-nr データベース^dを用い、blastp (version 2.11.0+) による検索を行った ($E\text{-value} < 10$)。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^eを用いて、 $E\text{-value} < 100$ 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 (参照 32、参照 33)。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示すペプチドをコードする ORF が 2 個検出された (参照 16 における DP910521_209 及び DP910521_728)。

DP910521_209 は *pat* 遺伝子発現カセット中の *os-actin* プロモーター及び

^d 検索日：2021 年 11 月

^e COMprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) ver 2019 (検索日：2021 年 11 月)

os-actin インترون領域に位置する。当該 ORF がコードするペプチドは 236 アミノ酸からなり、ヒョウヒダニ由来のペリトロフィン様タンパク質 (GenBank Accession: ALU66112.1) との間に 8 アミノ酸の一致が認められた (PTTTTTTT)。しかしながら、当該 ORF 中の 8 アミノ酸配列の上流には翻訳の開始コドンである ATG が認められず、真核生物で ATG の代わりに開始コドンとして機能する CTG、GTG 及び TTG も含まれていないことから、当該 ORF が翻訳される可能性は低い。

DP910521_728 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ترونの接続領域の相補鎖に位置する。当該 ORF がコードするペプチドは 59 アミノ酸からなり、8 個及び 12 個のグリシンが連続する 2 か所の poly-glycine 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る。しかしながら、当該 ORF の上流にはプロモーターが無いことから、転写される可能性は低い。また、当該 ORF 中の poly-glycine 配列の上流には翻訳の開始コドンである ATG が認められず、真核生物で ATG の代わりに開始コドンとして機能する CTG、GTG 及び TTG も含まれていないことから、当該 ORF が翻訳される可能性も低い。

以上のことから、DP910521 の挿入遺伝子領域及び近傍配列との接合領域において、潜在的に発現する可能性のあるペプチドが毒性又はアレルギー性を示す可能性は低いと考えられた。

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 DP910521 の根、葉、花粉、茎、地上部植物体及び子実について、Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI 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)。

表2 トウモロコシ DP910521 における遺伝子産物の部位、時期別産生量
(ng/mg 乾物重)

遺伝子産物	採取部位	採取時期	定量下限値	平均値	最小値 - 最大値	
CytB34 タンパク質	根	9 葉期	0.28	320	160	- 450
		開花期	0.28	190	75	- 290
		糊熟期 ¹⁾	0.28	130	54	- 230
	葉	6 葉期	0.14	590	410	- 840
		9 葉期	0.14	500	240	- 900
		開花期	0.14	450	140	- 780
		糊熟期 ¹⁾	0.14	820	430	- 1200
	花粉	開花期 ²⁾	0.28	0.21	<0.28	- 1.4
	茎	開花期	0.18	360	220	- 540
	地上部植 物体	糊熟期 ¹⁾	0.046	250	110	- 400
PAT タン パク質	根	9 葉期	0.054	73	39	- 99
		開花期	0.054	50	18	- 69
		糊熟期 ¹⁾	0.054	48	21	- 84
	葉	6 葉期	0.11	110	72	- 160
		9 葉期	0.11	100	66	- 130
		開花期	0.11	110	72	- 140
		糊熟期 ¹⁾	0.11	110	50	- 140
	花粉	開花期	0.22	64	52	- 95
	茎	開花期	0.036	81	46	- 120
	地上部植 物体	糊熟期 ¹⁾	0.036	70	30	- 140
PMI タン パク質	根	9 葉期	0.27	8.1	3.3	- 15
		開花期	0.27	4.7	3.0	- 7.2
		糊熟期 ¹⁾	0.27	4.4	2.6	- 6.0
	葉	6 葉期	0.54	17	12	- 24
		9 葉期	0.54	15	7.2	- 29
		開花期	0.54	17	9.6	- 33
		糊熟期 ¹⁾	0.54	35	23	- 72
	花粉	開花期	1.1	22	17	- 37
	茎	開花期	0.18	6.2	3.6	- 11
	地上部植 物体	糊熟期 ¹⁾	1.8	13	8.0	- 26
	子実	完熟期	0.27	5.2	2.3	- 8.7

1) 1 サンプルは PCR 解析による組換え判定が陰性であったため n=23 で算出した。

2) 一部のサンプルが定量限界未満であったため、当該サンプルの分析値に代えて定量限界の 1/2 の値を用いて平均値を算出した。

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

トウモロコシ DP910521 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 35）を全てトウモロコシ DP910521 に置き換えて Cry1B.34 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 5.5、10 及び 5.2 ng/mg 乾物重となり、一人一日当たりのタンパク質の摂取量 71.4 g（参照 35）に占める割合はそれぞれ 7.7×10^{-6} 、 1.4×10^{-5} 及び 7.3×10^{-6} となる。したがって、一日のタンパク質の摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

（1）挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

cry1B.34 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* のアレルギー誘発性は知られていない（参照 11、12）。

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（参照 13）。

pmi 遺伝子の供与体である *E. coli*（K-12 株）のアレルギー誘発性は知られていない（参照 14）。

（2）遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

Cry1B.34 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。

（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 Cry1B.34 タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

DP910521 で生産される Cry1B.34 タンパク質と生化学的に同等と考えられる *E. coli* で生産した Cry1B.34 タンパク質の人工胃液 (2500 units/ml ペプシン、pH1.2) 中における消化性について確認するために、SDS-PAGE（タンパク質染色）分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析において Cry1B.34 タンパク質の約 129 kDa のバンドは 30 秒後には検出されなかったが、5 kDa 以下の複数のバンドは試験開始 60 分後でも検出された（参照 36）。Cry1B.34 タンパク質を人工胃液で 10 分間処理することで生じた 5 kDa 以下の複数のバンドは、引き続き人工腸液で処理をすることにより 30 秒以内に消失した（参照 37）。ウェスタンブロット分析において、人工胃液処理試験開始 5 分後には Cry1B.34 タンパ

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

ク質のバンドは検出されなかった（参照 36）。

b. 人工腸液に対する感受性

Cry1B.34 タンパク質を人工腸液（0.5%パンクレアチン、pH7.5）で処理し、SDS-PAGE（タンパク質染色）分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、Cry1B.34 タンパク質の約 129 kDa のバンドは試験開始 30 秒後には消失したが、約 75 kDa 以下の複数のバンドは試験開始 60 分後でも検出された（参照 38）。

c. 加熱処理に対する感受性

Cry1B.34 タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するために、純水を用いて調製した Cry1B.34 タンパク質溶液を各温度で約 30 分から 35 分間加熱した後、標的のチョウ目昆虫であるフォールアーミーワームに混餌投与し致死率を測定した。Cry1B.34 タンパク質の終濃度は 25 ng/mg 湿重量となるように調整した。Cry1B.34 タンパク質を 25℃及び 50℃で処理した場合、非加熱対照と比較し有意な殺虫活性の低下は観察されなかったが、75℃以上の加熱処理を加えた場合、殺虫活性は検出されなかった（参照 39）。このことから、Cry1B.34 タンパク質は、加熱処理により殺虫活性が低下することが確認された。

② PAT タンパク質

本タンパク質は、既に承認を受けている 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。PAT タンパク質は、①人工胃液中で 30 秒以内に消化されること（SDS-PAGE 分析）、②人工腸液中で 30 秒以内に消化されること（ウェスタンブロット分析）、③90℃、60 分間の加熱処理により免疫反応性が認められたが酵素活性は失われること（SDS-PAGE 分析及び N-アセチルトランスフェラーゼ活性分析）が学術的に確認されている（参照 40）。

なお、OECD 公表文書において、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されている（参照 13）。

③ PMI タンパク質

本タンパク質は、既に承認を受けている SYN-IR162-4 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り、①人工胃液中で 30 秒以内に完全長タンパク質が消化され、30 秒後にみられた約 3 kDa のバンドは反応 60 分後でも検出されること（SDS-PAGE 分析）、②人工胃液中で検出された約 3 kDa のバンドは人工腸液中での連続処理により 30 秒以内に消化されること（SDS-PAGE 分析）、③人工腸液中で 20 分以内に消化されること（SDS-PAGE 分析）、④75℃で約 30 分から 35 分間の加熱処理により酵素活性が失われること（ホスホマンノースイソメラーゼ活性分析）が確認されている（参

照 41、42、43、44)。

以上の結果から、Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI 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。

- (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

Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI タンパク質と既知アレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、COMPARE データベース^eを用いて相同性検索を行った。検索には、連続する 8 アミノ酸以上で完全に一致する配列の検索方法と、FASTA (version 35.4.4) による連続する 80 アミノ酸残基以上で 35%を超えて一致する配列の検索方法を用いた（参照 32、33）。*E*-value < 100 に設定した。

その結果、Cry1B.34 タンパク質及び PAT タンパク質に既知アレルゲンとの相同性は認められなかった（参照 16）。PMI タンパク質を含む ORF については、カエル由来の推定 α -パルブアルブミン (Genbank Accession CAC83047.1; Hilger et al., 2002) との間に 8 アミノ酸の一致 (DLSDKETT) が認められた（参照 16）。当該 8 アミノ酸は、交差反応性パルブアルブミンで共有される既知のアレルゲンのエピトープの外側にあること、PMI タンパク質がパルブアルブミンのアレルギー誘発性に重要な立体構造を有していないこと及び PMI タンパク質のように 8 アミノ酸の一致を示しながら 80 アミノ酸以上について 35%より大きい相同性を有さない例は、交差反応性を示す既知のアレルゲンの組み合わせとして知られていないことから、検出された 8 アミノ酸の一致は偽陽性であると考えられる（参照 16、45）。さらに、PMI タンパク質が食品としてこれまでに安全に使用されていることなどから、PMI 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。

- (5) 遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能の検討

上記（1）から（4）より、Cry1B.34 タンパク質、PAT タンパク質及び PMI タンパク質のアレルギー誘発性を示唆するデータがなかったため、本事項についての検討は行わなかった。

上記（1）～（5）及び前項 3 から総合的に判断し、Cry1B.34 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 DP910521 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 46）。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

Cry タンパク質の機能について数多くの研究がなされているが（参照 47）、Cry タンパク質が酵素活性を有することを示す報告はない。したがって、Cry1B.34 タンパク質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いと考えられる。

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が、基質特異性を有しており、他のアミノ酸や D-グルホシネートを基質としない（参照 13）。

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が、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 48）。

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

実際、第 6-7 に示すように、子実中の主要構成成分等において、非組換えトウモロコシと DP910521 との間に相違は認められなかった。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で栽培されたトウモロコシ DP910521 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 49）。トウモロコシ DP910521 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、粗脂質、粗繊維、酸性及び中性デタージェント繊維、灰分並びに炭水化物）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に灰分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^fの範囲内であった。

（2）脂肪酸組成

脂肪酸 15 成分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統計学的有意差は認められなかった。

（3）アミノ酸組成

アミノ酸 18 成分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

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

ロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ミネラル類

ミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間で亜鉛に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は商業品種変動の範囲内であった。

(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 B₁ (チアミン) に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は自社商業品種変動の範囲内であった。

(6) 栄養阻害物質及び二次代謝産物

フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター、*p*-クマル酸、フェルラ酸、フルフラール及びイノシトールについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間で *p*-クマル酸に統計学的有意差が認められたが、個々の測定値は商業品種変動の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

EU においては、欧州食品安全機関 (EFSA) に対して食品・飼料としての利用についての安全性審査を申請中である。

その他、4 カ国・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 DP910521 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 DP910521 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ (デント種) と同じである。

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

第2から第6までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP910521)」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 戸澤英男. (2005). トウモロコシ－歴史・文化、特性・栽培、加工・利用－. 農山漁村文化協会. pp.2-4, pp.56-59, p.127.
2. トウモロコシ子実中の構成成分文献値一覧 (社内文書)
3. OECD. (2003). Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, No. 27. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2003)11.(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815758.pdf>). Accessed on June 23th, 2021.
4. OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2002) 25. (<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815196.pdf>). Accessed on June 23th, 2021.
5. Pastorello, E.A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ispano, M., Scibola, E., Trambaioli, C., Giuffrida, M.G., Ansaloni, R., Godovac-Zimmermann, J., Conti, A., Fortunato, D. and Ortolani, C. (2000). The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106: 744-751.
6. Pastorello, E.A., L. Farioli, V. Pravettoni, J. Scibilia, A. Conti, D. Fortunato, L. Borgonovo, S. Bonomi, L. Primavesi and B. Ballmer-Weber. (2009). Maize food allergy: Lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 395: 93-102.
7. Volpicella, M., C. Leoni, I. Fanizza, M. Distaso, G. Leoni, L. Farioli, T. Naumann, E. Pastorello and L.R. Ceci. (2017). Characterization of maize chitinase-A, a tough allergenic molecule. *Allergy* 72: 1423-1429.
8. Lee, S.-H., M. Benmoussa, S.K. Sathe, K.H. Roux, S.S. Teuber and B.R. Hamaker. (2005). A 50 kDa maize γ -zein has marked cross-reactivity with the almond major protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 7965-7970.
9. CODEX. (1999). Draft recommendations for the labeling of foods that can cause hypersensitivity (Draft amendment to the general standard for the labelling of prepackaged foods). Codex Alimentarius Commission. Alinorm 99/22, Appendix III. p60.
10. Description and Sequence of the Recombination Fragment Region from Plasmid PHP79620 (STUDY NUMBER: PHI-2020-160). (社内文書)
11. US EPA. (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): *Bacillus*

- thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004.
(<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf>).
Accessed on June 9th, 2022.
12. US EPA. (2001). Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-incorporated protectants (October 15, 2001). United States Environmental Protection Agency.
(http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm).
Accessed on June 9th, 2022
 13. OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 11. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(99)13.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
Accessed on June 23th, 2021.
 14. US EPA. (1997). *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency,
http://epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm
 15. Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. and Hansen, G. (2000). The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*. 19: 798-803.
 16. Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-195_225). (社内文書)
 17. Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of yeast *in vitro*. *Nucleic Acids Research*. 14: 4787-4802.
 18. Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14: 5641-5650.
 19. Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyl transferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 70: 25-37.
 20. Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.
 21. Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.

22. Dey, N., Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol.* 40: 771–782.
23. Zhang, L., Lockhart, B., Dahal, G., Olszewski, N. (2008). Studies on biology and genomic characterization of a caulimo-like virus associated with a leaf distortion disease of *Lamium maculatum*. *Archives of Virology.* 153: 1181-1184.
24. US Patent 10344290 [Diehen *et al.*, 2019]
25. WO Patent 2016061197 [Izumi and Yamamoto, 2016]
26. US Patent 7541517 [Flannagan and Abad, 2009]
27. Wang, J., Jiang, J., Oard, J.H. (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science.* 156: 201-211.
28. Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT recombination sites and methods of use. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2007011733
29. Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-91Ø521-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2021-045) (社内文書)
30. Sequence Characterization of Insert and Flanking Regions of DP-91Ø521-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2021-064). (社内文書)
31. Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-194_230). (社内文書)
32. FAO/WHO. (2001). Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology 22-25 January 2001. p10.
33. CODEX. (2003). Proposed draft annex on the assessment of possible allergenicity of the draft guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants. Codex Alimentarius Commission. Alinorm 03/34, Appendix IV. pp.57-60.
34. Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2020-024_700). (社内文書)
35. 厚生労働省. (2019). 令和元年国民健康・栄養調査報告. p.78, p.96. (<https://www.mhlw.go.jp/content/000710991.pdf>). Accessed on June 23th, 2021.
36. Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Cry1B.34 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-055). (社内文書)
37. Characterization of Cry1B.34 Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-056). (社内文書)

38. Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Cry1B.34 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-078). (社内文書)
39. Determination of the Biological Activity of Heat-Treated Cry1B.34 Protein Incorporated in an Artificial Diet and Fed to *Spodoptera frugiperda* (STUDY NUMBER: PHI-2021-067). (社内文書)
40. Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R-J, Rouan D (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41: 134-149.
41. Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of PMI Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-141). (社内文書)
42. Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of PMI Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-142). (社内文書)
43. Characterization of PMI Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-143). (社内文書)
44. Determination of the Enzymatic Activity of Heat-Treated PMI Protein (STUDY NUMBER: PHI-2021-174). (社内文書)
45. Herman RA, Song P, Mirsky HP, Roper JM (2021). Evidence-based regulations for bioinformatic prediction of allergen cross-reactivity are needed. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 120: 104841.
46. Characterization of DP-91Ø521-2 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-052). (社内文書)
47. OECD. (2007). Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* - derived insect control proteins. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.42. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(2007)14.
48. Freeze, H. H. (2002). Phosphomannose isomerase. Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds. Springer-Verlag, Tokyo and New York: pp. 595-599.
49. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2020-025_021). (社内文書)