

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ  
(DP-098140-6)」に係る安全性確認(案)

## I はじめに

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (DP-098140-6 (以下「DP-098140-6」という。)) について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

## II 確認対象飼料の概要

飼料名：除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (DP-098140-6)

性 質：除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性

申請者：デュポン株式会社

開発者：パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社

DP-098140-6は、*Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来する *gat4621* 遺伝子 (以下「*gat4621* 遺伝子」という。) 及びトウモロコシ (*Zea mays* L.) のアセト乳酸合成酵素遺伝子由来の *zm-hra* 遺伝子 (以下「*zm-hra* 遺伝子」という。) が導入されており、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤による影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

一般に、トウモロコシは主にその穀粒が家畜等の飼料として使用される。

## III 審議内容

### 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

#### (1) 遺伝的素材に関する事項

宿主に用いられた植物は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ (*Zea mays* L.) のデント種に属する。DP-098140-6 に導入された、*gat4621* 遺伝子は、グラム陽性細菌である *Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来し、*zm-hra* 遺伝子はトウモロコシのアセト乳酸合成酵素遺伝子に由来する。

#### (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるトウモロコシ (デント種) の主な利用目的は飼料用であり、広範囲な家畜等の飼養経験を持つ。

#### (3) 飼料の構成成分等に関する事項

DP-098140-6 及び非組換えトウモロコシの種子及び茎葉中の主要構成成分 (たん白質、脂質、灰分、炭水化物、食物繊維)、抗栄養素 (フィチン酸、ラフィノース) 及び 2 次代謝産物 (フェルラ酸、*p*-クマル酸、フルフラール) の量は明らかになっている (参考文献 1、2)。

42 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項  
43 DP-098140-6 と既存のトウモロコシとの相違は、DP-098140-6 が GAT4621 たん白質  
44 及び ZM-HRA たん白質の発現により、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害  
45 剤の影響を受けずに生育できる点のみである。これらの点を除けば、既存種と比較して①  
46 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法、②家畜等の摂取(可食)部位、③家畜等の摂取量、④調製及  
47 び加工方法について相違はない。

48  
49 以上 (1) ~ (4) により、DP-098140-6 の飼料としての安全性を評価するために、既存  
50 のトウモロコシを比較対象として用いる方法が適用できると判断された。

51  
52 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

53 DP-098140-6 は、GAT4621 たん白質及び ZM-HRA たん白質を発現することにより、除草  
54 剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に耐性を示し、栽培農家は異なる特性を持つ2  
55 つの除草剤を有効に利用することが可能となる。

56  
57 3 宿主に関する事項

58 (1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

59 DP-098140-6 の宿主は、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種の  
60 PHWVZ 系統である。

61  
62 (2) 遺伝的先祖に関する事項

63 トウモロコシの遺伝的先祖は同属のブタモロコシで、人為的選抜を経て今日の栽培種に進  
64 化したと言われている(参考文献 3)。原産地は、メキシコ又はグアテマラと考えられてい  
65 る。

66  
67 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

68 トウモロコシには、栄養学的に有害と考えられる有害生理活性物質の生産は知られていな  
69 い(参考文献 2)。

70  
71 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

72 トウモロコシの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

73  
74 (5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

75 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が(参考文  
76 献 3)、これらのウイルスや病原菌が動物に感染することは知られていない。

77  
78 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

79 トウモロコシは栽培作物であり、我が国において自生したという報告はされていない。

80  
81 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

82 トウモロコシは種子繁殖する一年生のイネ科植物である。主に春に播種され、秋に収穫さ  
83 れる。他殖率 95%程度であり、受粉は風媒によって行われる（参考文献 4）。

84 トウモロコシと交雑可能な近縁種として、トウモロコシと同じ *Zea* 属のブタモロコシが  
85 あるが、ブタモロコシは我が国には自生していない（参考文献 3）。

#### 86 87 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

88 トウモロコシは、16 世紀末にヨーロッパから我が国に伝来し、九州や本州で栽培される  
89 ようになった。明治時代に北海道開拓使により早生のフrint種やデント種が導入され、飼  
90 料用として定着した（参考文献 5）。

91 現在、種子を配合飼料の原料として利用する他、サイレージ用としての利用及び青刈りの  
92 ままの利用がある。また、ウェットミリングやドライミリング及びアルコール発酵の際の副  
93 産物も飼料として利用されている（参考文献 6）。

#### 94 95 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

96 トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

#### 97 98 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

99 トウモロコシは、我が国では一般に結実後冬季に枯死し、成体で越冬することは知られて  
100 いない。また、トウモロコシの雌穂は苞葉に包まれているため、自然条件下で種子が拡散す  
101 ることはない（参考文献 3）。

#### 102 103 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

104 トウモロコシの近縁種として *Zea* 属のブタモロコシ及び *Tripsacum* 属がある。これら近  
105 縁種において、有害生理活性物質の産生は報告されていない。

### 106 107 4 ベクターに関する事項

#### 108 (1) 名称及び由来に関する事項

109 DP-098140-6 の作出に用いた発現ベクターPHP24279 は、プラスミド pSB1 由来である  
110 （参考文献 7）。

#### 111 112 (2) 性質に関する事項

113 発現ベクターPHP24279 の塩基数は 50,371bp である。発現ベクターPHP24279 に含ま  
114 れるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

#### 115 116 (3) 薬剤耐性に関する事項

117 PHP24279 の外骨格領域には、抗生物質耐性マーカーであるテトラサイクリン耐性  
118 (*tetA*) 遺伝子及び中間ベクターに由来するスペクチノマイシン耐性 (*spe*) 遺伝子が含ま  
119 れる。これらの抗生物質耐性マーカー遺伝子は DP-098140-6 中に導入されていない。

#### 120 121 (4) 伝達性に関する事項

122 発現ベクターPHP24279 は、宿主植物から他の生物へ伝達を可能とする配列を含まない。

123

124 (5) 宿主依存性に関する事項

125 発現ベクターPHP24279 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、植物、  
126 家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。

127

128 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

129 発現ベクターPHP24279 は、*gat4621* 遺伝子発現カセット及び *zm-hra* 遺伝子発現カセ  
130 ットからなる T-DNA 領域から構成されている。

131 *gat4621* 遺伝子発現カセットは、*ubiZM1* プロモーター、*ubiZM1* イントロン、*gat4621*  
132 遺伝子及び *pinII* ターミネーターからなり、*zm-hra* 遺伝子発現カセットは、*zm-als* プロモ  
133 ーター、*zm-hra* 遺伝子及び *pinII* ターミネーターからなる。

134

135

136 (7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

137 発現ベクターPHP24279 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入した（参考  
138 文献 8、9）。

139

140 5 挿入遺伝子に関する事項

141 (1) 供与体に関する事項

142 ①名称、由来及び分類に関する事項

143 *gat4621* 遺伝子の供与体は、グラム陽性菌である *Bacillus licheniformis* (ST401 株、  
144 B6 株、DS3 株) である。*zm-hra* 遺伝子の供与体は、トウモロコシである。

145

146 ②安全性に関する事項

147 *gat4621* 遺伝子の供与体である *B. licheniformis* は、日本をはじめ、米国、ヨーロッ  
148 パ等で、デンプン液化で使用される  $\alpha$ -アミラーゼ等の食品製造酵素の生産に広く利用  
149 されている（参考文献 10、11）。*zm-hra* 遺伝子の供与体であるトウモロコシは、家畜  
150 の飼料として広く利用されている（参考文献 12）。

151

152 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

153 CaMV 35S エンハンサー、*ubiZM1* プロモーター、*ubiZM1* イントロン及び *pinII* ター  
154 ミネーターを構成要素として含む中間ベクターに *gat4621* 遺伝子を挿入し、*gat4621* 遺伝  
155 子発現カセットを持つベクターを構築し、そこへ *zm-hra* 遺伝子発現カセットを挿入し、  
156 PHP24277 を構築した。PHP24277 を、アクセプターベクターである pSB1 と一緒に  
157 *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株に導入し、相同組換え  
158 により *gat4621* 遺伝子発現カセット及び *zm-hra* 遺伝子発現カセットを持つ発現ベクター  
159 PHP24279 を構築した（参考文献 7）。

160

161 (3) 構造に関する事項

162 *gat4621* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ由来ポリユビキチン遺伝子 1 の  
 163 *ubiZM1* プロモーターを用いた (参考文献 13)。*zm-hra* 遺伝子発現カセットには、トウ  
 164 モロコシ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子の *zm-als* プロモーターを用いた (参考文献 14)。  
 165 *gat4621* 遺伝子発現カセット及び *zm-hra* 遺伝子発現カセットには、バレイショ由来プ  
 166 ロテアーゼインヒビターII 遺伝子の *pinII* ターミネーターを用いた (参考文献 15、16)。  
 167 発現ベクターPHP24279 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、既知  
 168 の有害塩基配列を含まない。

170 (4) 性質に関する事項  
 171 表1にまとめた。

172 表 1 発現ベクターPHP24279 の各構成 DNA の由来及び機能  
 173

| 構成要素                      | 由来及び機能   |
|---------------------------|--|
| <i>gat4621</i> 遺伝子発現カセット  |  |
| <i>ubiZM1</i><br>プロモーター   | トウモロコシ由来ポリユビキチン遺伝子 1 のプロモーター領域 (参考文献 13)。  |
| <i>ubiZM1</i><br>5' UTR   | トウモロコシ由来ポリユビキチン遺伝子 1 の 5'非翻訳領域 (参考文献 13)。  |
| <i>ubiZM1</i><br>イントロン    | トウモロコシ由来ポリユビキチン遺伝子 1 のイントロン領域 (参考文献 13)。遺伝子の発現を高める作用を有する。  |
| <i>gat4621</i>            | <i>B. licheniformis</i> (ST401 株、B6 株、DS3 株) 由来の <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼを基に、除草剤グリホサートに対する <i>N</i> -アセチル化触媒活性を高めるよう塩基配列を改変して作製したグリホサート <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ遺伝子。 |
| <i>pinII</i><br>ターミネーター   | バレイショ ( <i>Solanum tuberosum</i> ) 由来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 (参考文献 15、16)。  |
| <i>zm-hra</i> 遺伝子発現カセット * |  |
| CaMV 35 S<br>エンハンサー       | カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来のエンハンサー領域 (参考文献 17、18)。  |
| <i>zm-als</i><br>プロモーター   | トウモロコシ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域 (参考文献 14)。   |
| <i>zm-hra</i>             | トウモロコシ由来、アセト乳酸合成酵素 ( <i>zm-als</i> ) 遺伝子の改変遺伝子で、アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けない ZM-HRA タンパク質前駆体をコードする (参考文献 14)。  |
| <i>pinII</i><br>ターミネーター   | バレイショ由来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 (参考文献 15、16)。  |

174

175 (5) 純度に関する事項  
 176 発現ベクターPHP24279 の T-DNA 領域の塩基数は 7,440 bp である。その塩基配列、大  
 177 きさ及び由来は明らかであり、挿入遺伝子はすべてクローニングされ、目的外の遺伝子の  
 178 混入がないよう純化されている。

180 (6) 安定性に関する事項  
 181 挿入遺伝子の安定性を確認するため、隣り合わない 3 つの世代から抽出した DNA を用  
 182 い、サザンブロット分析を行った。その結果、DP-098140-6 中の挿入遺伝子が後代に安定  
 183 して遺伝していることが確認された (参考文献 19、20) 。

185 (7) コピー数に関する事項  
 186 DP-098140-6 のゲノム中に挿入された発現ベクターPHP24279 における T-DNA 領域  
 187 (*gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子発現カセット) のコピー数と完全性を、サザンブ  
 188 ロット分析で解析した (参考文献 19)。その結果、DP-098140-6 のゲノム中に、完全長の  
 189 *gat4621* 遺伝子発現カセットと *zm-hra* 遺伝子発現カセットからなる発現ベクター  
 190 PHP24279 の T-DNA 領域が 1 コピー挿入されていることが確認された。

191 また、挿入遺伝子に隣接する 5'及び 3'末端近傍配列 (各 300 bp) を分析した結果、近傍  
 192 配列がトウモロコシ由来であることが確認された (参考文献 21) 。

194 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項  
 195 6箇所のは場において栽培した DP-098140-6 中の GAT4621 及び ZM-HRA タンパク質  
 196 の発現量を ELISA 法により測定した。表 2 の通りであった (参考文献 22) 。

198 表 2 DP-098140-6 の各組織における GAT4621 タンパク質及び ZM-HRA タンパク質の発現量

| 採取時期  | 採取部位 | ng/mg 乾物重     |              |
|-------|------|---------------|--------------|
|       |      | GAT4621 タンパク質 | ZM-HRA タンパク質 |
|       |      | 平均値           | 平均値          |
| 絹糸抽出期 | 花粉   | 13            | 0            |
|       | 葉    | 51            | 5.9          |
|       | 茎    | 28            | 1.4          |
|       | 根    | 11            | 0.36         |
| 成熟期   | 種子   | 7.9           | 0.34         |
|       | 葉    | 4.3           | 0.048        |
|       | 根    | 2.6           | 0.026        |

212 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項  
 213 発現ベクターPHP24279 の外骨格領域には、抗生物質テトラサイクリン及びスペクノマ  
 214 イシンに対する耐性マーカー遺伝子 (*tetA* 及び *spc*) が組み込まれているが、サザンブ  
 215 ロット分析の結果、本外骨格領域が DP-098140-6 に導入されていないことが確認された (参

216 考文献 20)。

217 (10) 外来の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

218 事項

219 発現ベクターPHP24279 内 T-DNA 領域のオープンリーディングフレーム (ORF) の有

220 無を、遺伝子解析ソフト Vector NTI 10.3 を用いて調べた。その結果、本 T-DNA 領域の配

221 列中に、目的とする GAT4621 タンパク質及び ZM-HRA タンパク質以外の、タンパク質の

222 発現に関与すると考えられる配列は認められなかった。

223 DP-098140-6 の挿入遺伝子に隣接する 5'及び 3'末端近傍配列 (各 300 bp) について、デ

224 ータベースを用いた相同性検索 (blastn 検索及び blastx 検索) を実施した結果 (参考文献

225 23、24)、並びに DP-098140-6 の構成成分及び農業形質評価の結果 (参考文献 1、25) を

226 総合的に考察した。その結果、DP-098140-6 において、本挿入遺伝子が機能を有する既存

227 のトウモロコシ内在性遺伝子に挿入された可能性は低いと考えられた。

228

229 6 組換え体に関する事項

230 (1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

231 導入された *gat4621* 遺伝子及び *zm-hra* 遺伝子は、それぞれ GAT4621 及び ZM-HRA タ

232 ンパク質を発現している。

233

234 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

235 ①GAT4621 タンパク質

236 GAT4621 タンパク質と既知毒性タンパク質との間の構造相同性の有無を検討するた

237 め、National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパク質データベー

238 スを用い、blastp アルゴリズムによるアミノ酸配列相同性検索を行った。その結果、

239 GAT4621 タンパク質と既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった (参考文献

240 26)。

241

242 ②ZM-HRA タンパク質

243 ZM-HRA タンパク質と既知毒性タンパク質との間の構造相同性の有無を検討するた

244 め、GAT4621 タンパク質と同様の検索を行った。その結果、ZM-HRA タンパク質と既

245 知毒性タンパク質との相同性は認められなかった。(参考文献 27)

246

247 (3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

248 本試験には、大腸菌で産生させた GAT4621 及び ZM-HRA タンパク質を用いた。試験に

249 先立ち、分子量測定 (SDS-PAGE 分析)、免疫反応性評価 (ウェスタンブロット分析)、

250 アミノ酸及び N-末端配列の解析 (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析:

251 MALDI-MS) 及びグリコシル化の有無の評価を行い、大腸菌が産生した GAT4621 タンパ

252 ク質及び ZM-HRA タンパク質と DP-098140-6 由来の両たん白質の同等性を比較した。そ

253 の結果、大腸菌由来の両たん白質を試験に用いても問題はないと判断された (参考文献 28、

254 29)。

255

256 ①人工胃液に対する感受性

257 GAT4621 タンパク質及び ZM-HRA タンパク質の人工胃液中での消化性を、SDS-  
258 PAGE 分析とウェスタンブロット分析で評価した。

259 (i) GAT4621 タンパク質

260 SDS-PAGE 分析の結果、試験開始 30 秒後には、GAT4621 タンパク質の約 17  
261 kDa のバンドは検出されなかったが、60 分後まで 3kDa 以下のバンドが認められた。  
262 ウェスタンブロット分析の結果、試験開始 30 秒後には、約 17 kDa 及び 3kDa のい  
263 ずれのバンドも検出されなかった (参考文献 30)。

264

265 (ii) ZM-HRA タンパク質

266 SDS-PAGE 分析の結果、試験開始 30 秒後には、ZM-HRA タンパク質の約 65kDa  
267 のバンドは検出されなかった。ウェスタンブロット分析の結果、試験開始 30 秒後に  
268 は、約 65kDa のバンドは検出されなかった (参考文献 31)。

269

270 以上、GAT4621 及び ZM-HRA タンパク質は、人工胃液中で容易に消化されることが確  
271 認された。

272

273 ②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

274 GAT4621 及び ZM-HRA タンパク質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及  
275 びウェスタンブロット分析で評価した。

276 (i) GAT4621 タンパク質

277 SDS-PAGE 分析の結果、試験開始 2 分後には GAT4621 タンパク質及び分解ペプ  
278 チドのいずれのバンドも検出されなかった。ウェスタンブロット分析の結果、試験開  
279 始 2 分後まで、GAT4621 タンパク質及び分解ペプチドのバンドが検出されたが、試  
280 験開始 5 分後には、いずれのバンドも検出されなかった (参考文献 32)。

281

282 (ii) ZM-HRA タンパク質

283 SDS-PAGE 分析の結果、試験開始 30 秒後には、ZM-HRA タンパク質及び分解ペ  
284 プチドのいずれのバンドも検出されなかった。ウェスタンブロット分析の結果、試験  
285 開始 30 秒後には、ZM-HRA タンパク質及び分解ペプチドのいずれのバンドも検出さ  
286 れなかった (参考文献 33)。

287

288 以上、GAT 4621 及び ZM-HRA タンパク質は、人工腸液中で容易に消化されることが確  
289 認された。

290

291 ③加熱処理

292 加熱による GAT4621 及び ZM-HRA タンパク質の高次構造の変化について、ウェス  
293 タンブロット分析及び酵素活性試験の結果をもとに考察した。

294 酵素活性の測定により熱安定性を検討した結果、GAT4621 タンパク質の酵素活性は  
295 53°C15 分の加熱で 10%未満に低下し、ZM-HRA タンパク質の酵素活性は 50°C15 分間  
296 の加熱で完全に失われた。このことから、両タンパク質は加熱により高次構造が変化す  
297 ることが考えられた。また、ウェスタンブロット分析の結果、加熱後、高次構造の変化

298 を起こし凝集しやすい性質を有することが示唆された（参考文献 34、35、36、37）。

299

300 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

301 ①GAT4621 タンパク質

302 GAT4621 タンパク質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。一般に *N*-ア  
303 セチルトランスフェラーゼは、タンパク質の *N* 末端アミノ酸や生体アミン化合物である  
304 遊離アミノ酸及びヒストンのアミノ酸側鎖並びに抗生物質等をアセチル化する（参考文  
305 献 38）。

306 GAT4621 タンパク質が宿主の持つ代謝経路に与える影響の有無を、結晶構造解析及  
307 び基質反応性試験により、GAT4621 タンパク質の代謝経路への影響について検討する  
308 ため (i) 結晶構造解析、(ii) 基質反応性、(iii) アミノ酸含有量について考察した。

309

310 (i) 結晶構造解析

311 GAT4621 タンパク質の結晶構造解析の結果、タンパク質の内部奥に位置する 4 つ  
312 のアミノ酸残基が除草剤グリホサートの *N*-アセチル化反応の活性中心として寄与し  
313 ていることが明らかになった（参考文献 39）。このことは、低分子化合物だけが立  
314 体障害を受けずに活性中心に到達し、GAT4621 タンパク質の基質となり得ること、  
315 すなわち高分子化合物は基質となる可能性が低いことを示唆している。

316 また、GAT4621 タンパク質とホモロジーの高い GAT4602 タンパク質を用いた研  
317 究では、生体内アミン類のうち、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン、tRNA と  
318 いった高分子化合物及び低分子の生体内アミンである *D*-グルコサミン、セロトニン、  
319 アントラニル酸、オルニチン、プリン、ピリミジン塩基に対し、*N*-アセチル化触媒活  
320 性を示さないことが報告されており、GAT4621 タンパク質においても同様のことが  
321 いえると推測される（参考文献 39, 40）。

322

323 (ii) 基質反応性

324 基質となる可能性のある低分子化合物に対する、GAT4621 タンパク質の触媒活性  
325 を測定した。低分子化合物として、農薬（除草剤、殺虫剤及び殺菌剤等 20 種）、抗  
326 生物質（カナマイシンやアンピシリン等 10 種）、アミノ酸（21 種）を用いた。その  
327 結果、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、セリン及びグリシンの 5 種のア  
328 ミノ酸に対する酵素活性が認められた。これらのアミノ酸の内、高い活性を示したア  
329 スパラギン酸とグルタミン酸においても、グリホサートに対する酵素活性の 3%程度  
330 であった（参考文献 41）。

331 次に、生体内により近い条件で上述の 5 種のアミノ酸に加え、除草剤グリホサート  
332 と構造が極めて類似する 4 種類の化合物を基質とし、 $k_{cat}/K_M$  値を測定した。その結  
333 果、アスパラギン酸及びグルタミン酸の  $k_{cat}/K_M$  値は、除草剤グリホサートに対する  
334 値 ( $1,063 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) の、それぞれ 1.14%及び 0.785%であった。トレオニン、セリ  
335 ン、グリシンや除草剤グリホサートの類似化合物では、0.06%未満かあるいは活性が  
336 認められなかった（参考文献 41）。

337 以上のことから、GAT4621 タンパク質は除草剤グリホサートに対し高い基質特異  
338 性を有すると考えられた

339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378

(iii) アミノ酸含有量

GAT4621 タンパク質は、除草剤グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられるが、上述の (ii) に記載したとおり、生体内に近い条件下において、アスパラギン酸とグルタミン酸に対して触媒活性が認められたことから、DP-098140-6 種子中の *N*-アセチルアミノ酸の分析を行った。その結果、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸が非組換えトウモロコシに比べ統計学的有意に増加していた (参考文献 42、43)。残り3種の *N*-アセチルアミノ酸についても有意差が認められたが、その増加量はわずかであった。これら *N*-アセチルアミノ酸の増加が、アミノ酸及び遊離アミノ酸組成に影響を与えないかどうかを検討するため、DP-098140-6 種子中のアミノ酸及び遊離アミノ酸組成の分析を行った (参考文献 44、45)。その結果、アミノ酸及び遊離アミノ酸組成は、非組換えトウモロコシと同程度であり、DP-098140-6 において、GAT4621 タンパク質は、宿主のアミノ酸組成に影響を及ぼさないと考えられた。

(i) ~ (iii) により、GAT4621 タンパク質の産生は、宿主の持つ代謝系に大きな影響は及ぼさないと考えられた。

②ZM-HRA タンパク質

*zm-hra* 遺伝子により産生される ZM-HRA タンパク質はアセト乳酸合成酵素阻害剤の存在下でも活性を示し、分枝アミノ酸 (バリン、ロイシン及びイソロイシン) の合成を可能とする。これにより植物にアセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性を付与する。バリン・ロイシン合成経路及びイソロイシン合成経路における内在性アセト乳酸合成酵素は、バリン等両経路の最終産物によりフィードバック制御されることが知られている (参考文献 38)。DP-098140-6 のバリン、ロイシン及びイソロイシンの含有量は、非組換えトウモロコシとの間で相違はなかった (参考文献 45)。このことは、ZM-HRA タンパク質が内在性アセト乳酸合成酵素と同様、分枝アミノ酸合成経路のフィードバック制御下にあり、ZM-HRA タンパク質の産生が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

なお、上述のとおり、GAT4621 タンパク質と ZM-HRA タンパク質の作用機作及び両タンパク質が利用する基質は異なっていること、さらに、DP-098140-6 におけるアミノ酸組成及び遊離アミノ酸組成が非組換えトウモロコシと同程度であったことから、両タンパク質が互いに作用し宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

DP-098140-6 と非組換えトウモロコシについて成分分析を行った (参考文献 1)。

①主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分 (たん白質、脂質、灰分、炭水化物、粗繊維分、酸性デタ

379 ージェント繊維、中性デタージェント繊維) について分析した結果、DP-098140-6 と非組  
380 換えトウモロコシの間で統計学的有意差は認められなかった。

381

## 382 ②脂肪酸組成

383 穀粒の脂肪酸について分析した結果、ヘプタデカン酸 (C17:0)、リノレン酸  
384 (C18:3) 及びアラキジン酸 (C20:0) において非組換えトウモロコシとの間に統計学的  
385 有意差 (P 値<0.05) が認められたが、いずれも自社商業品種における変動の範囲又は文  
386 献値の範囲内であった。

387

## 388 ③アミノ酸組成

389 穀粒のアミノ酸組成を分析した結果、トリプトファンにだけ非組換えトウモロコシと  
390 の間に統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、その値は自社商業品種における変  
391 動の範囲又は文献値の範囲内であった。

392 次に、GAT4621 タンパク質が触媒活性を示した 5 種のアミノ酸 (アスパラギン酸、  
393 グルタミン酸、トレオニン、セリン及びグリシン) について、*N*-アセチルアミノ酸量を  
394 分析した結果、いずれも非組換えトウモロコシに比べ統計学的有意に (P 値<0.05) 増加  
395 していたが、*N*-アセチルセリンは自社商業品種における変動の範囲内であった。*N*-アセ  
396 チルトレオニン及び *N*-アセチルグリシンの DP-098140-6 中の含有量は、これら自社商  
397 業品種における変動の範囲の上限である 1.52 及び 0.200  $\mu$ g/g 乾物重に比べ、2.99 及び  
398 0.233  $\mu$ g/g 乾物重と  $\mu$ g レベルの増加であった (参考文献 42、43)。

399 *N*-アセチルグリシン及び *N*-アセチルトレオニンの毒性について、文献検索を行った  
400 結果、これらが毒性を示すと報告は検出されなかった。DP-098140-6 中の含有量が少  
401 なく、また非組換えトウモロコシとの差も  $\mu$ g レベルであったことから、*N*-アセチル  
402 グリシン及び *N*-アセチルトレオニン増加による安全性上の懸念はないと考えられた。

403 なお、ブロイラー飼養試験とラット 90 日混餌投与試験において、DP-098140-6 及び  
404 非組換えトウモロコシが栄養学的及び毒性学的に相違のないことが示された (参考文献  
405 46、47)。本試験において、ブロイラー又はラットが摂取した *N*-アセチルグリシン及  
406 び *N*-アセチルトレオニンは、これら家畜が飼料から摂取する一日最大予想摂取量と同等  
407 かそれ以上と算出された。本結果からも、*N*-アセチルグリシン及び *N*-アセチルトレオ  
408 ニン増加による安全性上の懸念はないと考えられた。

409 DP-098140-6 中の含有量が多く、また非組換えトウモロコシとの差も大きかった *N*-  
410 アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸について、念のためラット 28 日  
411 反復投与試験を行った (参考文献 48、49) その結果、家畜が摂取するこれら *N*-アセチル  
412 アミノ酸の一日最大予想摂取量 (*N*-アセチルアスパラギン酸 : 2.1~25.4 mg/kg、*N*-ア  
413 セチルグルタミン酸 : 0.41~4.96 mg/kg) より高い 1,000mg/kg/日 (最高投与量) にお  
414 いても、被験物質に起因すると考えられる毒性は何ら認められなかった。本結果から、  
415 *N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸の増加による安全性上の懸念  
416 はないと考えられた。

417 なお、参考としてヒトの *N*-アセチルアスパラギン酸が蓄積する疾病として、アスパル  
418 トアシラーゼの遺伝的欠損又は活性低下によるカナバン病 (参考文献 50) があるが、そ

419 の病因としては *N*-アセチルアスパラギン酸の蓄積又はその酵素反応生成物である酢酸レ  
420 ベルの低下が原因という異なる説が報告されている(参考文献 51、52)。念のため家畜の  
421 カナバン病について文献検索を行ったが、カナバン病の症例報告及び家畜とカナバン病  
422 の関連に言及した情報はなかった。

423 遊離アミノ酸組成については、*L*-ヒスチジンと *L*-アルギニン含有量に非組換えトウモロ  
424 コシとの間に統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) が認められたが、その値は、非組換えトウモロ  
425 コシの分析結果に基づく自社商業品種における変動の範囲内であった(参考文献 44)。

426 以上、DP-098140-6 では非組換えトウモロコシに比べ4種の *N*-アセチルアミノ酸量に  
427 自社商業品種における変動の範囲を超える増加が認められたが、DP-098140-6 中のアミノ  
428 酸及び遊離アミノ酸組成は非組換えトウモロコシと同程度であり、これらは種子中のアミ  
429 ノ酸及び遊離アミノ酸組成に影響を与えないことが確認された。

430 次に、茎葉のアミノ酸組成を分析した結果、DP-098140-6 と非組換えトウモロコシとの  
431 間に統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) は認められなかった。

432 なお、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸は、種子中と同様、非  
433 組換えトウモロコシに比べ統計学的有意に ( $P$  値 $<0.05$ ) に増加していた(参考文献 42、  
434 43)。

435 遊離アミノ酸の分析結果において、DP-098140-6 と非組換えトウモロコシとの間に統計  
436 学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) は認められなかった(参考文献 44)。

437

#### 438 ④ミネラル類

439 穀粒のミネラル類について分析した結果、DP-098140-6 と非組換えトウモロコシとの  
440 間で統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) は認められなかった(参考文献 1)。

441

#### 442 ⑤ビタミン類

443 穀粒のビタミン類について分析した結果、ビタミン B1 にだけ非組換えトウモロコシ  
444 との間に統計学的有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) が認められたが、その値は、自社商業品種におけ  
445 る変動の範囲又は文献値の範囲内であった(参考文献 1)。

446

#### 447 ⑥抗栄養素等

448 穀粒の抗栄養素等について、抗栄養素としてフィチン酸、イノシトール、ラフィノー  
449 ス及びトリプシンインヒビター、二次代謝産物としてフルフラール及び *p*-クマル酸とフ  
450 ェルラ酸の分析を行った結果、DP-098140-6 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的  
451 有意差 ( $P$  値 $<0.05$ ) は認められなかった(参考文献 1)。

452

#### 453 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

454 米国、カナダ及び日本で行われた栽培試験において、生存及び増殖能力に関して非組換  
455 えトウモロコシと同等であることが確認されている。

456

#### 457 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

458 DP-098140-6 の生存及び増殖能力は従来のトウモロコシと同等であり、その生存及び増

459 殖能力は従来のトウモロコシと同様の制限を受けると考えられる。

460

461 (8) 不活化法に関する事項

462 上記 DP-098140-6 は従来のトウモロコシと同様に、耕起による土壌中への鋤き込みや、  
463 除草剤グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤以外のトウモロコシが感受性を  
464 示す除草剤の散布によって、不活化することができる。

465

466 (9) 外国における認可等に関する事項

467 米国食品医薬品局 (FDA) より 2008 年 9 月に食品・飼料としての安全性が確認された。  
468 カナダ食品検査庁 (CFIA) へ 2007 年 8 月に飼料としての安全性審査の申請が行われた。  
469 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) へ 2009 年 2 月に食品・飼  
470 料としての安全性審査の申請が行われた。  
471 韓国農村振興庁 (RDA) へ 2008 年 6 月に飼料としての安全性審査の申請が行われた。  
472 アルゼンチンの国立食料農業品質安全サービス (SENASA) へ 2008 年 3 月に食品・飼  
473 料としての安全性審査の申請が行われた。

474

475 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

476 雑草防除に、除草剤グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤が利用可能な点  
477 を除き、DP-098140-6 の栽培方法は従来のトウモロコシと変わらない。

478

479 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

480 DP-098140-6 における種子の製法及び管理方法については、既存のトウモロコシと相違  
481 はない。

482

483 7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次  
484 に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項  
485 該当しない。

486

487 IV 審議結果

488 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性トウモロコシ (DP-098140-  
489 6) について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基  
490 づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

491

492 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 PHASE REPORT TITLE : Amended Nutrient Composition of Maize GAT  
Event DP-098140-6: US and Canada Locations (PHASE REPORT  
NUMBER: PHI-2006-038/020). (社内報告書)
- 2 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. *OECD Environmental, Health and Safety  
Publications* (<http://www.oecd.org/ehs/>). ENV/JM/MONO (2002) 25.
- 3 OECD. 2003. Consensus Document on the Biology of *Zea Mays* Subsp. *Mays*  
(Maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology,

No. 27. *OECD Environmental, Health and Safety Publications*  
(<http://www.oecd.org/ehs/>). ENV/JM/MONO(2003)11.

- 4 農林水産省. 2008. 交雑に関する従来の科学的知見について  
([http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/7kai/pdf/sankou\\_siryou1.pdf](http://www.s.affrc.go.jp/docs/genome/saibaikentoukai/7kai/pdf/sankou_siryou1.pdf)).
- 5 戸澤英夫. 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.
- 6 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用 株式会社 光琳.
- 7 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., and Kumashiro, T. 1996. Vectors  
carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated  
by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from  
selection markers. *Plant J.*, 10: 165-174.
- 8 Zupan, J.R. and Zambryski, P. 1995. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium*  
to the plant cell. *Plant Physiology*, 107: 1041-1047.
- 9 Zupan J.R. and Zambryski, P. 1997. The *Agrobacterium* DNA transfer  
complex. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 16: 279-295.
- 10 日本食品化学研究振興財団. 2005. 既存添加物名簿収載品目リスト.  
(<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/c3f4c591005986d949256fa900252700?OpenDocument>).
- 11 CODEX. 2008. Food Additive Details: Alpha-Amylase (Carbohydrase)  
(*Bacillus licheniformis*) (1100). CODEX General Standard for Food  
Additives (GSFA) Online Database.  
(<http://www.codexalimentarius.net/gsaonline/additives/details.html?id=301>).
- 12 農業技術体系 作物編第7巻 2004. 社団法人 農山漁村文化協会.
- 13 Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. 1992. Maize  
polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and  
transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by  
electroporation. *Plant Mol. Bio.*, 18: 675-689.
- 14 Fang, L.Y., Gross, P.R., Chen, C.-H., and Lillis, M. 1992. Sequence of two  
acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*. *Plant Mol. Bio.*, 18: 1185-  
1187.
- 15 Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J., and Willmitzer, L. 1986. Primary  
structure of a proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.*,  
14: 5641-5650.
- 16 An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., and Ryan,  
C.A. 1989. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato  
Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plant Cell*, 1: 115-122. An,  
G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., and Ryan,  
C.A. 1989. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato  
Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plant Cell*, 1: 115-122.
- 17 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K., and Hirth, L. 1980.  
Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21: 285-294.
- 18 O'Dell, J.T., Nagy, F., and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA  
sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter.  
*Nature*, 313: 810-812.
- 19 STUDY TITLE : Characterization of DP-098140-6 Maize: Detailed Physical  
Map of Insert Region (LABORATORY STUDY ID: PHI-2006-194). (社内報告書)
- 20 STUDY TITLE : Characterization of Maize Event DP-098140-6: Insertion  
Stability, Copy Number, and Backbone Analysis in Two Generations  
(LABORATORY STUDY ID: PHI-2006-100). (社内報告書)
- 21 STUDY TITLE : Sequence Characterization of Inserts and Genomic Border  
Regions of Maize Event DP-098140-6 (LABORATORY STUDY ID: PHI-2006-  
092/041). (社内報告書)

- 22 PHASE REPORT TITLE : Expressed Trait Protein Concentration of a Maize  
GAT Event DP-098140-6: US and Canada Locations (PHASE REPORT  
NUMBER: PHI-2006-038/010). (社内報告書)
- 23 STUDY TITLE : Open Reading Frame Analysis of Novel Junctions within  
Maize Event DP-098140-6 using a 20 Amino Acid Length Cutoff  
(LABORATORY STUDY ID: PHI-2008-251/070). (社内報告書)
- 24 STUDY TITLE : BLASTn/BLASTx Analysis of the Flanking Border  
Sequences Comprising Maize Event DP-098140-6 (LABORATORY STUDY  
ID: PHI-2008-250). (社内報告書)
- 25 環境省. 2007. 生物多様性影響評価書の概要.  
([http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_098140\\_6ap.pdf](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_098140_6ap.pdf)).
- 26 STUDY TITLE : Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the  
GAT4621 Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets (LABORATORY  
STUDY ID: PHI-2007-009). (社内報告書)
- 27 STUDY TITLE : Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the  
ZM-HRA Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets (LABORATORY  
STUDY ID: PHI-2007-011). (社内報告書)
- 28 STUDY TITLE : Equivalency Assessment of the Glyphosate N-  
Acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621) Derived from a Microbial  
Expression System (Lot# PCF-0005) with the GAT4621 Protein Derived from  
Maize Containing Event DP-098140-6 (STUDY NUMBER: PHI-2006-205).  
(社内報告書)
- 29 STUDY TITLE : Equivalency Assessment of the Modified Form of the  
Acetolactate Synthase Enzyme (ZM-HRA Protein) Derived from a Microbial  
Expression System (Lot # PCF-0009) with the ZM-HRA Protein Derived from  
Maize Containing Event DP-098140-6 (STUDY NUMBER: PHI-2006-206).  
(社内報告書)
- 30 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of  
Glyphosate N-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621) using Western Blot  
Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2006-200). (社内報告書)
- 31 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of ZM-  
HRA using Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2006-201). (社  
内報告書)
- 32 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of  
Glyphosate N-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621) (STUDY NUMBER:  
PHI-2006-122). (社内報告書)
- 33 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of  
ZM-HRA (STUDY NUMBER: PHI-2006-123). (社内報告書)
- 34 STUDY TITLE : Characterization of the Effect of Heat Treatment on the  
Immunoreactivity of the Glyphosate N-acetyltransferase 4621(GAT4621)  
Protein using Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2007-131).  
(社内報告書)
- 35 STUDY TITLE : Characterization of the Effect of Heat Treatment on the  
Immunoreactivity of the ZM-HRA Protein using Western Blot Analysis  
(STUDY NUMBER: PHI-2007-130). (社内報告書)
- 36 STUDY TITLE : Characterization of the Thermal Stability of Glyphosate  
Acetyltransferase Enzyme Activity: GAT4621 (STUDY NUMBER: PHI-2006-  
184/018) (社内報告書)
- 37 STUDY TITLE : Characterization of the Thermal Stability of ZM-HRA  
Enzyme Activity (STUDY NUMBER: PHI-2007-089). (社内報告書)
- 38 生化学辞典 第3版. 1998. 監修 今堀和友、山川民夫. 東京化学同人.
- 39 Siehl, D.L., Castle, L.A., Rebecca G. and Keenan, R.J. 2007. The molecular  
basis of glyphosate resistance by an optimized microbial aceryltransferase.  
*J. Biolog. Chem.*, 282: 11446-11455
- 40 Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J.,  
Keenan, R., Liu, D., and Lassner, M.W. 2005. Evolution of a microbial

acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy.  
*Pest Manag. Sci.*, 61: 235-240.

41 GAT4621 タンパク質を用いた基質特異性に関する評価結果 (社内報告書)

42 REPORT TITLE : Analysis of N-Acetyl-L-Glutamate and N-Acetyl-L-Aspartate Levels in Grain of GAT/HRA Maize Event DP-098140-6 (REPORT NUMBER: PHI-2007-016/700). (社内報告書)

43 PHASE REPORT TITLE : Analysis of N-Acetylglycine, N-Acetylserine and N-Acetylthreonine in Grain from Maize Containing GAT Event DP-098140-6 (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2008-052/020). (社内報告書)

44 PHASE REPORT TITLE : Analysis of Free Amino Acids in Forage and Grain of GAT/HRA Maize Event DP-098140-6 (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2007-019/020). (社内報告書)

45 PHASE REPORT TITLE : Total Amino Acid Composition of GAT/HRA Maize Forage Event DP-098140-6 (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2007-006/020). (社内報告書)

46 STUDY TITLE : Thirteen-Week Rat Feeding Study with Maize Grain Containing Event DP-098140-6 (SPONSOR STUDY NUMBER: PHI-2006-176). (社内報告書)

47 REPORT TITLE : Nutritional Equivalency Study of Transgenic Maize Grain Containing Event DP-098140-6: Poultry Feeding Study (SPONSOR STUDY ID: PHI-2006-185). (社内報告書)

48 Delaney, B., Shen, A., Z., Powley, C.R., Gannon, S., Munley S.A., Maxwell C., and Barnett, J.F. Jr. 2008. Acute and repeated dose oral toxicity of N-acetyl-L-aspartic acid in Sprague-Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2023-2034.

49 STUDY TITLE : 28-Day Toxicity Study of N-Acetyl-L-Glutamate Administered by Diet to Sprague-Dawley Rats (Pioneer's Reference No.: PHI-2008-076). (社内報告書)

50 Akimitsu T, Kurisu K, Hanaya R, Iida K, Kiura Y, Arita K, Matsubayashi H, Ishihara K, Kitada K, Serikawa T, and Sasa M. 2000. Epileptic seizures induced by N-acetyl-L-aspartate in rats: in vivo and in vitro studies. *Brain Res* 861:143-150.

51 Madhavarao CN, Arun P, Moffett JR, Szucs S, Surendran S, Matalon R, Garbern J, Hristova D, Johnson A, Jiang W, and Namboodiri MA. 2005. Defective N-acetylaspartate catabolism reduces brain acetate levels and myelin lipid synthesis in Canavan's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5221-5226.

52 Moffett JR, Ross B, Arun P, Madhavarao CN, and Namboodiri MAA. 2007. N-acetylaspartate in the CNS: From neurodiagnostics to neurobiology. *Prog Neurobiol* 81:89-131.