

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

平成 27 年 4 月 23 日付け 27 消安第 516 号をもって諮問された組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認について「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を定める件」（平成 14 年 11 月 26 日付け農林水産省告示第 1780 号）に基づき確認を行った。その結果は次のとおりである。

1. 申請品目

飼料名 : コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 系統
性 質 : コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

2. 経過

平成 27 年 4 月 23 日 諮問
27 年 5 月 22 日 第 15 回遺伝子組換え飼料部会
27 年 11 月 27 日 第 16 回遺伝子組換え飼料部会

3. 遺伝子組換え飼料部会の審議結果

安全性確認（案）のとおり。

参考：飼料に係る食品健康影響評価（畜産物の安全性）

平成 27 年 4 月 23 日 農林水産省より、食品安全委員会に評価依頼し、継続審議中。

**組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認
(案)**

**コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリ
ホサート耐性トウモロコシ MON87411
系統**

**平成 27 年 12 月 22 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容.....	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項.....	4
(1)	遺伝的素材に関する事項.....	4
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項.....	5
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	5
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
3	宿主に関する事項	6
(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.....	6
(2)	遺伝的先祖に関する事項.....	6
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	6
(4)	寄生性及び定着性に関する事項.....	6
(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.....	6
(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.....	6
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項.....	7
(9)	飼料の安全な利用に関する事項.....	7
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項.....	7
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4	ベクターに関する事項.....	7
(1)	名称及び由来に関する事項	7
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	7
(4)	伝達性に関する事項.....	8
(5)	宿主依存性に関する事項.....	8
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	8
(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	8
5	挿入遺伝子に関する事項	8
(1)	供与体に関する事項.....	8
(2)	遺伝子の挿入方法に関する事項.....	9
(3)	構造に関する事項	9
(4)	性質に関する事項	10

（５）純度に関する事項	1 4
（６）コピー数に関する事項	1 4
（７）安定性に関する事項	1 5
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	1 5
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	1 6
（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事項	1 6
6 組換え体に関する事項	1 6
（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	1 6
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	1 6
（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	1 7
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	1 8
（５）宿主との差異に関する事項	1 9
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	2 0
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	2 0
（８）不活化法に関する事項	2 1
（９）外国における認可等に関する事項	2 1
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項	2 1
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項	2 1
7 2 から 6 までの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、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項	2 1
IV 審議結果	2 1
V 参考文献及び参考資料	2 1

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 系統」に係る安全性確認

I はじめに

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 系統（以下「MON87411 トウモロコシ」という。）について、平成 27 年 4 月 14 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「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：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
MON87411 系統

性 質：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company

MON87411 トウモロコシには、コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサートに対する抵抗性を付与するため、ウエスタンコーンルートワーム (*Diabrotica virgifera virgifera*)（以下「WCRW」という。）に由来する *Snf7* 遺伝子（以下「*DvSnf7* 遺伝子」という。）断片（以下「*DvSnf7* 遺伝子断片」という。）、グラム陽性細菌 *Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* 由来の改変 *cry3Bb1* 遺伝子及びグラム陰性細菌 *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。

MON87411 トウモロコシにおいては、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物から形成される dsRNA が、MON87411 トウモロコシを摂取したコウチュウ目害虫に取り込まれた後、RNAi¹ を誘導し、細胞機能の維持に必要不可欠である *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制し、殺虫活性を示すことにより、植物にコウチュウ目害虫への抵抗性を付与する。

また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子によって産生される改変 Cry3Bb1 たん白質は、コウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示すことにより、植物にコウチュウ目害虫への抵抗性を付与する。

さらに、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS たん白質は、除草剤グリホサートによる影響を受けないことから、グリホサート存在下でも芳香族アミノ酸の合成を可能にすることにより、植物にグリホサートに対する耐性を付与する。

MON87411 トウモロコシと非組換えトウモロコシを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。

¹ RNAi (RNA interference, RNA 干渉) は、真核生物における遺伝子発現調節機構の一つ。

概要：①二本鎖 RNA(dsRNA)が Dicer と呼ばれる酵素により切断され、21~26 塩基の siRNA (small interfering RNA)が形成される。②siRNA は RNAi-induced silencing complex (RISC)と結合した後、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する。③RISC により、siRNA と結合した mRNA は分解され、たん白質の産生が阻害される (Siomi and Siomi, 2009)。

RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制効果も高いことから、特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている (Kusaba, 2004)。

そのため、MON87411 トウモロコシに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、MON87411 トウモロコシが飼料として摂取する家畜の健康を損なうおそれはないと考えられた。

なお、トウモロコシは、主に穀粒が飼料に利用される他、青刈りされたもの（サイレージ用）や食品分野及び工業分野から生じる副産物（コーングルテンミール、コーングルテンフィード、コンスチープリカー等）が飼料として利用されている。

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

MON87411 トウモロコシを作出するのに用いた宿主は、イネ科トウモロコシ属 (*Zea*) に属するデント種の非組換えトウモロコシ (*Zea mays* ssp. *mays* L. *Ilitis*) 品種 LH244 である。

MON87411 トウモロコシには、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する WCRW に由来する *DvSnf7* 遺伝子断片が導入されている。*DvSnf7* 遺伝子断片は、MON87411 トウモロコシにおいて転写された後、二本鎖 RNA (dsRNA) を形成するように、WCRW の *Snf7* 遺伝子の部分配列を逆方向反復の形に調整したものである。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、グラム陽性細菌である *Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* 由来である。さらに、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、グラム陰性細菌である *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子によって産生される改変 Cry3Bb1 たん白質は *Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* 由来の野生型 Cry3Bb1 たん白質と比較して、6 か所のアミノ酸が置換されている。そのうち 5 か所は殺虫活性を増強する目的で、残りの 1 か所はクローニングの過程で制限酵素切断部位を付加する目的で改変されている。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS たん白質のアミノ酸配列は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の野生型 CP4 EPSPS たん白質と比較して、クローニングの過程で制限酵素切断部位を付加する目的で N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

MON87411 トウモロコシは、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物から形成される dsRNA が、MON87411 トウモロコシを摂取したコーンルートワーム属種 (*Diabrotica* spp.) (以下「CRW」という。) に取り込まれた後、RNAi が誘導され、*DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制されることで、CRW に対する抵抗性が付与される。また、MON87411 トウモロコシは、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質を発現することにより、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

MON87411 トウモロコシの宿主は、デント種に分類されるトウモロコシであ

り、主に飼料用として利用されている。また、食品としてもコーン油や澱粉等に幅広く利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON87411 トウモロコシ及び非組換えトウモロコシの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である(OECD, 2002、ILSI, 2011、White and Pollak, 1995、参考資料 24)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON87411 トウモロコシは、導入された *DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物によって生じる RNAi により、MON87411 トウモロコシを摂取した CRW の細胞機能の維持に必要な *DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制されることで、CRW に対する抵抗性が付与される。

また、導入された改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子により発現される改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質により、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている。これらの点を除けば、MON87411 トウモロコシは既存のトウモロコシと差異はなく、既存種と比較してア. 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法、イ. 家畜等の摂取（可食）部位、ウ. 家畜等の摂取量、エ. 調製及び加工方法についても変わりはない。

(1) ～ (4) より、MON87411 トウモロコシの飼料としての安全性評価においては、非組換えトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON87411 トウモロコシには、CRW の一種である WCRW の細胞機能の維持に必要な不可欠である *DvSnf7* 遺伝子に由来し、当該遺伝子の一部を逆方向反復の形で導入することによって dsRNA を形成するように調製した *DvSnf7* 遺伝子断片が導入されている。当該 dsRNA は MON87411 トウモロコシの経口摂食を通じて WCRW の細胞内に取り込まれた後、RNAi を誘導し、*DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで殺虫活性を示し、MON87411 トウモロコシにはコウチュウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。また、MON87411 トウモロコシには、改変 Cry3Bb1 たん白質をコードする改変 *cry3Bb1* 遺伝子を発現させることで、コウチュウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

このように、MON87411 トウモロコシに、同じコウチュウ目害虫に対する異なる作用機作の殺虫活性を付与することで、WCRW が抵抗性を獲得するリスクの軽減が期待される。

さらに、MON87411 トウモロコシは、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性が付与され、効果的な雑草防除が可能となる。

3 宿主に関する事項

(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

115 トウモロコシ (*Zea mays* L.) はイネ科トウモロコシ属に属し、子実の形状と粒
質からデントコーン、フリントコーン、スイートコーン、ポップコーン、フラワ
ーコーン、ワキシーコーン、ポッドコーン等に分類される (山田, 2001)。
MON87411 トウモロコシの作出に用いた宿主は、トウモロコシ (*Zea mays* L.) の
デント種 LH244 である。

120

(2) 遺伝的先祖に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は同じ *Zea* 属のテオシントであり、人為的選抜を経
て栽培化したといわれている (OECD, 2003)。原産地は、メキシコ、中米又は南米
等と考えられている (OECD, 2003)。

125

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシの有害生理活性物質について、毒性物質の産生性は知られていな
いが (White and Pollak, 1995)、抗栄養素としてフィチン酸やラフィノースが含ま
れ、穀粒中での含有割合は ILSI のデータベースによるとフィチン酸が 0.111 -
130 1.570% DW、ラフィノースが 0.020 - 0.320% DW である (ILSI, 2011)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシは種子植物であり、それを食する家畜等や他の生物に寄生又は定
着することはない。

135

(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

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 (Smith and White, 1988)、これら病原菌のヒトへの病原性は知られていない。

140

(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

トウモロコシは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

145 トウモロコシ (*Z. mays*, $2n=20$) は種子繁殖する一年生のイネ科作物である。
98~99%が他家受粉であり、受粉は風媒によって行われる。品種や地域によって栽
培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される (瀧澤, 2001)。

150 トウモロコシの近縁植物として、テオシント (*Z. mexicana*, $2n=20$) とトリプ
サカム属 (*Tripsacum* spp., $2n=36$) がある。自然条件下や人工交配でテオシント
がトウモロコシと容易に交雑するのに比べ、トリプサカム属では自然条件下と人
工交配のいずれの場合も特殊な条件が必要であり、トウモロコシとの交雑は困難
である。なお、テオシントはメキシコとグアテマラの溪谷及びメキシコ高地に自
然分布しているが (Wilkes, 1972)、トウモロコシの主な栽培地域である米国のコ

ーン・ベルト地帯並びにヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア及び日本を含むアジアには自生していないので、トウモロコシとの交雑の可能性はない。

155

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

デント種のトウモロコシは、主に飼料として利用されてきた。また、食品分野や工業分野においても幅広く利用されている（菊池, 1987、農林水産省, 2014、財務省, 2014）。

160

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

165

トウモロコシは長い間栽培植物として利用されてきた過程で、自然条件下における自生能力を失っており、その種子を分散させるためには人間の仲介が必要である（OECD, 2003）。種子の休眠性は知られていない。また、収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、土壤温度が 10℃に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する（菊池, 1987、中村, 2001）。また、トウモロコシは仮に発芽しても、生長点が地上に出た後、6~8 時間以上 0℃以下の外気にさらされると生存できない（OECD, 2003）。

170

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

175

トウモロコシの近縁種であるテオシント及びトリプサクム属種においても、トウモロコシと同じ有害生理活性物質が含まれているが、有害となる程度の産生性は知られていない。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

180

MON87411 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PV - ZMIR10871 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 等を基に作成された。

(2) 性質に関する事項

185

導入用プラスミド PV-ZMIR10871 の塩基数は 16,497 bp である。また、導入用プラスミド PV - ZMIR10871 の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており(参考資料 1)、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

190

導入用プラスミド PV-ZMIR10871 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耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (AAD) の細菌プロモータ

ー及びコード領域である *aadA* 遺伝子(Fling *et al.*, 1985)が含まれており、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中の選抜マーカーとして用いられた。

195

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR10871 は伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

200

(5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR10871 には、プラスミド pBR322 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* 及び広宿主域プラスミド RK2 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *oriV* が組み込まれているが、導入用プラスミド PV-ZMIR10871 が植物や家畜等で増殖することはできない。

205

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR10871 は、dsRNA を形成する *DvSnf7* 遺伝子断片を発現する *DvSnf7* 遺伝子発現抑制カセット、改変 *Cry3Bb1* たん白質を発現する改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセット及び改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域を有している。

210

(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

MON87411 トウモロコシは、*DvSnf7* 遺伝子発現抑制カセット、改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚に導入することで作出された。さらに、T-DNA 領域には、導入を促すための右側境界領域と左側境界領域を有している。

215

5 挿入遺伝子に関する事項

220

(1) 供与体に関する事項

①名称、由来及び分類に関する事項

MON87411 トウモロコシに導入された *DvSnf7* 遺伝子断片は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する WCRW に由来する。また、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、それぞれ土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* 及びグラム陰性菌である *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

225

②安全性に関する事項

WCRW、*B. thuringiensis* ssp. *Kumamotoensis* 及び *Agrobacterium* sp. CP4 株について、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

230

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

非組換えトウモロコシ品種 LH244 の未成熟胚を導入用プラスミド PV - ZMIR10871 を含むアグロバクテリウムと共置培養することにより形質転換を行った後、未成熟胚をグリホサート及びカルベニシリンを添加した組織培養培地に移すことにより、グリホサートによって形質転換されていない植物細胞の生育を阻害し、カルベニシリンによって形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。その後、選抜された細胞から植物体を再分化させ、目的とする表現型を示す個体を選抜し、生育させた。

再分化個体 (R_0) を自家受粉させることで得られた個体から、定量 PCR 分析により T-DNA 領域をホモで有することが確認された個体を選抜し、形態特性及び導入遺伝子解析の結果に基づき、最終的な商品化系統として MON87411 トウモロコシを選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

DvSnf7 遺伝子発現抑制カセットは、*e35S* プロモーターによりその発現が制御されている。*e35S* プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の *35S* RNA のプロモーター (Odell *et al.*, 1985) で、2 重のエンハンサー領域を含み (Kay *et al.*, 1987)、植物細胞内で転写を誘導する。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットは、*pIIG* プロモーターによりその発現が制御されている。*pIIG* プロモーターはトウモロコシ (*Z. mays*) の物理的インピーダンス誘導たん白質をコードする *pIIG* 遺伝子配列のプロモーター由来で (Huang *et al.*, 1998)、植物細胞内で転写を誘導する。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは、*TubA* プロモーターによりその発現が制御されている。*TubA* プロモーターはイネ (*Oryza. sativa*) の α チューブリンをコードしている *OsTubA* 遺伝子ファミリーの 5' 末端非翻訳プロモーター由来で (Qin *et al.*, 1997、Jeon *et al.*, 2000)、植物細胞内で転写を誘導する。

② ターミネーターに関する事項

DvSnf7 遺伝子発現抑制カセットのターミネーターは、エンドウ (*Pisum sativum*) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする *RbcS2* 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域 (Coruzzi *et al.*, 1984) であり、転写を終結させ、mRNA のポリアデニル化を誘導する。

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ (*Triticum aestivum*) の熱ショックたん白質 17 の 3' 末端非翻訳領域 (McElwain and Spiker, 1989) であり、転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、イネ (*O. sativa*) の α チューブリンをコードしている *OsTubA* 遺伝子ファミリーの 3' 末端非翻訳領域 (Qin *et al.*, 1997、Jeon *et al.*, 2000) であり、転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

275

- 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 - ZMIR10871 の各構成要素の機能は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

280

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV - ZMIR10871 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*DvSnf7* 遺伝子断片、改変 *cry3Bb1* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由 来 及 び 機 能
<i>DvSnf7</i> 遺伝子発現抑制カセット	
<i>E9</i> ターミネーター	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブ羅斯-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。
<i>DvSnf7</i> 遺伝子断片	ウエスタンコーンルートワーム (<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>) の ESCRT III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットをコードする <i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列が逆方向反復の形に調整されたもの (Babst <i>et al.</i> , 2002、Baum <i>et al.</i> , 2007、Baum <i>et al.</i> , 2011)。当該遺伝子断片の転写産物は dsRNA を形成するため、MON87411 トウモロコシを摂取したコーンルートワーム属種(CRW)の細胞内において RNAi を誘導し、CRW の細胞機能の維持に必要な <i>DvSnf7</i> 遺伝子の発現を抑制する。
<i>Hsp70</i> イントロン配列	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>) の熱ショックたん白質遺伝子 (<i>hsp70</i>) の 1 番目のイントロンとその近傍エクソンの一部 (Rochester <i>et al.</i> , 1986)。目的遺伝子の発現箇所での発現活性を高める (Brown and Santino, 1997)。
<i>e35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の <i>35S</i> RNA のプロモーター (Odell <i>et al.</i> , 1985)。2 重のエンハンサー領域 (Kay <i>et al.</i> , 1987) を有しており、植物細胞における転写を誘導する。
改変 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>pIIG</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の物理的インピーダンス誘導たん白質をコードする <i>pIIG</i> 遺伝子配列のプロモーター領域 (Huang <i>et al.</i> , 1998)。植物細胞における転写を誘導する。
<i>Cab</i> リーダー配列	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) の葉緑素 a/b 結合たん白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる (Lamppa <i>et al.</i> , 1985)。
<i>Ract1</i> イントロン配列	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のアクチン遺伝子のイントロン (McElroy <i>et al.</i> , 1990)。目的の遺伝子の発現の制御に関わる。
改変 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の <i>Cry3Bb1</i> たん白質をコードする遺伝子 (English <i>et al.</i> , 2000)

<i>Hsp17</i> ターミ ネーター	コムギ (<i>T. aestivum</i>) の熱ショックたん白質 17 の 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (McElwain and Spiker, 1989)。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
<i>TubA</i> プロモー ター	イネ (<i>O. sativa</i>) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター、5'末端非翻訳リーダー及びイントロンの配列 (Qin <i>et al.</i> , 1997、Jeon <i>et al.</i> , 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
<i>CTP2</i> ターゲテ ィング配列	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987、Herrmann, 1995)。改変 CP4 EPSPS たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996、Barry, <i>et al.</i> , 2001)。
<i>TubA</i> ターミネ ーター	イネ (<i>O. sativa</i>) の α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーの 3'末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Qin <i>et al.</i> , 1997、Jeon <i>et al.</i> , 2000)。

285

① *DvSnf7* 遺伝子断片の機能

一般的に真核生物の細胞では、オートファジー経路が存在し、不要になった細胞小器官やたん白質の細胞内での輸送、選別及び分解を行うこと等により細胞恒常性を維持している (Fader and Colombo, 2009)。

290

オートファジー経路は、複数の種類に分類されるが、エンドソーム系のオートファジー経路（以下単に「オートファジー経路」という。）については、ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) 複合体 (ESCRT-0、I、II 及び III) の働きが必要であり、SNF7 たん白質は、ESCRT -III 複合体の構成たん白質である (Teis *et al.*, 2008、Vaccari *et al.*, 2009、Kim *et al.*, 2011)。

295

また、細胞膜中の受容体たん白質が関わる真核生物の細胞内のシグナル伝達のいくつかでは、オートファジー経路が、受容体たん白質等をリソソームで分解するか否かの選別に関与していることが報告されている (Ramaseshadri *et al.*, 2013)。

300

MON87411 トウモロコシでは、*DvSnf7* 遺伝子断片が導入されており、その転写産物により dsRNA が形成される (参考資料 2)。この dsRNA は、MON87411 トウモロコシを摂食する CRW の中腸細胞内に取り込まれた後、RNAi を誘導し、CRW の内在性 *Snf7* 遺伝子の発現を抑制する (図 1)。その結果、MON87411 トウモロコシを摂取した CRW の細胞中では、オートファジー経路により、細胞内に取り込まれ、輸送された受容体たん白質を選別・分解することができなくなり (図 2)、これらが蓄積することで、細胞恒常性が損なわれるため、MON87411 トウモロコシは CRW に対する殺虫活性を有する。

305

さらに、経口摂取された dsRNA は、WCRW の中腸細胞だけでなくその他の体組織でも *DvSnf7* 遺伝子の発現抑制を誘導する現象が観察されている (Bolognesi *et al.*, 2012)。このように細胞が細胞外から RNA を取り込み、取り込んだ RNA を近隣の細

胞へと拡散する全身への伝搬 (systemic spread) と呼ばれる現象が存在することが以前から知られ(Huvenne and Smagghe, 2010)、コウチュウ目、チョウ目、ハエ目及びバッタ目の昆虫で dsRNA の経口摂取や細胞内への注入により全身への伝搬が報告されている (Bucher *et al.*, 2002、Tomoyasu and Denell, 2004、Dong and Friedrich, 2005、Turner *et al.*, 2006、Tian *et al.*, 2009、Alves *et al.*, 2010、Li *et al.*, 2011)。しかしながら、昆虫における dsRNA の取り込み及び全身への伝搬のメカニズムは解明されていない (Bolognesi *et al.*, 2012)。

DvSnf7 遺伝子断片に由来する dsRNA の標的昆虫に対する特異性を確認するため、コウチュウ目、チョウ目、ハチ目及びカメムシ目の 4 目 10 科で代表的な昆虫 14 種 (うちコウチュウ目は 4 科に属する 7 種) を用いて、当該 dsRNA の混餌投与による生物検定を行った。その結果、当該 dsRNA による成長、発育及び生存への影響は、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科 (Galerucinae) に属する WCRW 及びサザンコーンルートワーム (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) (以下「SCRW」とする。) に対してのみ活性を示すことが確認された。さらに、WCRW に系統学的に近縁の昆虫 9 種について、*Snf7* 遺伝子中の *DvSnf7* 遺伝子断片に相当する配列の相同性を確認した結果、WCRW と系統学的に離れるほど、相同性は低下し、*DvSnf7* 遺伝子断片に由来する dsRNA が RNAi を誘導するのに必要な連続した 21 塩基以上の配列の相同性 (Bolognesi *et al.*, 2012、Bachman *et al.*, 2013) は、ヒゲナガハムシ亜科の昆虫に限定することが確認された (Bachman *et al.*, 2013)。

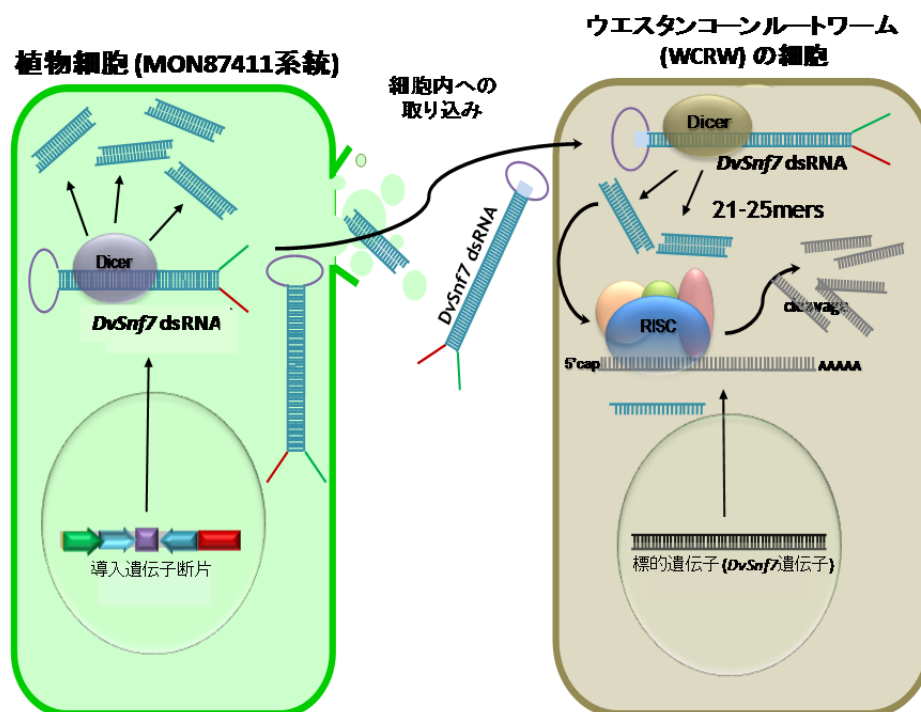


図1 経口摂取された dsRNA による CRW の中腸細胞中での遺伝子発現の抑制 (模式図)

A. 通常の WCRW の細胞

B. *DvSnf7* 遺伝子の発現が抑制された WCRW の細胞

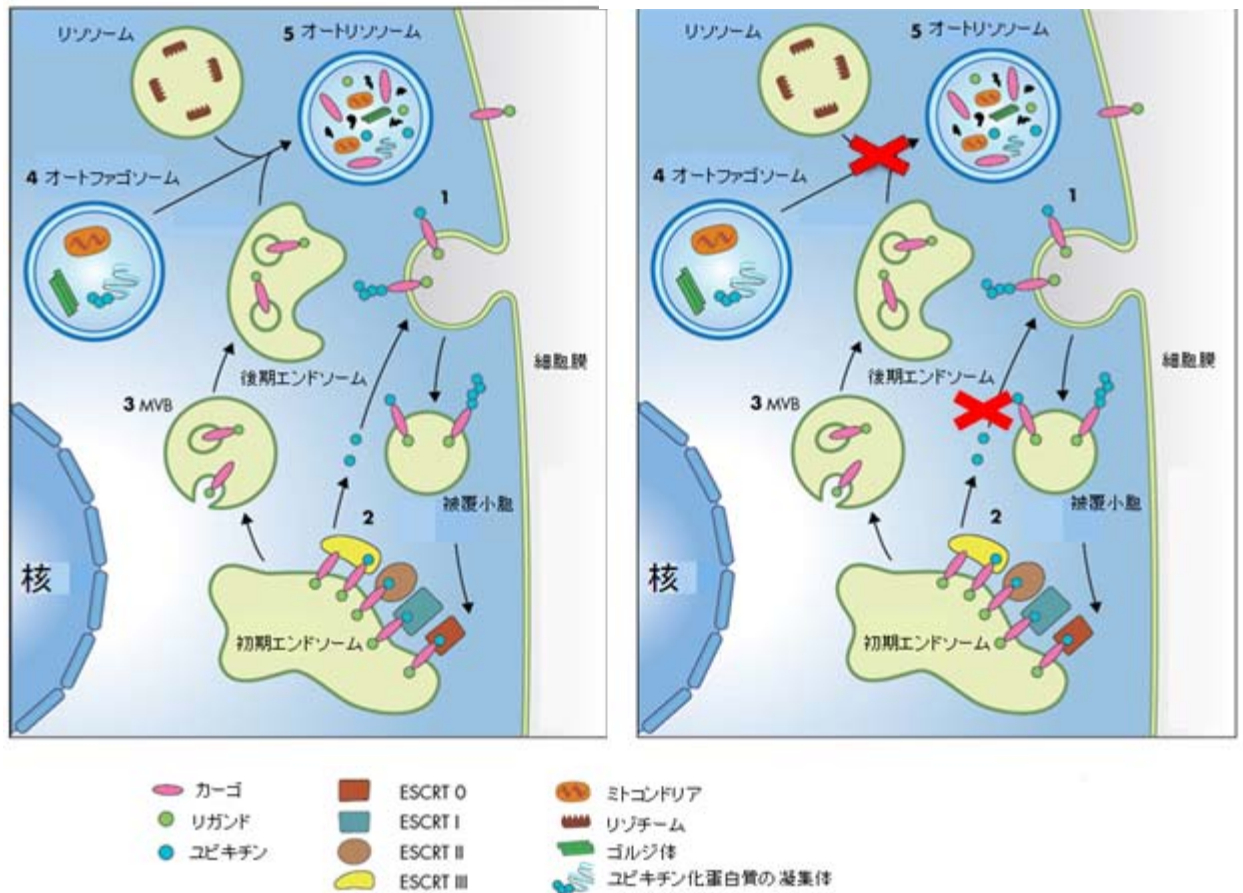


図 2 通常の昆虫細胞（左）及び *Snf7* 遺伝子の発現が抑制された WCRW の細胞（右）におけるオートファジー経路 (Ramaseshadri *et al.*, 2013)

1. 細胞膜上でユビキチンが結合したたん白質（ユビキチン化たん白質）のエンドサイトーシスが
340 起こり、被膜小胞によりそれらのたん白質は初期エンドソームへと輸送される (Raiborg
and Stenmark, 2009)。
2. 初期エンドソームで、ユビキチン化たん白質は ESCRT 経路 (ESCRT-0、I、II 及び III 複合
体) を経ることにより脱ユビキチン化が行われ、遊離したユビキチンは再び細胞膜中のたん
白質へと運ばれる (Raiborg and Stenmark, 2009)。
3. 脱ユビキチン化されたたん白質を内包する初期エンドソームの一部が出芽し、多小胞体
345 (MVB) となり、続いて後期エンドソームを形成する (Fader and Colombo, 2009)。この後、
後期エンドソームがリソソームと融合した場合はリソソームでの分解が行われる。
4. 昆虫細胞内には細胞小器官又は不要になったたん白質などを内包する自食作用胞（オートフ
アゴソーム）が形成されている。
5. 後期エンドソーム、リソソーム及びオートファゴソームの 3 つが融合することでオートファ
350 ジーを誘導する。なお、オートファジーは細胞が飢餓の状態の場合に起こりやすい (Fader
and Colombo, 2009)。

② 改変 *cry3Bb1* 遺伝子の機能

355 MON87411 トウモロコシに導入された改変 *cry3Bb1* 遺伝子から発現される改変
Cry3Bb1 たん白質は特定のコウチュウ目昆虫に対する抵抗性を有する。改変
Cry3Bb1 たん白質は 3 つのドメインで構成される Cry たん白質ファミリーに分類さ
れる (Crickmore, 2012)。Cry たん白質は、標的とする昆虫の体内において、前駆体
360 たん白質からたん白質分解酵素により活性を持つ毒素へと変換され、昆虫の中腸上皮
上の特異的受容体に結合することで中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、
昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示すと考えられている (Vachon *et al.*, 2012、
Bravo *et al.*, 2007)。

③ 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能

365 除草剤グリホサートは植物細胞内の芳香族アミノ酸の生合成経路中の 5-エノールピ
ルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) と結合し、その活性を阻害する
(Steinrücken and Amrhein, 1980、Haslam, 1993))。その結果、植物は必須の芳香族
アミノ酸を合成できなくなり枯死する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって発現する改変
CP4 EPSPS たん白質は、EPSPS と比較して機能的には同一であるが、グリホサート
370 存在下でも活性阻害を受けないため、同遺伝子が導入された MON87411 トウモロコ
シは、シキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。

(5) 純度に関する事項

375 塩基配列解析により、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の T-DNA 領域に目的
外の遺伝子の混入がないことが確認されている (参考資料 1)。

(6) コピー数に関する事項

380 MON87411 トウモロコシに導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数及び外側
骨格配列の有無を確認するため、次世代シーケンス技術² 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: NGS²/JSA³) を行った結果、MON87411 トウモロコシ中の導入用プラス
ミド PV - ZMIR10871 の T-DNA 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されて
いること及び導入用プラスミド PV - ZMIR10871 の外側骨格配列が存在しないこ
とが確認された (参考資料 5)。

385 また、挿入 DNA とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、挿入 DNA 及び

² 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列を解読できる。

³ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いた分子生物学的評価の手法である。NGS/JSA では、まず、NGS により MON87411 系統のゲノムの全領域に相当する配列を 100 bp 程度のフラグメントとして増幅し、その塩基配列を解析する。次に、これらのフラグメントの情報を用いて、JSA によって T-DNA 領域と宿主の内在性配列との接合領域を特定することで、T-DNA 領域の挿入箇所及びコピー数並びに意図しない配列の挿入の有無を決定できる (Kovalic *et al.*, 2012)。

近傍領域の塩基配列解析を行った。その塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列が PV - ZMIR10871 中の対応する塩基配列と同一であるか確認した。その結果、MON87411 トウモロコシ中の挿入 DNA と、導入用プラスミド PV - ZMIR10871 の T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された(参考資料 5)。

さらに、MON87411 トウモロコシにおいて、挿入 DNA が既知内在性の遺伝子を破壊しているかについて確認するため、DNA の挿入部位を対照の非組換えトウモロコシ中の塩基配列と比較した結果、MON87411 トウモロコシの導入遺伝子の挿入部位においてトウモロコシゲノム内在性配列に 118bp の欠損が認められた。しかし、近傍配列の BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、挿入 DNA の導入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた(参考資料 6)。

(7) 安定性に関する事項

MON87411 トウモロコシ中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON87411 トウモロコシから得られたゲノム DNA を用いて、NGS/JSA を実施したところ、各遺伝子発現及び遺伝子発現抑制カセットを持つ T-DNA 領域が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された(参考資料 5)。

また、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質の発現の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON87411 トウモロコシの組織サンプルを用いて、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物のノーザンブロット分析、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質のウェスタンブロット分析を実施したところ、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質が複数世代にわたり安定して発現していることが確認された(参考資料 7,8)。

さらに、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MON87411 トウモロコシを用いて PCR 分析により T-DNA 領域の有無を確認した結果、3 世代における MON87411 トウモロコシにおける分離比の観測値と期待値との間に、統計学的な有意差は認められなかったことから、MON87411 トウモロコシ中の T-DNA 領域はメンデルの法則に従って後代に遺伝していると考えられた(参考資料 9)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

アルゼンチンの 5 か所のほ場から採取された MON87411 トウモロコシの組織を供試し、MON87411 トウモロコシにおける *DvSnf7* 遺伝子断片の発現量を QuantiGene アッセイにより、また、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を ELISA 分析によりそれぞれ測定した(参考資料 10,11)。その結果、すべての組織サンプル(葉、穀粒、花粉、絹糸、黄熟期の地上部、茎葉、根、黄熟期の根、収穫直後の根及び地上部)から *DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物、改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質が検出された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV - ZMIR10871 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチ
430 ジルトランスフェラーゼ (AAD) をコードしている *aadA* 遺伝子が、*E. coli* 及びア
グロバクテリウム中の選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している (Fling, *et*
al., 1985)。なお、MON87411 トウモロコシ中に *aadA* 遺伝子が導入されていない
ことは、NGS/JSA により確認されている (参考資料 5)。

435 (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 に関する事項

MON87411 トウモロコシの導入遺伝子とその両末端近傍配列の境界領域につい
て、ストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンまでの配列を 6 フ
レーム全てについて検索し、さらにその配列の中から、トウモロコシ内在性配列
440 から MON87411 トウモロコシ中の導入遺伝子にかけて存在し、かつ、8 アミノ酸
以上の ORF を持つ配列を検索した (参考資料 12)。その結果、8 個の ORF が確認
されたが、それらについて、既知の毒性たん白質等との相同性検索を行った結果、
相同性は認められなかった。

また、MON87411 トウモロコシ中の挿入 DNA において、目的以外の新規たん
445 白質が産生される可能性を検討するため、FASTA アルゴリズムにより既知の毒性
たん白質等との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった (参考資料
13)。

6 組換え体に関する事項

450 (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

MON87411 トウモロコシへ導入された *DvSnf7* 遺伝子断片は、CRW に対して
殺虫活性を示す *DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物から形成される dsRNA により、
RNAi が誘導されることで CRW に対する抵抗性を付与する。また、改変
Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質を発現することにより、コウチ
455 ュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。こ
れらの点を除けば、MON87411 トウモロコシは非組換えトウモロコシとその形態
及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わら
ない。

460 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① *DvSnf7* 遺伝子断片

MON87411 トウモロコシに導入された *DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物から形成
される dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため、新たなたん白質
が産生されることは考えにくい (Kozak, 1989、Hinnebusch, 2011)。

脊椎動物において、一般的に、経口摂取された RNA は、唾液、胃液、腸液等の
消化液中や血液に含まれる核酸分解酵素等によって分解されると考えられる
465 (Petrick *et al.*, 2013、Park *et al.*, 2006、Loretz *et al.*, 2006、Akhtar, 2009、

O'Neill *et al.*, 2011、Houck, 1958)。仮に消化液や血清中で分解されなかったとしても、一般的に、RNA のような分子量が大きく、親水性の物質は、腸上皮組織の細胞膜を通過することはできず、経口摂取された RNA による RNAi 誘導を妨げる物理的な障壁となっていると考えられる(Sioud, 2005、Akhtar, 2009、O'Neill *et al.*, 2011)。また、哺乳動物において、乳中に存在する RNA が、エクソソームに内包されることで分解から保護され、細胞内に取り込まれる可能性についていくつか研究報告があるが(Baier *et al.*, 2014、Laubier *et al.*, 2015、Title *et al.*, 2015)、植物において RNA がエクソソーム等の小胞に内包されるという報告はない。念のため、MON87411 トウモロコシを摂取した家畜等への影響を検討するため、ラットを用いた MON87411 トウモロコシの 90 日間反復投与（混餌）毒性試験及びマウスを用いた *Dvsnf7* 遺伝子断片の転写産物の 28 日間反復投与（強制経口）毒性試験を実施した結果、MON87411 トウモロコシ及び *Dvsnf7* 遺伝子断片の転写産物の投与による体重、臓器重量及び臨床病理学的検査（血液学的検査、尿検査等）等に対する影響は確認されなかった（参考資料 14,15）。

したがって、MON87411 トウモロコシの経口摂取により、*DvSnf7* 遺伝子断片に由来する dsRNA が、家畜等の内在性遺伝子の発現を抑制することはないと考えられた。

②改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質

MON87411 トウモロコシに導入された改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質が既知の毒性たん白質等と相同性を有するか確認するために、TOX_2013 データベースを用いて FASTA 型アルゴリズムにより相同性検索を行った。その結果、既知の毒性たん白質等との間に相同性は認められなかった（参考資料 3）。

（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

E. coli で大量発現させた改変 Cry3Bb1 たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質を用いて、以下アからウについて検討を行った。なお、*E. coli* から調製した両たん白質と MON87411 トウモロコシ中で発現する両たん白質の同等性に関しては、免疫反応性（ウェスタンブロット分析）、分子量(SDS-PAGE 分析)、グリコシル化状態及び機能活性により確認している（参考資料 16,17）。

DvSnf7 遺伝子断片については、たん白質に翻訳されているとは考えにくいため、本項に関する検討は必要ないと判断された。

① 改変 Cry3Bb1 たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

改変 Cry3Bb1 たん白質の人工胃液（SGF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウェスタンブロット分析により検討した結果、それぞれにおいて、人工胃液中での試験開始 15 秒後には消化されることが確認された（参考資料 18）。

- イ 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
510 改変 Cry3Bb1 たん白質の人工腸液（SIF）中での消化性について、ウェスタンブロット分析により検討した結果、人工腸液中での試験開始 1 分後には完全長の改変 Cry3Bb1 たん白質は消化され分解産物となったが、その分解産物は 24 時間後においても消化されないことが確認された(参考資料 18)。
- ウ 加熱処理
515 改変 Cry3Bb1 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討した結果、15 及び 30 分間の条件下では 75℃以上の加熱処理により免疫応答性を失うことが確認された（参考資料 21)。
- ② 改変 CP4 EPSPS たん白質
ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理
520 改変 CP4 EPSPS たん白質の人工胃液（SGF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウェスタンブロット分析により検討した結果、それぞれにおいて、人工胃液中での試験開始 15 秒後には消化されることが確認された（参考資料 19)。
525
- イ 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
530 改変 CP4 EPSPS たん白質の人工腸液（SIF）中での消化性について、ウェスタンブロット分析により検討した結果、人工腸液中での試験開始 32 分後には消化されることが確認された（参考資料 20)。
- ウ 加熱処理
535 改変 CP4 EPSPS たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討した結果、15 及び 30 分間の条件下では 75℃以上の加熱処理により免疫応答性を失うことが確認された(参考資料 22)。

（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① *DvSnf7* 遺伝子断片

- 540 *DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物から形成される dsRNA が、コウチュウ目の標的昆虫に対して RNAi を誘導するには、連続した 21 塩基以上の配列の相同性が必要であり、系統学的に遠縁になればなるほど、*Snf7* 遺伝子の相同性は低下するため、*DvSnf7* 遺伝子断片と 21 塩基以上の配列の相同性を持つ *Snf7* 遺伝子を持つ昆虫はハムシ科ヒゲナガハムシ亜科の一部に限定され、実際に、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物による dsRNA がハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する一部の昆虫種に対して特異的に殺虫活性を示すことが確認されている。
545

さらに、宿主であるトウモロコシの内在性遺伝子の発現を非意図的に抑制する可能性を確認するために、*DvSnf7* 遺伝子断片の配列(240 塩基)について、トウモロコシの転写産物データベースを用いて、FASTA アルゴリズムにより遺伝子発現抑制に必要な 21 塩基以上の長さで一致する配列が存在するか相同性の検索を行っ

550 た。その結果、*DvSnf7* 遺伝子断片の配列と 21 塩基長で一致する配列は存在しないことが確認されたことから(参考資料 23)、トウモロコシの内在性遺伝子の発現を非意図的に抑制する可能性は低いと考えられる。

また、一般に、dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため(Kozak, 1989、Hinnebusch, 2011)、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物による dsRNA が新たなたん白質を発現する可能性は低いと考えられる。

555 これらのことから、*DvSnf7* 遺伝子断片の転写産物が、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

② 改変 Cry3Bb1 たん白質

560 Cry たん白質は、標的とする昆虫体内で毒素へと変換され、殺虫活性を示すたん白質であり、酵素活性を有するとの報告はないことから、改変 Cry3Bb1 たん白質が発現することによって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性はないと考えられた。

565 ③ 改変 CP4 EPSPS たん白質

EPSPS は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の 1 つであり、植物の葉緑体又は色素体に存在する (della-Cioppa *et al.*, 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である (Haslam, 1974、Haslam, 1993)。一方、570 EPSPS はシキミ酸経路における律速酵素ではないことが示唆されており(Weiss and Edwards, 1980、Herrmann and Somerville, 1983)、EPSPS 活性が増大しても、芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている (Smart *et al.*, 1985)。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (S3P) から、EPSP と無機リン酸塩 (Pi) を生じる可逆反応を触媒する酵素であり(Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys *et al.*, 1992)。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えにくい。

575 したがって、内在性の EPSPS と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS たん白質が発現することによって、植物の代謝経路に何らかの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

585 MON87411 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの構成成分の同等性を評価するため、アルゼンチンの 8 か所のほ場において栽培した MON87411 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの地上部及び穀粒について、①主要構成成分、②脂肪酸、③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミン及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 24)。また、各ほ場 3~4 品種ずつ合計 20 品種の非組換えの自社商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。MON87411 トウモロコシへの除草剤散布については、2 葉期頃から 4 葉期頃にかけて、グリホサート

590

(約 0.95 kg a.i./ha)を散布した。

①主要構成成分

595

地上部及び穀粒中の粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)及び総食物繊維（穀粒のみ）について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

②脂肪酸

600

穀粒中の各脂肪酸について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

③アミノ酸

605

穀粒中の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

④ミネラル

610

地上部及び穀粒中の各ミネラルについて分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えトウモロコシ品種又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

⑤ビタミン

615

穀粒中の各ビタミンについて分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えトウモロコシ品種と同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

⑥有害生理活性物質

620

穀粒中の有害生理活性物質（フィチン酸及びラフィノース）及びその他の成分（フェルラ酸及び *p*-クマル酸）について分析した結果、いずれの有害生理活性物質及びその他の成分も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等であった。

（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項

625

2010 年から 2014 年までの間に米国を中心として延べ 1,520 か所で行われたほ場試験において、MON87411 トウモロコシの生存及び増殖能力は非組換えトウモロコシと相違ないことが確認されている。

（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項

630

MON87411 トウモロコシの生存・増殖能力は非組換えトウモロコシと相違ない

ことが確認されている。

(8) 不活化法に関する事項

635 MON87411 トウモロコシは、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の使用)等のトウモロコシを枯死させる従来の方法で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

640 2014 年 10 月に米国食品医薬局 (FDA) での食品・飼料としての安全性確認が終了した。

2015 年 2 月に欧州食品安全機関 (EFSA)に食品、飼料及び輸入のための安全性確認の申請を行った。

2015 年 8 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ)での食品としての安全性確認が終了した。

645 2015 年 10 月にカナダ保健省 (Health Canada) での食品としての、また、カナダ食品検査庁 (CFIA) での環境・飼料としての安全性確認が終了した。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

650 商業栽培において、MON87411 トウモロコシと非組換えトウモロコシ品種の違いは、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グリホサートに対する耐性を持つということのみである。したがって、MON87411 トウモロコシでは生育期に雑草防除のために除草剤グリホサートを使用できることを除いて、栽培方法は非組換えトウモロコシとの相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

655 MON87411 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は非組換えトウモロコシとの相違はない。

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、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

660 該当しない。

IV 審議結果

665 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87411 系統について、「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」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Akhtar, S. 2009. Oral delivery of siRNA and antisense oligonucleotides. Journal of Drug Targeting 17: 491-495.

- 2 Alves, A.P., M.D. Lorenzen, R.W. Beeman, J.E. Foster and B.D. Siegfried. 2010. RNA interference as a method for target-site screening in the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. Journal of Insect Science 10: 1-16.
- 3 Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. Developmental Cell 3: 271-282.
- 4 Bachman, P.M., R. Bolognesi, W.J. Moar, G.M. Mueller, M.S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J.P. Uffman, J. Warren, B.E. Wiggins and S.L. Levine. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). Transgenic Research 22: 1207-1222.
- 5 Baier, S.R., C. Nguyen, F. Xie, J.R. Wood and J. Zemleni. 2014. MicroRNAs are absorbed in biologically meaningful amounts from nutritionally relevant doses of cow milk and affect gene expression in peripheral blood mononuclear cells, HEK-293 kidney cell cultures, and mouse livers. Journal of Nutrition 144: 1495-1500.
- 6 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 7 Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. Nature Biotechnology 25: 1322-1326.
- 8 Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2011. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 7,943,819 B2, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 9 Bolognesi, R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J.G. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G. Heck and G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). PLoS ONE 7: e47534.
- 10 Bravo, A., S.S. Gill and M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon 49: 423-435.
- 11 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 12 Bucher, G., J. Scholten and M. Klingler. 2002. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). Current Biology 12: R85-R86.
- 13 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. The EMBO Journal 3: 1671-1679.
- 14 Crickmore, N. 2012. List of *Bacillus thuringiensis* holotype toxins. University of Sussex, Sussex, United Kingdom.
http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/holo2.html

[Accessed June 26, 2013].

- 15 Dong, Y. and M. Friedrich. 2005. Nymphal RNAi: Systemic RNAi mediated gene knockdown in juvenile grasshopper. *BMC Biotechnology* 5: 25.
- 16 English, L.H., S.M. Brussock, T.M. Malvar, J.W. Bryson, C.A. Kulesza, F.S. Walters, S.L. Slatin, M.A. Von Tersch and C. Romano. 2000. Nucleic acid segments encoding modified *Bacillus thuringiensis* coleopteran-toxic crystal proteins. Patent 6,060,594, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 17 Fader, C.M. and M.I. Colombo. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. *Cell Death and Differentiation* 16: 70-78.
- 18 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 19 Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 20 Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in *The Shikimate Pathway*. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- 21 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-16 in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
- 22 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 23 Hinnebusch, A.G. 2011. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 75: 434-467
- 24 Houck, J.C. 1958. The microdetermination of ribonuclease. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 73: 384-390.
- 25 Huang, Y.-F., W.R. Jordan, R.A. Wing and P.W. Morgan. 1998. Gene expression induced by physical impedance in maize roots. *Plant Molecular Biology* 37: 921-930.
- 26 Huvenne, H. and G. Smaghe. 2010. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. *Journal of Insect Physiology* 56: 227-235.
- 27 ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/>.
- 28 Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123: 1005-1014.
- 29 Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
- 30 Kim, D.-W., H. Sung, D. Shin, H. Shen, J. Ahnn, S.-K. Lee and S. Lee. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and Cells* 31: 585-592.
- 31 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and

- manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- 32 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
 - 33 Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
 - 34 Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139-143.
 - 35 Lamppa, 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.
 - 36 Laubier, J., J. Castille, S. Le Guillou and F. Le Provost. 2015. No effect of an elevated miR-30b level in mouse milk on its level in pup tissues. *RNA Biology* 12: 26-29.
 - 37 Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 239: 1142-1150.
 - 38 Li, X., M. Zhang and H. Zhang. 2011. RNA interference of four genes in adult *Bactrocera dorsalis* by feeding their dsRNAs. *PLoS ONE* 6: e17788.
 - 39 Loretz, B., F. Föger, M. Werle and A. Bernkop-Schnürch. 2006. Oral gene delivery: Strategies to improve stability of pDNA towards intestinal digestion. *Journal of Drug Targeting* 14: 311-319.
 - 40 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.
 - 41 O'Neill, M.J., L. Bourre, S. Melgar and C.M. O'Driscoll. 2011. Intestinal delivery of non-viral gene therapeutics: Physiological barriers and preclinical models. *Drug Discovery Today* 16: 203-218.
 - 42 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
 - 43 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. 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.
 - 44 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.
 - 45 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural,*

- Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 46 Park, N.J., Y. Li, T. Yu, B.M.N. Brinkman and D.T. Wong. 2006. Characterization of RNA in saliva. *Clinical Chemistry* 52: 988-994.
 - 47 Petrick, J.S., B. Brower-Toland, A.L. Jackson and L.D. Kier. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176.
 - 48 Qin, X., S. Gianì and D. Breviario. 1997. Molecular cloning of three rice α -tubulin isotypes: Differential expression in tissues and during flower development. *Biochimica et Biophysica Acta* 1354: 19-23.
 - 49 Raiborg, C. and H. Stenmark. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458: 445-452.
 - 50 Ramaseshadri, P., G. Segers, R. Flannagan, E. Wiggins, W. Clinton, O. Ilagan, B. McNulty, T. Clark and R. Bolognesi. 2013. Physiological and cellular responses caused by RNAi-mediated suppression of Snf7 orthologue in western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) larvae. *PLoS ONE* 8: e54270.
 - 51 Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
 - 52 Sioud, M. 2005. On the delivery of small interfering RNAs into mammalian cells. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2: 639-651.
 - 53 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 16338-16346.
 - 54 Smith, D.R. and D.G. White. 1988. Diseases of corn. Pages 687-766 in *Corn and Corn Improvement*. Third Edition. G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
 - 55 Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
 - 56 Teis, D., S. Saksena and S.D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental Cell* 15: 578-589.
 - 57 Tian, H., H. Peng, Q. Yao, H. Chen, Q. Xie, B. Tang and W. Zhang. 2009. Developmental control of a lepidopteran pest *Spodoptera exigua* by ingestion of bacteria expressing dsRNA of a non-midgut gene. *PLoS ONE* 4: e6225.
 - 58 Title, A.C., R. Denzler and M. Stoffel. 2015. Uptake and function studies of maternal milk-derived microRNAs. *J. Biol. Chem. JBC Papers in Press*. August 3, 2015.: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M1115.676734>.

- 59 Tomoyasu, Y. and R.E. Denell. 2004. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Development Genes and Evolution* 214: 575-578.
- 60 Turner, C.T., M.W. Davy, R.M. MacDiarmid, K.M. Plummer, N.P. Birch and R.D. Newcomb. 2006. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. *Insect Molecular Biology* 15: 383-391.
- 61 Vaccari, T., T.E. Rusten, L. Menut, I.P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark and D. Bilder. 2009. Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by efficient isolation of ESCRT mutants. *Journal of Cell Science* 122: 2413-2423.
- 62 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.
- 63 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- 64 White, P.J. and L.M. Pollak. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, products, composition, and nutritive values. *Cereal Foods World* 40: 756-762.
- 65 Wilkes, H.G. 1972. Maize and its wild relatives. *Science* 177: 1071-1077.
- 66 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 67 財務省 2014 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed Sep 17, 2014]
- 68 瀧澤康孝 2001 子実用トウモロコシの栽培 II 栽培の実際 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 110-128
- 69 中村茂文 2001 生育のステージと生理, 生態 I 種子と発芽 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 41-43
- 70 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 2014 飼料月報 平成 25 年度 4 月~3 月 http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/cyosa/pdf/h25.pdf [Accessed Sep 17, 2014]
- 71 山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

670

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR10871
- 2 Northern Blot Analysis of DvSnf7 RNA Expression in MON 87411 (RAR-2013-0213)
- 3 Updated Bioinformatics Evaluation of the Cry3Bb1 Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024870)
- 4 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024715)
- 5 Amended Report for MSL0025314: Molecular Characterization of MON 87411 (MSL0025845)
- 6 Bioinformatics Evaluation of MON 87411 Nucleotide Sequence Utilizing the EST_2014, NT_2014, and NR_2014 Databases (MSL0025657)

- 7 Demonstration of the Presence of DvSnf7 Transcript in Maize Leaf Samples Across Multiple Generations of MON 87411 (MSL0025045)
- 8 Demonstration of the Presence of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Proteins in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87411 (MSL0024801)
- 9 Segregation of the T-DNA Insert in MON 87411 Across Three Generations (MSL0024728)
- 10 Assessment of DvSnf7 RNA Levels in Maize Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (MSL0024697)
- 11 Assessment of Cry3Bb1 and CP4 EPSPS Protein Levels in Corn Tissues Collected from MON 87411 Produced in Argentina Field Trials during 2011-2012 (MSL0024586)
- 12 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87411: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0024900)
- 13 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87411 Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024883)
- 14 A 90-Day Feeding Study in Sprague Dawley Rats with Grain from MON 87411 Corn (WIL-50411)
- 15 A 28 Day Oral Study in the Mouse with DvSnf7_968 RNA (MSL0025624)
- 16 Characterization of the Cry3Bb1 Protein Purified from the Maize Grain of MON 87411 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *E. coli*-Produced Cry3Bb1 Proteins (MSL0024872)
- 17 Characterization of the CP4 EPSPS Protein Purified from the Maize Grain of MON 87411 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Proteins (MSL0024834)
- 18 Assessment of the in vitro Digestibility in Simulated Gastric and Intestinal Fluids of the Cry3Bb1.pvzmir39 Protein (MSL-18662)
- 19 Assessment of the in vitro Digestibility of Purified *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Protein in Simulated Gastric Fluid (MSL17566)
- 20 Assessment of the in vitro digestive fate of CP4 EPSP synthase (MSL12949)
- 21 The Effect of Heat Treatment on Cry3Bb1 Immunodetection (MSL0023074)
- 22 Amended Report for MSL0022764: Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0024759)
- 23 Bioinformatic Comparison of the 240 Nucleotide DvSnf7 Sequence with Eukaryotic Soil Microorganism and *Zea mays* Sequence Databases (RAR-2013-0260)
- 24 Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from Glyphosate Treated MON 87411 and Control Grown in Argentina during 2011/2012 (MSL0025541)