

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統

平成 23 年 5 月 26 日

農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

目次

「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」に係る安全性確認	3
I はじめに	3
II 確認対象飼料の概要	3
III 審議内容	3
1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
(1) 遺伝的素材に関する事項	3
(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	4
(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
3 宿主に関する事項	4
(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	4
(2) 遺伝的先祖に関する事項	4
(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
(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	5
(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	5
(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項	5
(8) 飼料に利用された歴史に関する事項	5
(9) 飼料の安全な利用に関する事項	5
(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	5
(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
4 ベクターに関する事項	6
(1) 名称及び由来に関する事項	6
(2) 性質に関する事項	6
(3) 薬剤耐性に関する事項	6
(4) 伝達性に関する事項	6
(5) 宿主依存性に関する事項	6
(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	6
(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	7
5 挿入遺伝子に関する事項	7
(1) 供与体に関する事項	7
(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項	7
(3) 構造に関する事項	8
(4) 性質に関する事項	8
(5) 純度に関する事項	10
(6) 安定性に関する事項	10

（７）コピー数に関する事項	1 1
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	1 1
（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 3
（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 3
6 組換え体に関する事項	1 3
（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 3
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	1 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	1 4
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	1 5
（５）宿主との差異に関する事項	1 6
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	1 8
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	1 8
（８）不活化法に関する事項	1 8
（９）外国における認可等に関する事項	1 8
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項	1 9
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項	1 9
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	1 9
IV 審議結果	1 9
V 提出資料で引用された参考文献	1 9

「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」に係る安全性確認

I はじめに

乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統（以下「MON87460 トウモロコシ」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：乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統

性 質：乾燥耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company

MON87460トウモロコシは、グラム陽性土壌細菌 *Bacillus subtilis*由来の低温ショックたん白質B遺伝子を一部改変した、改変低温ショックたん白質B遺伝子（改変 *cspB* 遺伝子）を導入したトウモロコシである。改変 *cspB* 遺伝子により改変低温ショックたん白質B（改変CSPB）が発現される。改変CSPBはRNAに結合し、乾燥ストレス条件下では分裂組織及び生殖器官における植物体の細胞機能保持を助け、後期栄養生長期から初期生殖生長期に乾燥ストレスにさらされた際の収量の減少を抑制することができるとされる。

また、形質転換体の選抜マーカーとして、*Escherichia coli* K-12株のトランスポゾンTn5に由来する、*nptII*遺伝子が導入されている。

既存のトウモロコシを比較対照とした場合、MON87460トウモロコシには改変CSPB及びNPTIIたん白質を発現するという差異を有するが、それらの安全性は確認され、構成成分等その他の事項についての差異は認められなかったことから、MON87460トウモロコシが、それを飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、一般に、トウモロコシは主にその穀粒が飼料として利用される他、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及び DDGS 等）も同様に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、MON87460 トウモロコシの宿主は、イネ科 (*Gramineae*) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) である遺伝子導入用交配雑種でデント種に属する。改変 *cspB* 遺伝子は、土壌細菌 *B. subtilis* 由来である。MON87460 トウモロコシ中で発現する改変 CSPB のアミノ酸配列は、*B. subtilis* に由来する野生型 CSPB のアミノ酸配列を一部改変している(参考文献 1)。

また、*nptII* 遺伝子は *E. coli* K-12 のトランスポゾン Tn5 由来である。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

MON87460 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る。デント種の主要な利用目的は飼料用であるが、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

MON87460 トウモロコシ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 2, 3, 4)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

改変 *cspB* 遺伝子の導入により、MON87460 トウモロコシは乾燥ストレス条件下における収量の安定性を付与されている。また、改変 *cspB* 遺伝子を含む植物体の選抜を容易にする目的で、抗生物質耐性マーカー遺伝子の *nptII* 遺伝子が導入されている。これらの点を除けば、MON87460 トウモロコシは既存トウモロコシ品種と同じであり、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全く変わりはない。

以上 (1) ~ (4) により、MON87460 トウモロコシの飼料としての安全性を評価するために、既存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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON87460 トウモロコシは、改変 CSPB を発現することにより、乾燥ストレス条件下における収量の減少を抑制することができるとしている。なお、通常の水分会条件下での MON87460 トウモロコシの収量は、対照の非組換えトウモロコシと同程度であるとしている。

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

MON87460 トウモロコシの宿主は、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) *Illis*) のデント種の自殖系統 LH59 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

原産地は、メキシコ又はグアテマラと考えられている。その遺伝的先祖は、育種過程でテオシント(*Zea. mexicana*)から派生したとする説が有力とされている(参

考文献 5, 6, 7)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシには、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い(参考文献 8)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

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。

(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(参考文献 9)、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。

(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、我が国において自生したという報告はされていない。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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り、他家受粉の雌雄同株植物である。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(参考文献 10)。

トウモロコシの近縁植物として、テオシント(*Z. mexicana*, $2n=20$)とトリプサクム属(*Tripsacum* spp., $2n=36$)がある。テオシントはトウモロコシと交雑可能であるが、米国のコーン・ベルト地帯、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(参考文献 11)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

トウモロコシは我が国における配合飼料の主要原料の一つである。種子及び青刈り作物の状態で利用される他、食品分野及び工業分野から生じるトウモロコシ由来の副産物(コーングルテンミール、コーングルテンフィード及び DDGS 等)も飼料として利用されている(参考文献 12)。

(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

現在のトウモロコシは栽培作物として適するように人為的に高度に改良された作物であり、人の助けなしに生存、繁殖することはできない(参考文献 6)。子実は

穂軸に強固に着生しており、さらに全体が苞葉に包まれているため、自然条件下では脱粒が起こりにくい。種子は低温・多湿条件下では発芽遅延をおこして、多くの場合、発芽する前に腐敗、枯死する(参考文献 10)。また、発芽しても、発芽後に生長点が地上に出る 5~7 葉期に 0°C 以下で 8 時間以上さらされると生存できないといわれている。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

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有害生理活性物質の産生は報告されていない。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON87460 トウモロコシの作出に用いられた発現ベクターPV-ZMAP595 は、中間プラスミド A~F を用いて作出されている(参考文献 13)。

(2) 性質に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 の塩基数は 9,379bp である。発現ベクターPV-ZMAP595 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされている。発現ベクターPV-ZMAP595 の構築に用いられた中間プラスミドは全て非病原性の *E. coli* 又は *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) に由来するものであり、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(参考文献 14)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

中間プラスミドには、微生物の選抜マーカーとしてスペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対して耐性を付与する *aadA* 遺伝子、及び、形質転換体の選抜マーカーとしてアミノグリコシド系抗生物質に対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれている。

(4) 伝達性に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 及び中間プラスミドは、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。

(5) 宿主依存性に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 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、家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 は、中間プラスミド A~F を用いて作出され、改変 CSPB を発現する改変 *cspB* 遺伝子発現カセットと NPTII たん白質を発現する *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域を有している(参考文献 13)。

(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

発現ベクターPV-ZMAP595 の、改変 CSPB を発現する改変 *cspB* 遺伝子発現カセットと NPTII たん白質を発現する *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域を、アグロバクテリウム法により導入した。

5 挿入遺伝子に関する事項

(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

MON87460 トウモロコシに導入された改変 *cspB* 遺伝子は自然界に遍在する土壌微生物である *B. subtilis* に由来し、クローニングのための制限酵素切断部位を付加するために遺伝子配列に改変を加えている。その結果、野生型 CSPB のアミノ酸配列の N 末端から 2 番目のロイシンがバリンに改変している。

npt II 遺伝子は *E. coli* K-12 のトランスポゾン Tn5 由来である。

②安全性に関する事項

B. subtilis は自然界に遍在する土壌細菌であり、*B. subtilis* の病原性及び毒性は知られていない(参考文献 15, 16)。さらに、*B. subtilis* の一系統は、ダイズを発酵させて納豆を製造する際に使用される納豆菌としても知られており、わが国でも多くの食経験がある(参考文献 15, 17)。

E. coli K-12 にヒト及び家畜等に対する病原性はないと考えられている(参考文献 18)。また、他の病原性 *E. coli* 株とは異なり、*E. coli* K-12 の派生物に病原性は認められていない(参考文献 19)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

MON87460 トウモロコシは、発現ベクターPV-ZMAP595 の改変 *cspB* 遺伝子発現カセットと *nptII* 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導入し、作出されている。

従来トウモロコシ品種 LH59 の未熟胚細胞から脱分化したカルスと発現ベクターを含むアグロバクテリウムを共置培養した後、カルベニシリン及びパロモマイシンを含む組織培養培地で細胞の選抜を行った。その際、カルベニシリンは残存するアグロバクテリウムの除去に用いられ、パロモマイシンは形質転換していない個体を除去するために用いた。選抜された細胞は複数回選抜培地中で継代培養され、植物体へ再分化させた。

その後、得られた再分化個体(R₀)を LH59 と交配し、自殖した。R₁ 世代において改変 CSPB の発現、カナマイシンへの耐性及び導入遺伝子のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代を導入遺伝子の分析(サザンブロット)及び形態特性調査の対象とした。その結果、導入遺伝子の分析結果及び形態特性から判断して、最終的に商品化系統として MON87460 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

改変 *cspB* 遺伝子発現カセットはイネ・アクチン遺伝子由来の *Ract1* プロモーター及びリーダー配列(参考文献 20)によりその発現を制御されている。また、*nptII* 遺伝子はカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター(参考文献 21)によりその発現を制御されている。

② ターミネーターに関する事項

改変 *cspB* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)由来の 3'末端非翻訳領域である T-tr7(参考文献 22)である。また、*nptII* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)由来の 3'末端非翻訳領域である NOS3'(参考文献 23)である。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。各構成要素の機能は次項のとおり。

(4) 性質に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 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。改変 *cspB* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由 来 及 び 機 能
Right Border	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) に由来する、ノパリン型 T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片。 <i>R. radiobacter</i> から植物ゲノムへの、T-DNA の伝達の開始点として利用される(参考文献 25)。
P- <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のプロモーターとリーダー配列 (参考文献 20)。
I- <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(参考文献 24)。
改変 <i>cspB</i>	改変 CSPB をコードする遺伝子(参考文献 1)。
T- <i>tr7</i>	<i>R. radiobacter</i> 由来の転写 7 遺伝子の 3' 非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する(参考文献 22)。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼ(DNA 組換え酵素)が 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する(参考文献 26)。
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(参考文献 21)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(参考文献 27)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にアミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する(参考文献 28)。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる。

T- <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>)遺伝子の 3' 非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する(参考文献 23)。
<i>loxP</i>	同上
Left Border	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) に由来する左側境界配列(25bp)をふくむ DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) から植物ゲノムへ伝達される際の終着点である(参考文献 29)。

【 改変 *cspB* 遺伝子の機能 】

MON87460 トウモロコシ中で発現する改変 CSPB は、土壌細菌である *B. subtilis* に由来している。この改変 CSPB は、CSP ファミリーに分類されており、RNA に結合する低温ショックドメイン(CSD)と呼ばれる配列を保存していることが知られている。

一般に細菌中で発現する RNA は、多様な環境ストレス条件下において二次構造を形成し、その結果として正常なたん白質の合成が阻害されることが知られている。しかし、CSP は RNA に結合することにより(参考文献 30)、RNA の二次構造を解消し、翻訳を安定させ、細胞機能を向上させる(参考文献 31)、RNA シャペロンとして働いていることが知られている。

植物においても CSD を含むたん白質はマルチドメインたん白質として存在することが知られている(参考文献 32)。これらの CSD を含むたん白質は細菌 CSP と極めて類似しており、環境ストレス時に RNA に結合し、ストレス条件下における細胞機能の維持を助けると考えられ、RNA シャペロンと共通の機能を有し、CSD を含むたん白質はシロイヌナズナ、コムギ、イネにおいて非生物学的ストレスに応答し、植物の生育に多方面で重要な役割を果たすことが報告されている(参考文献 33, 34, 35, 36, 37, 38)。

改変 *cspB* 遺伝子をトウモロコシに導入した MON87460 トウモロコシでは、後期栄養生長期から初期生殖生長期(V10~R2)での乾燥ストレス条件下において、対照の非組換えトウモロコシの収量と比較して約 9.6~32.1%収量が高いことが確認された。収量以外の形態特性に差異は認められなかった(参考文献 39,40)。また、通常的水分条件下においては、MON87460 トウモロコシと対照の非組換えトウモロコシの収量に差異は認められず、MON87460 トウモロコシが通常的水分条件下において収量が高めることはないことが確認された(参考文献 40, 41)。

MON87460 トウモロコシを通常的水分条件下及び乾燥ストレス条件下で生育させ収量を比較した結果、乾燥ストレス条件下での MON87460 トウモロコシの収量は通常的水分条件下で生育させた場合の収量と比較して約 48%減少していた(参考文献 40)。さらに、4 葉期(V4)の植物体においても、MON87460 トウモロコシは乾燥ストレスに対して対照の非組換えトウモロコシと同程度の傷害を受けていることが確認された(参考文献 42)。この結果から、MON87460 トウモロコシは乾燥ストレスに対してある程度の感受性を持つことが確認された。

MON87460 トウモロコシの生育初期における低温、高温、塩ストレスに対する耐性能を調査した結果、改変 CSPB により MON87460 トウモロコシに付与さ

れた環境ストレス耐性能は乾燥ストレスのみであることが示された(参考文献 43, 44, 45, 46, 47)。

MON87460 トウモロコシ中で発現する改変 CSPB が、*B. subtilis* 中の CSPB と同様に MON87460 トウモロコシ中で RNA シャペロンとして働いているかを調査した結果、改変 CSPB は MON87460 トウモロコシ中で RNA シャペロンとして働いていると判断された(参考文献 30, 48, 49)。

また、5 葉期(V5)及び 8 葉期(V8)における MON87460 トウモロコシの生理学的特性を調査した結果、MON87460 トウモロコシでは乾燥ストレス条件下において光合成速度、気孔コンダクタンス、光化学系 II により媒介される電子伝達の量子効率などの植物生理学的能力が向上していることが確認された(参考文献 39, 50)。乾燥ストレス条件下でのトウモロコシにおける生理学的能力の向上が、雌穂当たりの穀粒数の増加及び収量の増加へつながっていることは広く知られている(参考文献 51, 52, 53, 54, 55, 56)。

以上のことから、MON87460 トウモロコシ中で発現する改変 CSPB は RNA シャペロンとして働くことにより、乾燥ストレス条件下において細胞の機能を正常に保ち、その結果として MON87460 トウモロコシの生理学的能力を向上させていると示唆された。また、この生理学的機能の向上により、MON87460 トウモロコシは乾燥ストレス条件下における雌穂当たりの穀粒数、さらには収量の減少を抑制すると考えられた。

(5) 純度に関する事項

発現ベクターPV-ZMAP595 の T-DNA 領域の塩基数は 3,309 bp である。その塩基配列、大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、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

(6) 安定性に関する事項

MON87460 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの 7 世代にわたるサザンブロット分析を行った結果、MON87460 トウモロコシ中の T-DNA 領域は後代に安定して遺伝していることが示された(参考文献 57)。また、MON87460 トウモロコシの発現ベクターPV-ZMAP595 の外側骨格領域が挿入されていないことを確認するため、導入遺伝子の安定性を確認した世代と同じ世代を用いてサザンブロット分析を行った結果、MON87460 トウモロコシ中に発現ベクターPV-ZMAP595 の外側骨格領域が挿入されていないことが示された(参考文献 57)。

MON87460 トウモロコシの複数世代における改変 CSPB 及び NPTII たん白質の発現の安定性を ELISA 分析により確認した結果、改変 CSPB 及び NPTII たん白質が安定して発現していることが示された(参考文献 58)。

MON87460 トウモロコシの複数世代における改変 *cspB* 遺伝子及び NPTII たん白質の安定性及び分離比を調査するために、カイ二乗検定による統計分析を行った結果、MON87460 トウモロコシ中の改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットはメンデルの法則にしたがって後代に分離していることが示された(参考文献 59)。

(7) コピー数に関する事項

MON87460 トウモロコシの DNA ゲノムにおける導入遺伝子の導入箇所数、コピー数、外側骨格領域の有無をサザンブロット分析により確認した結果、MON87460 トウモロコシ中のゲノム DNA の 1 箇所、改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットからなる T-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、T-DNA 領域及び外側骨格領域からの非意図的な遺伝子断片が導入されていないことも確認された(参考文献 57)。

塩基配列の解析を行った結果、MON87460 トウモロコシ中の導入遺伝子とトウモロコシゲノムに挿入される発現ベクターPV-ZMAP595 の T-DNA 部分の塩基配列と同一であることが確認されたが、導入遺伝子の右側境界領域(PV-ZMAP595 の 2,816-3,172bp)及びそれに続く [P-*RactI*] 領域の上流 733bp (PV-ZMAP595 の 3,205-3,937bp)の欠損が認められた(参考文献 57)。さらに、導入遺伝子と近傍配列の境界領域においてトウモロコシゲノムが 22bp 欠損していることが確認された。しかし、BLASTn 及び BLASTx による近傍配列の分析により、T-DNA の導入によりトウモロコシ内在性の遺伝子及び ORF が破壊されていないことが確認された(参考文献 57, 60)。また、MON87460 トウモロコシの導入遺伝子の近傍配列及び対照の非組換えトウモロコシの塩基配列を比較し、大規模なリアレンジメントが起こっていないことも確認された(参考文献 57)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON87460 トウモロコシの様々な組織における改変 CSPB 及び NPTII たん白質の発現量を ELISA 法により分析した。2006-2007 年にチリの 3 箇所のほ場において、それぞれ 3 反復で通常的水分条件下及び乾燥ストレス条件下で栽培した。通常的水分条件下のプロットは適度に灌漑を行い、乾燥ストレス条件下のプロットは後期栄養生長期(V10)から初期生殖生長期(R2)にかけて灌漑を抑制し乾燥ストレスを与えた。各ほ場の結果を統一して分析する際、商業栽培品種の生育障害を栽培条件の指標として用いた。特に収量の基準としては、乾燥ストレス条件下における商業栽培品種の収量は、通常的水分条件下における商業栽培品種の収量と比較し 15%以上の減少が認められていることとした。その結果、表 2 のとおり、改変 CSPB の発現量は生育するにつれて減少すること、通常的水分条件下においても乾燥ストレス条件下においても各組織において発現していることが確認された。また、NPTII たん白質の発現量を表 3 に示した(参考文献 61)。

331
332
333

表 2 MON87460 トウモロコシにおける改変 CSPB の発現量(平均値)

(単位: $\mu\text{g/g}$ fwt)

組 織		2 ~ 4 葉期**	6 ~ 8 葉期***	10~12 葉期**	~ 雄 穂 抽出期**	開花期**	初 期 黄熟期**	収穫後**
葉	通常*	0.50	0.48	0.13	0.10			
	乾燥*	0.50	0.47	0.11	0.11			
根	通常	0.13	0.086	0.061	0.045		0.0052	0.004***
	乾燥	0.14	0.10	0.054	0.058		0.011	0.0067
茎 葉	通常						0.026	0.011
	乾燥						0.035	0.021
植物体	通常	0.32	0.19	0.10	0.11			
	乾燥	0.30	0.18	0.091	0.13			
花 粉	通常					18		
	乾燥					18		
穀 粒	通常							0.041
	乾燥							0.033

*通常：通常の水分条件下、 乾燥：乾燥ストレス条件下

** n = 9

*** n = 6

334
335
336
337
338
339

表 3 MON87460 トウモロコシにおける NPTII たん白質の発現量(平均値)

(単位: $\mu\text{g/g}$ fwt)

組織		2~4 葉期**	収穫後**
葉	通常*	0.42	
	乾燥*	0.46	
根	通常	0.051	
	乾燥	0.046	
茎葉	通常		0.037
	乾燥		0.039
穀粒	通常		定量下限未満
	乾燥		定量下限未満

*通常：通常の水分条件下、 乾燥：乾燥ストレス条件下

** n = 9、乾燥ストレス条件下の葉のみ n = 8

340
341
342

343 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

344 *nptII* 遺伝子は、*E. coli* K-12 のトランスポゾンである Tn5 由来であり、その遺
345 伝子産物である NPTII たん白質は形質転換細胞の選抜の際に抗生物質耐性マーカー
346 として使用される。NPTII たん白質は ATP を利用してネオマイシン及び関連する
347 アミノグリコシド系抗生物質をリン酸化して不活化する。これまでに NPTII た
348 ん白質が家畜等の健康に影響を与えたという報告はされていない。

349 発現ベクター PV-ZMAP595 には、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに
350 対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の 3'(9)-O-ヌクレオチジルトラン
351 スフェラーゼ (AAD) をコードしている *aadA* 遺伝子(参考文献 84)が外側骨格領域
352 に存在している。しかし、導入遺伝子解析の結果、MON87460 トウモロコシ中
353 には *aadA* 遺伝子が導入されていないことが確認された(参考文献 57)。

354
355 (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
356 に関する事項

357 MON87460 トウモロコシの導入遺伝子とその 5'末端から 1,121bp 及び 3'末端から
358 784bp の近傍配列の境界領域において、既知の毒素及びアレルゲンと相同性の
359 ある新規 ORF が形成されていないことを確認するために、導入遺伝子と近傍配列
360 の両境界領域においてストップコドン(TGA, TAG, TAA)を検索し、導入遺伝子から
361 開始又は導入遺伝子で終結する ORF を 6 つのフレームにおいて検索した。

362 その結果、8 アミノ酸以上の ORF が 5'末端側境界配列に 5 つ、3'末端側境界配
363 列に 4 つ、合計 9 つ確認された(参考文献 62)。仮にそれら 9 つの ORF が翻訳され
364 た場合、それらたん白質が既知の毒素、アレルゲン及び有害な生理活性のあるたん
365 白質と相同性を示すかを調査した結果、9 つの ORF が翻訳されたとしても、それ
366 らは既知の毒素、アレルゲン及び有害な生理活性のあるたん白質と相同性を示
367 していないことが確認された(参考文献 62)。

368 また、導入遺伝子において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想
369 定し、6 つのフレームにおいてアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、毒素、
370 アレルゲン及び有害な生理活性のあるたん白質との相同性は確認されなかった(参
371 考文献 63)。

372
373 6 組換え体に関する事項

374 (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

375 MON87460 トウモロコシと従来のトウモロコシとの相違は、MON87460 トウ
376 モロコシが改変 CSPB の発現により乾燥耐性を付与されていること及び NPTII た
377 ん白質の発現により抗生物質耐性を付与されていることのみであり、それらの性
378 質、機能及び有害作用を持たないことは明らかとなっている。

379
380 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

381 ①改変 CSPB

382 改変 CSPB が既知の毒素と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか調
383 査した結果、既知の毒素又は生物学的に、ヒト或いは家畜等に有害なたん白質

と構造的に類似性のある配列は共有していなかった(参考文献 64)。

マウス急性毒性試験の結果、改変 CSPB の最大投与量 4.7 mg/kg でも投与に関連すると思われる生存、臨床的観察、体重変動、飼料消費及び病理学的変化に対する影響は認められなかった(参考文献 65)。したがって、MON87460 トウモロコシで発現している改変 CSPB が家畜等の健康に影響を及ぼすとは考えにくいと判断した。

②NPTII たん白質

NPTII たん白質が既知の毒素と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか調査した結果、既知の毒素又は生物学的に、ヒト或いは家畜等に有害なたん白質と構造的に類似性のある配列は共有していなかった(参考文献 66)。

マウス急性毒性試験の結果、NPTII たん白質の最大投与量 5,000 mg/kg でも投与に関連すると思われる生存、臨床的観察、体重変動、飼料消費及び病理学的変化に対する影響は認められなかった(参考文献 67)。したがって、MON87460 トウモロコシで発現している NPTII たん白質が家畜等の健康に影響を及ぼすとは考えにくいと判断した。

(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) 改変 CSPB

MON87460 トウモロコシでの改変 CSPB の発現量は極めて少量であり、安全性評価試験に使用できる十分量を精製できないため、人工胃液及び人口腸液試験は、*E.coli* で大量発現させた改変 CSPB を用いて行なった。*E. coli* から調製した改変 CSPB と MON87460 トウモロコシ中で発現する改変 CSPB との同等性は、分子量(SDS-PAGE)、免疫反応性(ウエスタンブロット法)、N 末端配列分析、MALDI-TOF 質量分析法、グリコシル化状態及び機能活性により確認している(参考文献 68)。

①人工胃液に対する感受性

人工胃液中での改変 CSPB の消化性を SDS-PAGE とウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工胃液中で試験開始 30 秒以内に検出限界値以下になるまで消化されたことが示された。なお、SDS-PAGE において分子量 2.5 KDa 以下の分解産物が、反応開始後 30 秒から 30 分の間に検出されたが、反応開始 60 分後には検出されなかった。一時的に安定なこの分子量 2.5 KDa の改変 CSPB 分解産物の消化性を調査するために、人工胃液の消化性試験後、人工腸液中のパンクレアチンによる消化試験を行った。一時的に安定な改変 CSPB の分解産物を人工胃液中で 2 分間消化した後、反応を止め、人工腸液中でさらに消化させた。改変 CSPB の分解産物の人工腸液中での消化性を SDS-PAGE によって評価した。その結果、2.5 KDa 以下の分解産物は、人工腸液中で速やかに(30 秒未満で)消化されることが明らかになった(参考文献 69)。

②人工腸液に対する感受性

人工腸液中での改変 CSPB の消化性をウエスタンブロット分析により評価した。その結果、ウエスタンブロット分析から、完全長改変 CSPB が人工腸液中で試験開始 5 分以内に検出限界値以下になるまで消化されたことが示された。どの測定時点においても分解産物は検出されなかった(参考文献 69)。

③加熱処理

免疫学的検出感度に及ぼす加熱処理の影響を理解するため、MON87460 トウモロコシの穀粒を用いて改変 CSPB の加熱処理感受性を調査した。トウモロコシの加工中に実施される種々の温度条件を考慮にいれ、加熱処理は温度 204℃、15 分とした(参考文献 70)。MON87460 トウモロコシの穀粒中に含まれる改変 CSPB は低レベルであるため、ELISA により改変 CSPB の免疫学的検出感度を評価した。その結果、加熱処理後に免疫反応性が検出可能な改変 CSPB は、定量限界値以下に低下したことが確認された。よって、加熱処理により MON87460 トウモロコシの穀粒中の改変 CSPB はその免疫反応性を消失すると判断された(参考文献 71)。

2) NPTII たん白質

改変CSPBと同様に、*E. coli* から調製したNPTIIたん白質とMON87460トウモロコシ中で発現するNPTIIたん白質との同等性は確認された。

NPTIIたん白質は、これまでも *E.coli*から調製したNPTIIたん白質を用いた、人工胃液及び人工腸液に対する感受性に関する評価がなされている。よって、NPTIIたん白質が、人工胃液中で10秒、人工腸液中で15分後には消化されることが示されたこれまでの試験結果を、MON87460トウモロコシ中のNPTIIたん白質にも適用できると考えられる(参考文献67, 72)。また、MON87460トウモロコシの穀粒中で発現するNPTIIたん白質が検出限界値以下であったため、MON87460トウモロコシの穀粒を用いた加熱処理試験を実施できなかったが、害虫抵抗性トウモロコシMON863系統においてNPTIIたん白質の熱安定性が調査されており、204℃で30分熱処理後にNPTIIたん白質はその免疫反応性を消失することが証明された(参考文献73)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

①改変 CSPB

CSPB を含む細菌由来の CSP は RNA に非特異的に結合し、RNA シャペロンとして働いていると考えられている(参考文献 74, 75)。このため、CSP は通常であれば翻訳が制限されるような条件下でも翻訳が正常に行われるようサポートする役割を持つ(参考文献 31)。しかし、CSPB が転写を直接誘導するような機能を持つとの報告はない(参考文献 76, 77)。また、CSPB は酵素活性を持つとの報告はなく、CSPB がトウモロコシ中で発現することにより新規の代謝系が生じたり、新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。実際に MON87460 トウモロコシの成分分析の結果から、通常の条件下及び乾燥ストレス条件下のいずれの場合においても、MON87460 トウモロコシと対照の非組換えトウモロコシ

との間に差異は認められず、改変 CSPB により MON87460 トウモロコシに新規の代謝系が生じていないことが確認された(参考文献 2, 78, 79)。

②NPTII たん白質

NPTII たん白質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である(参考文献 80)。NPTII たん白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている(参考文献 81, 82, 83)。さらに、NPTII たん白質の構造活性学的な検討の結果、NPTII たん白質はアミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている(参考文献 81)。以上のことから、NPTII たん白質は基質特異性が高いため、トウモロコシ中で発現することにより新規の代謝系が生じたり、新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。

③改変 CSPB+NPTII たん白質

上述したように、改変 CSPB 及び NPTII たん白質はそれぞれ異なる作用機作を有している。また、NPTII たん白質は基質特異性が高く、CSPB が NPTII たん白質の基質となるようなアミノグリコシド系構造を有していないことから、これらたん白質はそれぞれ独立して作用していると考えられ、改変 CSPB 及び NPTII たん白質がトウモロコシ中で発現することにより新規の代謝系が生じたり、新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

チリ及び米国の圃場で、通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下において栽培されたトウモロコシ MON87460 及び対照の非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、二次代謝産物及び栄養阻害物質の分析を行った。また、チリの圃場で、通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下において栽培されたトウモロコシ MON87460 と対照の非組換えトウモロコシについて、ストレス応答に関わる二次代謝産物等の分析を行った(参考文献 2, 3)。なお、分析値を解析した結果、統計学的有意差が認められた成分は表 4 に示した。

①主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維、総食物繊維（穀粒のみ））について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても、いずれも同じ圃場で栽培された従来トウモロコシ品種の分析値から計算した許容区間の範囲内であった。

507 ②脂肪酸組成

508 穀粒の脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えト
509 ウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認め
510 られた場合であっても、いずれも同じ圃場で栽培された従来トウモロコシ品種
511 の分析値から計算した許容区間の範囲内であった。

512
513 ③アミノ酸組成

514 穀粒のアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換え
515 トウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

516
517 ④ミネラル類

518 穀粒のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、
519 カリウム、ナトリウム、亜鉛）及び茎葉のミネラル類（カルシウム、リン）に
520 ついて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学
521 的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても、い
522 ずれも同じ圃場で栽培された従来トウモロコシ品種の分析値から計算した許容
523 区間の範囲内であった。

524
525 ⑤ビタミン類

526 穀粒の葉酸、ナイアシン、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタ
527 ミン E 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
528 に統計学的有意差は認められなかった。

529
530 ⑥二次代謝産物及び抗栄養素等

531 穀粒のフェルラ酸、p-クマル酸及びフルフラールについて分析を行った結果、
532 対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかつ
533 た。

534 穀粒のフィチン酸及びラフィノースについて分析を行った結果、対照に用い
535 た非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

536
537 ⑦ストレス応答に関わる二次代謝産物等

538 穀粒及び茎葉のサリチル酸、アブシシン酸、スクロース、グルコース、フ
539 ルクトース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、遊離プロリン、
540 コリン及びグリシンベタインについて分析を行った結果、通常的水分条件下
541 における茎葉中のアブシシン酸で有意な増加が認められた。しかし、有意差
542 が認められたのは 3 箇所の圃場のうち 1 箇所であり、穀粒では統計学的有意
543 差は認められなかった。その他の項目については、対照に用いた非組換えト
544 ウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認
545 められた場合であっても、いずれも同じ圃場で栽培された従来トウモロコシ
546 品種の分析値から計算した許容区間の範囲内であった。

表 4 統計学的有意差の認められた成分

成分 (単位)	圃場	栽培条件*	部位	MON87460 トウモロコシ 平均値**	非組換え トウモロコシ 平均値**	p-値	商業品種 (範囲) [許容区間]
総脂質 (% DW)	チリ	通常	穀粒	3.89	3.72	0.029	3.16-4.07 [2.47, 4.68]
マグネシウム (% DW)	チリ	通常	穀粒	0.12	0.11	0.012	0.095-0.13 [0.064, 0.16]
総脂質 (% DW)	チリ	乾燥	茎葉	1.32	0.84	0.045	0.20-1.76 [0, 3.25]
エイコセン酸 (% Total FA)	チリ	乾燥	穀粒	0.18	0.18	0.042	0.18-0.27 [0.11, 0.34]
灰分 (% DW)	米国	—	穀粒	1.54	1.46	0.041	1.17-2.01 [0.55, 2.30]
ステアリン酸 (% Total FA)	米国	—	穀粒	2.05	1.98	0.024	1.36-2.14 [1.00, 2.51]
エイコセン酸 (% Total FA)	米国	—	穀粒	0.18	0.19	0.007	0.20-0.29 [0.15, 0.33]

*通常：通常の水分条件下、 乾燥：乾燥ストレス条件下

** 各ほ場 n=3

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国、アルゼンチン、チリ、カナダにおいて行われた栽培試験において、MON87460 トウモロコシの生存及び増殖能力に関して非組換えトウモロコシと同等である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

MON87460 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同等であり、生存・増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

(8) 不活化法に関する事項

MON87460 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)など、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

米国食品医薬品局 (FDA) より 2010 年 12 月に食品・飼料としての安全性が確認された。

カナダ食品検査庁 (CFIA) より 2010 年 12 月に飼料及び環境に対する安全性が確認された。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) へ 2010 年 9 月に

- 571 食品としての安全性が確認された。
- 572 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
- 573 MON87460 トウモロコシの栽培方法は従来のトウモロコシ品種の栽培方法と同
- 574 じである。
- 575
- 576 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項
- 577 MON87460 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は従来のトウモロコシと同
- 578 じである。
- 579
- 580 7 2 から 6 までは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
- 581 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
- 582 該当しない。
- 583
- 584 IV 審議結果
- 585 乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び
- 586 飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項に
- 587 よる確認を行って差し支えないと判断された。
- 588
- 589 V 提出資料で引用された参考文献
- 1 Willimsky, G., H. Bang, G. Fischer, and M.A. Marahiel. 1992. Characterization of cspB, a *Bacillus subtilis* Inducible Cold Shock Gene Affecting Cell Viability at Low Temperatures. *Journal of Bacteriology* 174:6326-6335.
 - 2 Amended Report for MSL0021180: Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON 87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production (MSL0021754) (社外秘)
 - 3 Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON 87460 Grown in a 2006 USA Field Production (MSL0021141) (社外秘)
 - 4 Amendment 1 of Report for MSL0021549: Metabolite Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON 87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production (MSL0021752) (社外秘)
 - 5 Aldrich, S.R., W.O. Scott, and R.G. Hoeft. 1986. *Modern Corn Production*. 3rd edn., A&L Publications, Inc., Champaign, Illinois.
 - 6 Galinat, W.C. 1988. The Origin of Corn. Pages 1-31 in *Corn and Corn Improvement*, 3rd edn., G.F. Sprague and J.W. Dudley, (eds.) American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
 - 7 Jugenheimer, R.W. 1976. Corn for special purposes and uses. Pages 215-258 in *Corn, Improvement, Seed Production and Uses*, JOHN WILEY & SONS, New York
 - 8 White, P.J., and L.M. Pollack. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. *Cereal Foods World* 40:756-762.
 - 9 Smith, D.R., and D.G. White. 1988. Diseases of Corn. Pages 687-766 in *Corn and corn improvement*, 3rd edn., G.F. Sprague and J.W. Dudley, (eds.) American Society of

- Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.
- 10 畑作全書 雑穀編. 1981. 農文協
 - 11 Wilkes, H.G. 1972. Maize and Its Wild Relatives. *Science* 177 : 1071-1077.
 - 12 飼料月報 平成 20 年 8 月. 2008. 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編 社団法人配合飼料供給安定機構
 - 13 Plasmid lineage of PV-ZMAP595 (社外秘)
 - 14 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP595 (社外秘)
 - 15 de Boer, A.S., and B. Diderichsen. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology Biotechnology* 36:1-4.
 - 16 FDA. 1999. Carbohydrase and Protease Enzyme Preparations Derived From *Bacillus Subtilis* or *Bacillus Amyloliquefaciens*: Affirmation of GRAS status as Direct Food Ingredients, Final Rule. Federal Register 64, Pages 19887-19895. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
<http://frwebgate1.access.gpo.gov/cgi-bin/waisgate.cgi?WAISdocID=630442222435+0+0+0&WAISaction=retrieve>
<http://www.gpoaccess.gov/fr/retrieve.html> [Accessed February 5, 2007].
 - 17 Hosoi, T., R. Hirose, S. Saegusa, A. Ametani, K. Kiuchi, and S. Kaminogawa. 2003. Cytokine responses of human intestinal epithelial-like Caco-2 cells to the nonpathogenic bacterium *Bacillus subtilis* (natto). *International Journal of Food Microbiology* 82:255-264.
 - 18 [EPA. 1997. Escherichia coli K-12 Derivatives Final Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act \(TSCA\). http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm. \[Accessed October 15, 2009\]](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm)
 - 19 Mühldorfer, I., and J. Hacker. 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis* 16:171-181.
 - 20 McElroy, D., W. Zhang, J. Cao, and R. Wu. 1990. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *Plant Cell* 2:163-171.
 - 21 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.
 - 22 Dhaese, P., H. De Greve, J. Gielen, J. Seurinck, M. Van Montague, and J. Schell. 1983. Identification of sequences involved in polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2:419-426.
 - 23 Bevan, M., W.M. Barnes, and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11:369-385.
 - 24 McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jené, and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Molecular and General Genetics* 231:150-160.
 - 25 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski, and H.M. Goodman. 1982. Nopaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1:561-573.
 - 26 Russell, S.H., J.L. Hoopes, and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234:49-59.

- 27 Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss, and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-336.
- 28 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann, and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80:4803-4807.
- 29 Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson, and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTil5955. *Plant Molecular Biology* 2:335-350.
- 30 Cristofari, G., and J.L. Darlix. 2002. The Ubiquitous Nature of RNA Chaperone Proteins. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72:223-268.
- 31 Graumann, P., T.M. Wendrich, M.H.W. Weber, K. Schroder, and M.A. Marahiel. 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Molecular Microbiology* 25:741-756.
- 32 Karlson, D., and R. Imai. 2003. Conservation of the Cold Shock Domain Protein Family in Plants. *Plant Physiology* 131:12-15.
- 33 Kim, J.S., S.J. Park, K.J. Kwak, Y.O. Kim, J.Y. Kim, J. Song, B. Jang, C.-H. Jung, and H. Kang. 2007. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* 35:506-516.
- 34 Nakaminami, K., K. Sasaki, S. Kajita, H. Takeda, D. Karlson, K. Ohgi, and R. Imai. 2005. Heat stable ssDNA/RNA-binding activity of a wheat cold shock domain protein. *FEBS Letters* 579:4887-4891.
- 35 Nakaminami, K., D.T. Karlson, and R. Imai. 2006. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:10122-10127.
- 36 Chaikam, V., and D. Karlson. 2008. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant, Cell and Environment* 31:995-1006.
- 37 Fusaro, A.F., S.N. Bocca, R.L.B. Ramos, R.M. Barrôco, C. Magioli, V.C. Jorge, T.C. Coutinho, C.M. Rangel-Lima, R. De Rycke, D. Inzé, G. Engler, and G. Sachetto-Martins. 2007. AtGRP2, a cold-induced nucleo-cytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta* 225:1339-1351.
- 38 Karlson, D., K. Nakaminami, T. Toyomasu, and R. Imai. 2002. A Cold-regulated Nucleic Acid-Binding Protein of Winter Wheat Shares a Domain with Bacterial Cold Shock Proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 277:35248-35256.
- 39 Amended Report for MSL 0021720: Yield component and physiology data from 2003 Kansas and 2007 California field trials (MSL0022168) (社外秘)
- 40 Phenotypic Evaluations and Ecological Interactions of Drought Tolerant Corn MON 87460 Under Well-Watered and Water-Limited Conditions in Chilean Field Trials During 2006-2007 (MSL0021857) (社外秘)

- 41 Phenotypic Evaluations and Ecological Interactions of Drought Tolerant Corn MON 87460 in Irrigated U.S. Field Trials During 2006 (MSL0020951) (社外秘)
- 42 An Assessment of the Effect of Drought Stress on Drought Tolerant Corn MON 87460 in 2008 (MSL0021594) (社外秘)
- 43 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Drought Tolerant Corn MON 87460 in 2008 (MSL0021509) (社外秘)
- 44 An Assessment of the Effect of Heat Stress on Drought Tolerant Corn MON 87460 in 2008 (MSL0021593) (社外秘)
- 45 An Assessment of the Effect of Salt Stress on Drought Tolerant Corn MON 87460 under Greenhouse Conditions in 2008 (MSL0021615) (社外秘)
- 46 Phenotypic Evaluation of Drought Tolerant Corn MON 87460 Under Heat Stress in a U.S. Field Trial During 2008 (REG-08-145) (社外秘)
- 47 Phenotypic Evaluation of Drought Tolerant Corn MON 87460 Under Four Salt Stress Levels in a U.S. Field Trial During 2008 (REG-08-165) (社外秘)
- 48 Castiglioni, P., D. Warner, R.J. Bensen, D.C. Anstrom, J. Harrison, M. Stoecker, M. Abad, G. Kumar, S. Salvador, R. D'Ordine, S. Navarro, S. Back, M. Fernandes, J. Targolli, S. Dasgupta, C. Bonin, M.H. Luethy, and J.E. Heard. 2008. Bacterial RNA Chaperones Confer Abiotic Stress Tolerance in Plants and Improved Grain Yield in Maize under Water-Limited Conditions. *Plant Physiology* 147:446-455.
- 49 Amended Report for MSL0021590: Cold Shock Protein B (CSPB) Interaction with RNA and Expression in MON 87460 (MSL0021728) (社外秘)
- 50 Physiological Responses of MON 87460 Compared to the Control Under Water-Limited Conditions in the Greenhouse (MSL0021719) (社外秘)
- 51 Andrade, F.H., L. Echarte, R. Rizzalli, A. Della Maggiora, and M. Casanovas. 2002. Kernel Number Prediction in Maize under Nitrogen or Water Stress. *Crop Science* 42:1173-1179.
- 52 Bruce, W.B., G.O. Edmeades, and T.C. Barker. 2002. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53:13-25.
- 53 Campos, H., M. Cooper, G.O. Edmeades, C. Löffler, J.R. Schussler, and M. Ibanez. 2006. Changes in drought tolerance in maize associated with fifty years of breeding for yield in the U.S. Corn Belt. *Maydica* 51:369-381.
- 54 Welcker, C., B. Boussuge, C. Bencivenni, J.-M. Ribaut, and F. Tardieu. 2007. Are source and sink strengths genetically linked in maize plants subjected to water deficit? A QTL study of the responses of leaf growth and of Anthesis-Silking Interval to water deficit. *Journal of Experimental Botany* 58:339-349.
- 55 Fuad-Hassan, A., F. Tardieu, and O. Turc. 2008. Drought-induced changes in anthesis-silking interval are related to silk expansion: a spatio-temporal growth analysis in maize plants subjected to soil water deficit. *Plant, Cell and Environment* 31:1349-1360.
- 56 Chenu, K., S.C. Chapman, G.L. Hammer, G. McLean, H.B.H. Salah, and F. Tardieu. 2008. Short-term responses of leaf growth rate to water deficit scale up to whole-plant and crop levels: an integrated modelling approach in maize. *Plant Cell and Environment* 31:378-391.
- 57 Amended Report for MSL0020487: Molecular Analysis of Corn MON 87460 (MSL0022131) (社外秘)

外秘)

- 58 Assessment of the Presence of CSPB Protein in Grain Samples from Multiple Generations of MON 87460 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (MSL0021623) (社外秘)
- 59 Assessment of Insert Segregation for MON 87460 (07-RA-B3-01) (社外秘)
- 60 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87460: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0021662)
- 61 Amended Report for MSL0021185: Assessment of the CSPB and NPTII Protein Levels in Tissues of Drought Tolerant Corn MON 87460 Produced in a 2006-2007 Chilean Field Trial under Well-Watered and Water-Limited Conditions (MSL0021731) (社外秘)
- 62 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in Corn MON 87460: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0021619) (社外秘)
- 63 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA insert in MON87460 (MSL0021750) (社外秘)
- 64 Bioinformatics Evaluation of the CSPB Protein Utilizing the AD8, TOXIN6, and PROTEIN Databases (MSL0021261) (社外秘)
- 65 An Acute Toxicity Study of Cold Shock Protein B Administered by the Oral (Gavage) Route to Mice. Monsanto Study No. CRO-2007-182. (社外秘)
- 66 Updated Bioinformatics Evaluation of the NPTII Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Databases (MSL0021965) (社外秘)
- 67 Fuchs, R.L., J.E. Ream, B.G. Hammond, M.W. Naylor, R.M. Leimgruber, and S.A. Berberich. 1993. Safety Assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) Protein. *Biotechnology* 11:1543-1547.
- 68 Characterization of the *Bacillus subtilis* Cold Shock Protein B (CSPB) Purified from the Grain of Drought Tolerant Corn MON 87460 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the MON 87460-Produced and *E.coli*-Produced CSPB proteins (MSL0021140) (社外秘)
- 69 Assessment of the in vitro Digestibility of the Cold Shock Protein B (CSPB) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0021138) (社外秘)
- 70 Rooney, L.W. and S.O. Serna-Saldivar. 2003. Food use of whole corn and dry-milled fractions. Pages 495-535 in *Corn: Chemistry and Technology*. 2nd edn., P.J. White and A.L. Johnson. (eds.), American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN.
- 71 Immunodetection of the *Bacillus subtilis* Cold Shock Protein B (CSPB) in Corn Grain of MON 87460 Following Heat Treatment (MSL0021186) (社外秘)
- 72 Assessment of the Physicochemical Equivalence of the Plant-Produced NPTII Protein from the Leaf of MON 87460 to the *E. coli*-Produced NPTII Protein (MSL0021145) (社外秘)
- 73 Immuno-detectability of NPTII Protein in the Grain of Insect Protected Corn Event MON 863 After Heat Treatment (MSL17300) (社外秘)
- 74 Herschlag, D. 1995. RNA Chaperones and the RNA Folding Problem. *The Journal of Biological Chemistry* 270:20871-20874.
- 75 Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye. 1997. CspA, the Major Cold-shock Protein of *Escherichia coli*, Is an RNA Chaperone. *The Journal of Biological Chemistry* 272:196-202.
- 76 Schindler, T., P.L. Graumann, D. Perl, S.F. Ma, F.X. Schmid, and M.A. Marahiel. 1999. The

- Family of Cold Shock Proteins of *Bacillus subtilis* - Stability and dynamics *in vitro* and *in vivo*. Journal of Biological Chemistry 274:3407-3413.
- 77 Weber, M.H.W., A.V. Volkov, E. Fricke, M.A. Marahiel, and P.L. Graumann. 2001. Localization of Cold Shock Proteins to Cytosolic Spaces Surrounding Nucleoids in *Bacillus subtilis* Depends on Active Transcription. Journal of Bacteriology 183:6435-6443.
 - 78 Determination of Free Amino Acids in Forage and Grain from MON87460 Grown during the Chile 08/09 growing season. (RAR-10-358) (社外秘)
 - 79 Yield summary for Chile 2008/2009 Field Trial (REG-08-385) (社外秘)
 - 80 Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller. 1993. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. Microbiological Reviews 57:138-163.
 - 81 Price, K.E., J.C. Godfrey, and H. Kawaguchi. 1974. Effect of Structural Modifications on the Biological Properties of Aminoglycoside Antibiotics Containing 2-Deoxystreptamine. Pages 191-307 in Advances in Applied Microbiology. vol. 18, D. Perlman (ed.) Academic Press, New York.
 - 82 Davies, J., and D.I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Annual Review of Microbiology 32:469-518.
 - 83 Davies, J. 1980. Aminoglycoside-Aminocyclitol Antibiotics and Their Modifying Enzymes. Pages 474-489 in Antibiotics in Laboratory Medicine, V. Lorian, (ed.) The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
 - 84 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.