

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**アリルオキシアルカノエート系除草剤
耐性トウモロコシ 40278 系統**

**平成 2 4 年 7 月 5 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	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	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	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	5
(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	5
(2)	遺伝的先祖に関する事項	5
(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	6
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	6
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
(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	7
(5)	宿主依存性に関する事項	7
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	7
(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.....	9
（６）コピー数に関する事項.....	9
（７）安定性に関する事項.....	10
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	10
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	10
（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.....	10
6 組換え体に関する事項.....	11
（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.....	11
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項.....	11
（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.....	11
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	11
（５）宿主との差異に関する事項.....	12
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	13
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	13
（８）不活化法に関する事項.....	13
（９）外国における認可等に関する事項.....	14
（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	14
（11）種子の製法及び管理方法に関する事項.....	14
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.....	14
IV 審議結果.....	14
V 参考文献及び参考資料.....	14

「アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統」に係る 安全性確認

I はじめに

アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統（以下「40278 トウモロコシ」という。）について、平成 22 年 6 月 25 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：アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統
性 質：アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性
申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者：ダウ・アグロサイエンス社

40278 トウモロコシは、グラム陰性桿菌である *Sphingobium herbicidovorans* MH 株に由来するアリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ1遺伝子を一部改変した、改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ1遺伝子（以下「改変 *aad-1* 遺伝子」という。）を導入したトウモロコシである。改変 *aad-1* 遺伝子が改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ1たん白質（以下「改変 AAD-1 たん白質」という。）を発現し、改変 AAD-1 たん白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換することにより、40278 トウモロコシはアリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できる。

導入遺伝子の作出過程において、アンピシリン耐性マーカー遺伝子（以下「*ap^r* 遺伝子」という。）をベクターの選択マーカーとして用いているが、導入に用いた直鎖状 DNA には *ap^r* 遺伝子は含まれないため、40278 トウモロコシに *ap^r* 遺伝子は導入されていない。

40278 トウモロコシと既存の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。そのため、40278 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、40278 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、飼料には主に穀粒が利用される他、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ダ及びトウモロコシジスチラーズグレインソリュブル（DDGS）等）も同様に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

40 (1) 遺伝的素材に関する事項

40278 トウモロコシの宿主に用いられた植物は、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.)のデント種である。40278 トウモロコシに導入された改変 *aad-1* 遺伝子は、グラム陰性桿菌である *Sphingobium herbicidovorans* MH 株由来の *aad-1* 遺伝子の配列を一部改変したものである。

45

(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)は主に飼料用として栽培されており、我が国に飼料として輸入されている。また、食品加工及びバイオエタノールへの利用等から生じた副産物(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)の飼料利用や植物体のサイレージとしての利用など、飼料として広範に利用されている実績を有する。

50

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

40278 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、ラフィノース及びトリプシンインヒビター)の量は明らかになっている(OECD,2002、ILSI, 2006、参考資料 5)。

55

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

40278 トウモロコシは、導入された改変 *aad-1* 遺伝子が改変 AAD-1 たん白質を発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。この点を除けば、40278 トウモロコシは従来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。

60

65

(1)～(4)より、40278 トウモロコシの飼料としての安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

70 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

40278 トウモロコシは、改変 *aad-1* 遺伝子から改変 AAD-1 たん白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。40278 トウモロコシが既存のトウモロコシと異なる点は、上記除草剤に対する耐性をもつことのみであり、その飼料としての利用目的及び利用方法に関して既存のトウモロコシとの相違はない。

75

40278 トウモロコシに散布されるアリルオキシアルカノエート系除草剤は、合成オーキシジ型除草剤(例:2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(以下「2,4-D」という。))とアリルオキシフェノキシプロピオネート(AOPP)型除草剤(例:キザロホップ)がある。2,4-D はオーキシジ様作用を示し、高濃度散布により細胞分裂異常を引き起こし、広葉雑草に除草活性を示す。キザロホ

80 [ップは、脂肪酸生合成の初期段階の酵素であるアセチル CoA カルボキシラーゼを阻害してマ
ロニル CoA 生成・脂肪酸生合成を阻害し、分裂組織を破壊することによりイネ科雑草に除草
活性を示す。]

3 宿主に関する事項

85 (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

40278 トウモロコシの宿主は、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.)
Iltis) Hi-II 系統(デント種)を使用している。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

90 植物学的起源に関しては、テオシント (*Zea mexicana*) 又はトリプサクムである
と推測されている。栽培種の原因は、メキシコ、ペルー、ボリビア、グアテマ
ラ地域の 2 ヶ所以上であるとする説が有力である(戸澤英男, 2005)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

95 トウモロコシには、有害生理活性物質の生産は知られていない(White and
Pollack, 1995)。栄養阻害物質としては、フィチン酸、ラフィノース及びトリプシ
ンインヒビターが知られている。なお、トリプシンインヒビターについては、ト
ウモロコシ中の含有量が低いため、栄養学的に問題にはならないとされている
(OECD, 2002)。

100

(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

105 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(戸澤英男, 2005)、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

110 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

115 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。多
くの品種では、雄穂が抽出して花粉が飛散し、その数日後に雌穂の先端から絹糸
が抽出する。受粉の多くは、抽出した絹糸に他の株の雄穂から飛散してきた花粉
による風媒の他家受粉である。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=36~108)がある。テオ
シントはトウモロコシと交雑可能であるが、我が国には自生していない(戸澤英男,

120 2005)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

125 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(FAOSTAT, 2009、財務省貿易統計, 2009、戸澤英男, 2005)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

130 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

135 トウモロコシは夏型一年生植物であり、越冬性がない。また、種子の休眠性は極めて低く、前年に栽培され、こぼれ落ちた種子であっても、多くの場合翌年の春に発芽する可能性は極めて低い。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

140 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生産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

145 40278 トウモロコシには、プラスミド pDAS1740 から得られた直鎖状 DNA 断片が導入されている。pDAS1740 の基となったベクターは、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 である。

(2) 性質に関する事項

150 プラスミド pUC19 の塩基数は 2,686bp である。プラスミド pUC19 の塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている。また、プラスミド pUC19 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、既知の有害塩基配列を含まない(参考資料 17)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

155 40278 トウモロコシの作出に用いたプラスミド、pDAS1740 は、*ap^r* 遺伝子を有し、アンピシリン耐性を付与されているが、ウィスカー法 (Tomson *et al.*, 1995) による植物細胞への目的遺伝子の導入に用いた直鎖状 DNA には *ap^r* 遺伝子が含まれていないため、40278 トウモロコシには *ap^r* 遺伝子は導入されていない。サザンブロット法及び PCR 法を実施した結果、40278 トウモロコシ中に *ap^r* 遺伝子が導入されていないことが確認された(参考資料 1, 2)。

160

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 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。

165 (5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pUC19 に含まれる遺伝子の性質は全て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は含まれていない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

170 改変 *aad-1* 遺伝子を、pUC19 を基に構築した中間プラスミドに組み込み、プラスミド pDAS1740 を作成している(参考資料 21)。プラスミド pDAS1740 を制限酵素 *Fsp*I により切り出し、直鎖状 DNA を得ている。

(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

175 直鎖状DNAの宿主への挿入はウィスカー法¹(Thompson *et al.*, 1995)により行われ、挿入されたゲノム上の位置についても明らかにされている。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

180 ①名称、由来及び分類に関する事項

改変 *aad-1* 遺伝子は、土壤中に存在するグラム陰性桿菌 *Sphingobium herbicidovorans* MH 株に由来する。当該菌株は、*Sphingomonas herbicidovorans* MH 株として土壌から単離された(Zipper *et al.*, 1998)。その後、*Sphingomonas herbicidovorans* は *Sphingobium herbicidovorans* として新たに *Sphingobium* 属に分類された(Takeuchi *et al.*, 2001)。

185

②安全性に関する事項

Sphingomonas 属の *Sphingomonas paucimobilis* 及び *Sphingomonas parapaucimobilis* は日和見病原菌として知られているが(Busse *et al.*, 1999)、*Sphingobium herbicidovorans* がヒトや家畜に対して病原性を有するというこ

190

とは報告されていない。また、*Sphingomonas elodea* が生産する多糖類であるジェランガムは、食品添加物として利用されている。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

195 改変 *aad-1* 遺伝子は、*Sphingobium herbicidovorans* MH 株由来の *aad-1* 遺伝子をもとに、*aad-1* 遺伝子がコードするアミノ酸配列は変更せず、トウモロコシに

¹ 遺伝子導入手法の1つ。直鎖状 DNA と針状のシリコンカーバイトウィスカー繊維を植物の胚懸濁液に加え、攪拌することにより、シリコンカーバイトウィスカー繊維が細胞に穴を開け、直鎖状 DNA を宿主へ導入する。

における AAD-1 たん白質の発現が最適化するように、塩基配列が改変されている(Wright *et al.*, 2009)。また、クローニングサイト導入により、アミノ酸配列の N-末端から 2 番目にアラニンが追加されている(参考資料 18)。

4 の (6) に記載した直鎖状 DNA は、ウィスカー法(Thompson *et al.*, 1995)により宿主へ導入している。直鎖状 DNA が導入された細胞を、アリルオキシアルカノエート系除草剤を含む培地で培養することにより選抜し、植物体に再生後、アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性能を確認し、40278 トウモロコシを得ている(参考資料 19)。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

改変 *aad-1* 遺伝子は、トウモロコシ由来のユビキチン 1 プロモーター(*ZmUbi1*)によって転写が開始される。

② ターミネーターに関する事項

改変 *aad-1* 遺伝子は、トウモロコシ由来のパーオキシダーゼターミネーター(*ZmPer5 3'UTR*)によって転写が終了する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

全ての挿入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は含まれていない。各構成要素の機能は次項のとおり。

(4) 性質に関する事項

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 *aad-1* 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
<i>RB7 MAR v3</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域(Hall <i>et al.</i> , 1991)。改変 AAD-1 たん白質の発現を安定させる(Allen <i>et al.</i> , 2000、Halweg <i>et al.</i> , 2005)。
<i>ZmUbi1</i>	トウモロコシ由来のユビキチン 1 プロモーターで、エクソン及びイントロン領域を含む(Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体の全体において遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>aad-1</i>	グラム陰性桿菌である <i>Sphingobium herbicidovorans</i> 由来、改変 AAD-1 たん白質を発現させる。
<i>ZmPer5 3'UTR</i>	トウモロコシ由来のパーオキシダーゼターミネーター(Ainley <i>et al.</i> , 2002)。遺伝子の転写を終止する。
<i>RB7 MAR v4</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域(Hall <i>et al.</i> , 1991)。改変 AAD-1 たん白質の発現を安定させる(Allen <i>et al.</i> , 2000、Halweg <i>et al.</i> , 2005)。

【 改変 *aad-1* 遺伝子の機能 】

40278 トウモロコシで発現する改変 AAD-1 たん白質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である R 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である(Wright *et al.*, 2009)。40278 トウモロコシは、改変 AAD-1 たん白質の作用により、アリルオキシアルカノエート系除草剤(参考資料 20)に酸素を導入することにより、除草活性のない化合物に変換し、除草剤耐性を示す。例えば、改変 AAD-1 たん白質は除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(以下「2,4-D」という。)に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノール(以下「2,4-DCP」という)とグリオキシル酸に変換する(図 1)。また、改変 AAD-1 たん白質は、除草剤キザロホップを同様に除草活性のないキザロホップフェノールとピルビン酸に変換する(図 1)。

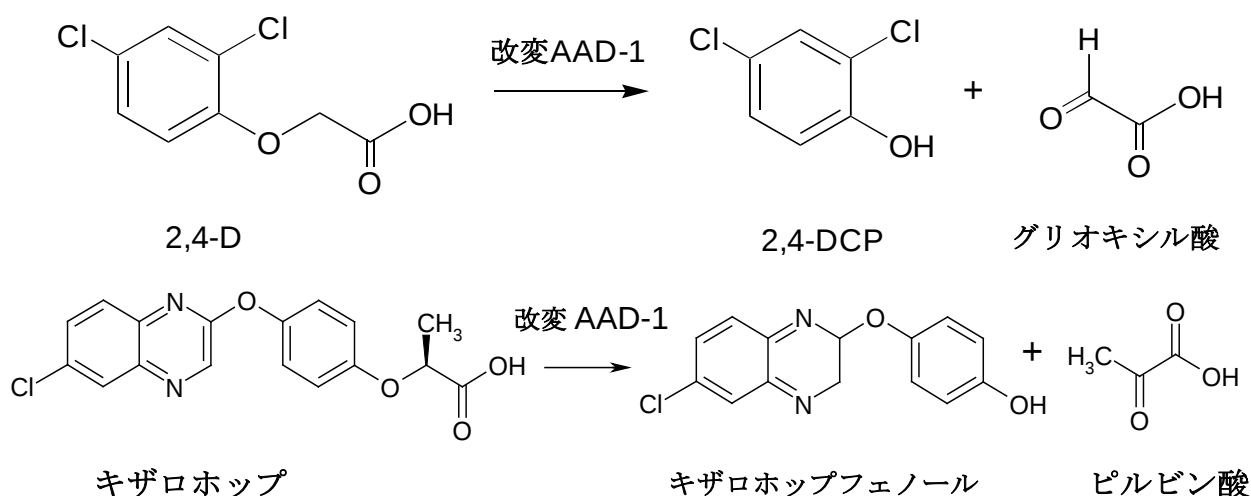


図 1 改変 AAD-1 たん白質の作用機作

(5) 純度に関する事項

挿入遺伝子とその調節遺伝子を含む直鎖状 DNA の塩基数は 6,236bp である。その塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、プラスミド pDAS1740 から制限酵素 *Fsp*I により切り出した直鎖状 DNA は、カラム・クロマトグラフィーにより精製・純化されている。

(6) コピー数に関する事項

導入された遺伝子のコピー数を調べるため、複数世代の 40278 トウモロコシと比較対照の非組換えトウモロコシから抽出したゲノム DNA を用い、サザンブロット分析を実施した。その結果、40278 トウモロコシには 1 コピーの改変 *aad-1* カセットが導入されていることが明らかとなった(参考資料 1, 2)。

導入に用いた直鎖状 DNA 領域の各構成要素が挿入されていることの確認のため、挿入遺伝子領域及び宿主ゲノムの導入箇所の境界領域のクローニング及び塩基配列解析を実施した(参考資料 3, 22)。その結果、挿入遺伝子領域の 5' 末端側で 1,081bp、3' 末端側で 339bp が欠失していることが明らかとなった。また、挿入遺

255

伝子領域の 5' 末端において 21bp が新たに挿入されていること、トウモロコシゲノムから 2bp が欠失していること及び 3' 末端において 1bp が新たに挿入されていることが明らかにされている。さらに、*ZmPer5 3'UTR* ターミネーターにおいて非翻訳領域にある 5,212 番目のチミンがシトシンに置換されていた。その他の挿入遺伝子は完全な形で挿入されていることが確認された。挿入遺伝子領域の 5' 末端において新たに挿入が確認された 21bp について分析を進めた結果、挿入遺伝子要素である *RB7 MAR v3* と 8 塩基、*Zm UBi1* プロモーターと 13 塩基一致した(参考資料 4)。

260

40278 トウモロコシの挿入遺伝子領域 5' 末端及び 3' 末端の近傍配列を宿主であるトウモロコシゲノムの配列と比較した結果、2bp の欠失を除き、一致したことから、近傍配列はトウモロコシゲノム由来であると考えられた(参考資料 3)。

265

BLASTn 及び BLASTx による近傍配列の分析から、遺伝子の導入によりトウモロコシ内在性の遺伝子が破壊されていないことが確認されている(参考資料 4)。

(7) 安定性に関する事項

270

40278 トウモロコシに導入された改変 *aad-1* 遺伝子が後代に安定して遺伝していることを調べるため、6 世代の 40278 トウモロコシから DNA を抽出し、サザンブロット分析を行った(参考資料 1, 2)。その結果、供試したすべてのサンプルにおいて、*aad-1* 遺伝子が検出され、40278 トウモロコシに導入された改変 *aad-1* 遺伝子は、世代間及び同一世代内で安定していることを確認された。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

275

40278 トウモロコシにおける改変 AAD-1 たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 5)。2008 年に米国及びカナダで行ったほ場試験(6ヶ所)において組織サンプルを採取し、組織サンプル中の改変 AAD-1 たん白質発現量を測定した結果、各生育期において調査した全ての組織サンプルから改変 AAD-1 たん白質が検出された。

280

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

285

4 の (3) の記載のとおり、植物細胞への目的遺伝子の導入に用いた直鎖状 DNA には *ap^r* 遺伝子が含まれていないため、40278 トウモロコシには *ap^r* 遺伝子は導入されていない。このことについて、サザンブロット法及び PCR 法を実施し、確認されている(参考資料 1, 2)。

(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

290

挿入遺伝子領域 5' 末端及び 3' 末端の近傍配列について、オープンリーディングフレーム(ORF) 検索を行った結果、7 個の ORF が検出された。検出された ORF について、毒素たん白質との相同性検索を行った結果、いずれも既知の毒素たん白質との相同性は認められなかった(参考資料 4)。

6 組換え体に関する事項

295 (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

40278 トウモロコシに導入されたのは、改変 *aad-1* 遺伝子のみである。40278 トウモロコシには、改変 AAD-1 たん白質の発現によりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。この点を除けば、40278 トウモロコシと既存種との相違は認められない。

300

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

既知の毒性たん白質と改変 AAD-1 たん白質のアミノ酸配列の相同性を調査した結果、既知の毒素たん白質と相同性がないことが確認された(参考資料 6, 7)。

305 (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

試験には *Pseudomonas fluorescens* で生産した改変 AAD-1 たん白質を用いている。*P. fluorescens* から調製した改変 AAD-1 たん白質と 40278 トウモロコシ中で発現する改変 AAD-1 たん白質との同等性は、SDS-PAGE 分析、ウエスタンブロット分析、グリコシル化の有無、MALDI-TOF 質量分析法、N-末端及び C-末端配列の測定により確認されている(参考資料 8)。

310

①人工胃液に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-1 たん白質を用い、人工胃液中での改変 AAD-1 たん白質サンプルの消化性を、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、改変 AAD-1 たん白質は、人工胃液中で 30 秒以内に速やかに消化された(参考資料 9)。

315

②人工腸液に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-1 たん白質を用い、人工腸液中での改変 AAD-1 たん白質サンプルの消化性を、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、改変 AAD-1 たん白質は、人工腸液中で 1 分以内に速やかに消化された(参考資料 10)。

320

③加熱処理

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-1 たん白質を用い、加熱処理による改変 AAD-1 たん白質の安定性を、SDS-PAGE 法、ELISA 法及び酵素活性測定により確認した。その結果、95℃、30 分の加熱に対しても分子量の変化は生じないものの、免疫反応性及び酵素活性は 50℃、30 分の加熱により失われたことから、AAD-1 たん白質は、熱に不安定であると考えられた(参考資料 11)。

325

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

合成オーキシン型除草剤及びアリルオキシフェノキシプロピオネート型除草剤の中で、アリルオキシアルカノエート構造を持つメコプロップ、ジクロルプロップ、シハロホップ及びキザロホップのような除草剤はアリルオキシアルカノエート系除草剤と呼ばれ、AAD-1 たん白質は、アリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換する(図 1、Müller *et al.*, 2006、Wright *et al.*, 2010)。

330

335 アリルオキシアルカノエート系除草剤及びその類似体に対する改変 AAD-1 たん
白質の活性比較を行った結果(Wright *et al.*, 2009)、改変 AAD-1 たん白質は、多
くのアリルオキシアルカノエート系除草剤の R 体を特異的に分解すること、アル
340 カノエート部位にメチル基がある方がより強く反応すること、光学異性体がない
(アルカノエート部位にメチル基がない)2,4-D に対しては、弱いながら活性を示す
ことが明らかとなった。

また、植物の代謝経路においてアリルオキシアルカノエート基をもつ化合物の
存在は知られていないが、植物体中に存在するアリルオキシアルカノエート構造
をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った化合物（インドール-3-酢酸、アブ
シジン酸、ジベレリン酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(エチレン前駆体)、
345 桂皮酸、クマル酸及びシナピン酸）及び植物の代謝経路において重要な役割を果
たしているアミノ酸について、改変 AAD-1 たん白質の作用の有無を確認した。そ
の結果、高濃度の改変 AAD-1 たん白質を作用させた場合に、インドール-3-酢酸
と桂皮酸から基質の酸化を示す酸化物が検出された。しかしながら、その反応速
度は非常に遅く、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は
350 低いと考えられた(参考資料 12)。

(5) 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で、2,4-D 散布区、キザロホップ散布区、2,4-D 及びキザ
ロホップ散布区、除草剤無散布区を設定し、各区において栽培された 40278 トウモ
355 ロコシ及び除草剤無散布区において栽培された対照の非組換えトウモロコシの①
主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ミネラル類、⑤ビタミン類、
及び⑥栄養阻害物質の分析を行った(参考資料 5)。

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、脂質、灰分、炭水化物、酸性デ
360 タージェント繊維(ADF)及び中性デタージェント繊維(NDF))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又は商業栽培品種の文献値との間
に遺伝子組換え操作に起因する非意図的な差異は認められなかった(Watson (1982)、
Watson (1987)、OECD (2002)、ILSI (2006))。

②脂肪酸組成

穀粒中の主要脂肪酸（パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、
リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸及びベヘン酸）について分析を行った
結果、いずれの脂肪酸も対照に用いた非組換えトウモロコシ又は商業栽培品種の
文献値との間に差異は認められなかった(Watson (1982)、Codex (2005)、ILSI
370 (2006))。

③アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸組成（メチオニン、システイン、リシン、トリプトファン、ト
レオニン、イソロイシン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、アルギニン、フェニ

- 375 ルアラニン、グリシン、アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、セリン及びチロシン) について分析を行った結果、いずれのアミノ酸も対照に用いた非組換えトウモロコシ又は商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった(Watson (1982)、OECD (2002)、ILSI (2006))。
- 380 ④ミネラル類
穀粒及び茎葉のミネラル類(リン、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、カリウム、亜鉛、モリブデン)について分析した結果、モリブデン含有量が対照の非組換えトウモロコシと比較して 1 つの試験区で有意に減少したが、その他の試験区では有意差がないことから、遺伝子組換え操作により生じた差異ではないと考えられた。その他のミネラルでは対照の非組換えトウモロコシ又は商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった(Watson (1982)、Watson (1987)、OECD (2002)、ILSI (2006))。
- 385
- ⑤ビタミン類
390 穀粒中のビタミン類 (ビタミン A、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6、ビタミン C、パントテン酸、ナイアシン及び葉酸) について分析を行った結果、ビタミン C の含有量が対照の非組換えトウモロコシと比較して 2 つの試験区で有意に減少したが、その他の試験区では有意差がないことから、遺伝子組換え操作により生じた差異ではないと考えられた。その他のビタミンでは対照に用いた非組換えトウモロコシ又は商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった(Watson (1982)、Watson (1987)、OECD (2002)、ILSI (2006))。
- 395
- ⑥栄養阻害物質
400 穀粒中の栄養阻害物質 (フィチン酸、ラフィノース及びトリプシンインヒビター) 及びその他の成分 (イノシトール、P-クマル酸及びフェルラ酸) について分析を行った結果、いずれの栄養阻害物質及びその他の成分も対照に用いた非組換えトウモロコシ又は商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった(OECD (2002)、ILSI (2006))。
- 405 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項
米国及びカナダにおいて行われた栽培試験において、40278 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。
- 410 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
40278 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。
- (8) 不活化法に関する事項

415 40278 トウモロコシは、アリルオキシアルカノエート系除草剤以外の除草剤散布又は耕起等による機械的処理など、トウモロコシを枯死させる既存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

420 カナダにおいて、カナダ食品検査庁（CFIA）へ 2009 年 11 月に飼料及び環境に対する安全性確認の申請を行った。

 米国において、米国食品医薬品局（FDA）により 2011 年 4 月に食品・飼料としての安全性が確認された。

425 オーストラリア及びニュージーランドにおいて、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)より 2011 年 10 月に食品としての安全性が確認された。

 台湾において、台湾行政院衛生署食品藥物管理局より 2011 年 11 月に食品としての安全性が確認された。

430 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

 40278 トウモロコシの栽培方法は、生育期の雑草防除にアリルオキシアルカノエート系除草剤を使用できることを除き、既存のトウモロコシ品種の栽培方法と同じである。

435 40278 トウモロコシには、アリルオキシアルカノエート系除草剤の 2,4-D とキザロホップを使用できるとしている。また、カナダではメコプロップと MCPA もトウモロコシへの農薬登録がある。そこで、40278 トウモロコシへの使用が想定される除草剤 2,4-D、キザロホップ、メコプロップ、MCPA 及びその代謝産物について、40278 トウモロコシへの残留を検証した結果、安全上の問題は認められなかった(OECD SIDS、EPA, 2004、食品安全委員会, 2005、EPA, 2007、参考資料 13, 14, 15, 16)。

440

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

 40278 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は既存のトウモロコシと同じである。

445

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該当しない。

450 IV 審議結果

 アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 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、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。

455 V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Ainley, M., Armstrong, K., Belmar, S., Folkerts, O., Hopkins, N., Menke, M.A., Pareddy, D., Petolino, J. F., Smith, K., Woosley, A. (2002) Regulatory Sequences from Transgenic Plants. U.S. Patent US6384207.
- 2 Allen G.C., Spiker S. and Thompson, W.F. (2000) Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* **43**, 361-376.
- 3 Busse H.-J., Kampf P., Denner E.B.M. (1999) Chemotaxonomic characterisation of *Sphingomonas*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 242-251.
- 4 Christensen A.H., Sharrock R.A., 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 Molecular Biology* **18**, 675-689.
- 5 Codex Alimentarius Commission (2005) Codex Standard for Named Vegetable Oils (CX-STAN 210-1999), 1-13.
- 6 EPA (2004) Reregistration Eligibility Decision (RED) for MCPA (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) List A Case 0017
- 7 EPA (2007) Reregistration Eligibility Decision (RED) for Mecoprop-p (mcpp)
- 8 FAOSTAT (2009) <http://faostat.fao.org>
- 9 Hall G., Allen G.C., Loer D.S., Thompson W.F., Spiker S. (1991) Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(20), 9320-9324.
- 10 Halweg C., Thompson W.F., Spiker, S. (2005) The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell* **17**, 418-429.
- 11 ILSI (2006) <http://www.cropcomposition.org>
- 12 Müller T.A., Fleischmann T., van der Meer J.R., Kohler H.-P.E. (2006) Purification and Characterization of Two Enantioselective α -Ketoglutarate-Dependent Dioxygenases, RdpA and SdpA, from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4853-4861.
- 13 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.' (OECD, Paris)
- 14 OECD SIDS: Screening Information Datasets (SIDS) for High Volume Chemicals. <http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECD/SIDS/INDEXCHEMIC.htm>
- 15 Takeuchi M., Hamana K., Hiraishi A. (2001) Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1405-1417.
- 16 Thompson J.A., Drayton P.R., Frame B.R., Wang K., Dunwell J.M. (1995) Maize transformation utilizing silicon carbide whiskers: A review. *Euphytica* **85**, 75-80.
- 17 Watson S.A. (1982) Corn : Amazing Maize. General Properties. pp.3-29. In *CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture*, Vol. II : Part 1 Plant Products. I.A. Wolff(ed). CRC Press, Inc., Florida.
- 18 Watson S.A. (1987) Structure and Composition. pp. 53-82. In *Corn : Chemistry and*

- Technology, S.A. Watson and P.E. Ransted (eds). American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota.
- 19 White P.J., Pollak L.M. (1995) Corn as a food source in the United States :Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. *Cereal Foods World* **40**, 756-762.
 - 20 Wright T.R., Lira J.M., Merlo D.J., Hopkins N. (2009) Novel Herbicide Resistance Genes. U.S. Patent #2009/0093366.
 - 21 Wright T.R., Shan G., Walsh T.A., Lira J.M., Cui C., Song P., Zhuang M., Arnold N.L., Lin G., Yau K., Russell S.M., Cicchillo R.M., Peterson M.A., Simpson D.M., Zhou N., Ponsamuel J., Zhang Z. (2010) Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by Aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *PNAS* **107**, 20240-20245.
 - 22 Zipper C., Bunk M., Zehnder A. J. B., Kohler H.-P. E. (1998) Enantioselective Uptake and Degradation of the Chiral Herbicide Dichlorprop [(*RS*)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propanoic acid] by *Sphingomonas herbicidovorans* MH. J. Bacteriol., **180**, 3368-3374.
 - 23 財務省貿易統計 (2009) <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm>
 - 24 食品安全委員会 (2005) ‘農薬評価書、キザロホップエチル’
 - 25 戸澤 英男 (2005) ‘トウモロコシ-歴史・文化、特性・栽培、加工・利用-、(社)農山漁村文化協会

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Zhuang M., Mo J., Poorbaugh J.D., Richey K.A., Cruse J., Thomas A. (2009) ‘Molecular Characterization of AAD-1 Corn Event DAS-40278-9.’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 2 Bryan J. and Zhuang M. (2010) ‘Supplemental Molecular Characterization of AAD-1 Corn Event DAS-40278-9 for Submission in Japan’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 3 Mo J., Zhou N., Poorbaugh J. (2009) ‘Cloning and Characterization of DNA Sequence in the Insert and the Flanking Border Regions of AAD-1 Corn Event DAS-40278-9’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 4 Song P. (2009) ‘Bioinformatics Analysis of the Insert and Its Flanking Border Sequences in Maize Event DAS-40278-9’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 5 Phillips A., Herman R., Thomas A., Sosa M. (2010) ‘Field Expression, Nutrient Composition Analysis and Agronomic Characteristics of a Hybrid Maize Line Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) - Event DAS-40278-9’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 6 Larrinua I., Herman R., (2007) ‘AAD1 Amino-Acid Homology Search for Similarity to Toxins’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 7 Herman R. (2007) ‘AAD1 Amino-Acid Homology Search for Similarity to Allergens’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 8 Schafer B., Embrey S. (2009) ‘Characterization of the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) Protein Derived from Transgenic Maize Event DAS-40278-9’ (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)

- 9 Embrey S., Korjagin V. (2008a) '*In Vitro* Simulated Gastric Fluid Digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (abbreviation AAD-1)' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 10 Embrey S., Korjagin V. (2008b) '*In Vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1)' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 11 Schafer B. (2010) 'Summary of the Effect of Heat Treatment on a Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 Protein' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 12 Cicchillo R., Godbey J., Wright T. (2010) 'Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1)' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 13 Ma M. (2010) 'Study profile Template for A Nature of the Residue Study with [14C]-2,4-D DMA Applied to AAD-1 Corn (Event278)' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 14 Culligan J. (2010) 'Magnitude of the Residue of 2,4-D and Quizalofop-P-ethyl in/on Herbicide Tolerant Field Corn Containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-1 (AAD-1) Gene' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 15 Stagg N.J., Cleveland C.B., Eisenbrandt D.L., Blewett T.C., Rosser S.W., Gollapudi B.B., Carney E.W., Ellis-Hutchings R.G. (2010) '2,4-Dichlorophenol: Relevance for 2,4-D Treated Corn Containing the DAS AAD-1 Trait' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 16 Liu D. (2010) 'Study profile Template for A Nature of the Residue Study with [14C]-Quizalofop Applied to AAD-1 Corn (Event278)' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana)
- 17 プラスミド pUC19 の塩基配列
- 18 改変 *aad-1* と *aad-1* の塩基配列及びアミノ酸配列比較
- 19 直鎖状 DNA の作成過程
- 20 改変 AAD-1 たん白質が活性を示す除草剤
- 21 プラスミド pDAS1740 の塩基配列
- 22 トウモロコシ 40278 系統の挿入遺伝子配列及び隣接領域配列