

**組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認**

**除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び  
除草剤グリホサート耐性トウモロコシ  
MON87427 系統**

**平成24年12月11日  
農林水産省消費・安全局  
畜水産安全管理課**

## 目次

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	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	5
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	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	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	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	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	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	8
(3) 構造に関する事項	8
(4) 性質に関する事項	9
(5) 純度に関する事項	10
(6) コピー数に関する事項	10
(7) 安定性に関する事項	11
(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	11
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
(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	12
6 組換え体に関する事項	13
(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	13
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	13
(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	13
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	14
(5) 宿主との差異に関する事項	15
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	16
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	16
(8) 不活化法に関する事項	16
(9) 外国における認可等に関する事項	16
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	16
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	16
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	16
IV 審議結果	16
V 参考文献及び参考資料	17

# 「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統」に係る安全性確認

## I はじめに

5 除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ  
MON87427 系統（以下「MON87427 トウモロコシ」という。）について、平成 24 年  
4 月 2 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

10 飼料名：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコ  
シ MON87427 系統

性 質：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔、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

15

MON87427トウモロコシは、除草剤グリホサートにより雄性不稔化を誘発し、除草  
剤グリホサートに対する耐性を付与するため、*Agrobacterium sp.* CP4 株に由来する  
改変*cp4 epsps*遺伝子が導入されている。

20 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、グリホサート  
により機能を阻害される植物細胞内に存在する5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸  
合成酵素(EPSPS)と異なり、グリホサート存在下でも影響を受けずに芳香族アミノ酸を  
合成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。

25 MON87427トウモロコシでは、改変*cp4 epsps*遺伝子とともに導入されたプロモータ  
ー等の性質により、雄性生殖組織において改変CP4 EPSPSたん白質が発現しないか、  
発現しても微量である。そのため、MON87427トウモロコシにグリホサートを散布し  
た場合、グリホサートが雄性生殖組織には除草活性を示すことで、花粉形成が抑制され、  
雄性不稔となる。

また、改変CP4 EPSPSたん白質は、選択マーカーとして、MON87427トウモロコシ  
の作出過程における形質転換体の選抜にも用いられている。

30 MON87427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、MON87427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、MON87427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  
35 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、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。

40 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

MON87427 トウモロコシを作出するのに用いた宿主は、イネ科 (Gramineae) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するデント種のトウモロコシ (*Zea mays* L.) である。

45 MON87427 トウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。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 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ことを除けば同一である。

50 MON87427 トウモロコシは、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ている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

55 MON87427 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

60 MON87427 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, 2006、White and Pollak, 1995、参考資料 16)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

65 MON87427 トウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS たん白質をコードしており、改変 CP4 EPSPS たん白質の働きにより MON87427 トウモロコシに除草剤グリホサートに対する耐性を付与している。なお、MON87427 トウモロコシでは改変 CP4 EPSPS たん白質が組織特異的に発現している。花粉の形成に重要な雄性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しないか、発現しても微量であるため、除草剤グリホサートに対する耐性を有していない。この MON87427 トウモロコシ特有の除草剤グリホサート耐性能を利用することにより、雄性不稔形質を用いてハイブリッド種子を効率的に生産することが可能となる。これらの点を除けば、MON87427 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、MON87427 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。

80 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON87427 トウモロコシは、改変 *cp4 epsps* 遺伝子とともに導入したプロモーター及びイントロン (*e35S* 及び *hsp70*) の機能により、栄養組織 (葉、茎、根の組織など、生殖組織以外の組織) 及び雌性生殖組織 (穀粒及び絹糸になる組織など) において改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しており、これらの組織に除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている (参考資料 1)。しかし、このプロモーターとイントロンの組合せにより、雄性配偶体の発生に重要な雄性生殖組織 (花粉小孢子及びタペート細胞) は、改変 CP4 EPSPS たん白質を発現させないか、発現させても微量であるため (参考資料 1)、除草剤グリホサート耐性を有さない。これにより、除草剤グリホサート散布により雄性不稔化させた自殖系統の MON87427 トウモロコシをハイブリッド種子生産の雌親として利用することができ、その結果、現在、ハイブリッド種子の生産に用いられている除雄作業の必要性がなくなるか、大幅に削減することができる。

95 また、MON87427 トウモロコシは、除草剤グリホサートを初期栄養生長期に適切な量で散布することにより、雑草防除が可能となる。

95

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

100 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、ワキシーコーン及びポッドコーンなどに分類される (柿本, 1981)。MON87427 トウモロコシの作出に用いた宿主は、デント種トウモロコシ (*Zea mays* L.) の LH198 × HiII である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

105 現在、トウモロコシの原産地についての決定的な説はないが、一般には紀元前 5,000 年のメキシコ又はグアテマラが原産地と考えられている。その遺伝的先祖についても決定的な説はないが、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 (Aldrich *et al.*, 1986、Galinat, 1988、Jugenheimer, 1976)。

110

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

115 トウモロコシでは抗栄養素としてフィチン酸やラフィノースなどが知られており、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 - 1.57% DW、ラフィノースが 0.02 - 0.32% DW である (ILSI, 2006)。しかし、トウモロコシでは毒性物質の生産は知られていない (White and Pollak, 1995)。

(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または定着することはない。

120

(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。

125

(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

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。

130

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, 1981)。

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)、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ので、MON87427 トウモロコシとの交雑の可能性はない。

135

140

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

MON87427 トウモロコシはデント種に分類されるトウモロコシであり、デント種の主な利用は飼料であるが、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、飼料月報, 2010、財務省, 2011)。

145

(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

150

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、土壌温度が 10°C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)。

155

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°C以下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。

(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他のトリプサカム属種において有害生理活性物質

160 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

165 ベクターB は MON87427 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の中間プラスミドである。なお、ベクターB の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

##### (2) 性質に関する事項

170 ベクターB の塩基数は 6,500 bp である。また、ベクターB 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 2)、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

175 ベクターB には  $\beta$ -ラクタマーゼをコードし、アンピシリン耐性を付与する *blaTEM* 遺伝子が含まれており、*E. coli* 中での選択マーカーとして用いられている。

##### (4) 伝達性に関する事項

180 ベクターB 及びその構築に用いられた中間プラスミドは伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

##### (5) 宿主依存性に関する事項

185 ベクターB には外側骨格領域に *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) における自律増殖のための広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *ori V* と、*E. coli* における自律増殖のためのプラスミド pBR322 に由来する複製開始領域 *ori-pBR322* が組み込まれているが、植物や家畜等では増殖することは出来ない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON87427 トウモロコシ中には、これら領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認されている(参考資料 6)。

190

##### (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

195 MON87427 トウモロコシの作出には、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 (参考資料 3)を用いている。本導入用プラスミドは、中間プラスミドであるベクター A~F を用いて作出されており(参考資料 4)、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域を有している。

##### (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

MON87427 トウモロコシは、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従来トウモロコシ品種 LH198 ×

200 HiII の未成熟胚に導入することにより作出されている。改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA は、トウモロコシゲノムへの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。

## 5 挿入遺伝子に関する事項

### 205 (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

MON87427 トウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

#### 210 ②安全性に関する事項

*Agrobacterium* sp. CP4 株は土壌中に一般的に存在する微生物類の 1 つであり、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

### (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

215 MON87427 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMAP1043 は、中間プラスミドであるベクターA~F から構成される合成ベクターである。

従来トウモロコシ品種 LH198 × HiII の未成熟胚を、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 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、生育特性等の評価を行った。

225 得られた再分化個体 (R<sub>0</sub>) は LH198 と交配を行い、その後 LH198 を反復親として、3 回戻し交配を繰り返した。得られた LH198 BC3F1 世代に除草剤グリホサートを散布し、選抜を行った。さらに選抜された個体を自殖することによりホモ個体を作成し、定量 PCR 分析を用いて、その個体で導入遺伝子がホモで存在していることを確認した。そのホモ個体の中から、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 MON87427 トウモロコシを選抜した。

230

### (3) 構造に関する事項

#### ① プロモーターに関する事項

235 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは、*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 35S) のプロモーター (Odell *et al.*, 1985) をもとに作成されたプロモーターで、トウモロコシの花粉での活性がわずかである (Hamilton *et al.*, 1992)。*e35S* プロモーターは、CaMV 35S プロモーターの活性を高める機能を有するドメインをタンデムの状態で 2 つ有しているため (McPherson and Kay, 1994)、CaMV 35S プロモーターと比べると、組織特異的な発現様式を変えることなく

240 転写活性が高められている。*e35S*プロモーターも *CaMV 35S*プロモーターと同様にトウモロコシの花粉及びタペート細胞での活性が低いことが確認されている (CaJacob *et al.*, 2004)。また、MON87427 トウモロコシに導入した *hsp70* イントロンは、*e35S* プロモーターの発現様式を変化させることなく、栄養組織及び雌性組織における改変 CP4 EPSPS たん白質の発現を高めている (Brown and Santino, 1997、Callis *et al.*, 1987)。

245 ② ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来のノパリン合成酵素遺伝子 (*nopaline synthase* (*nos*)) の 3' 末端非翻訳領域であり、転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Bevan *et al.*, 1983)。

250 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

255 導入用プラスミド PV-ZMAP1043 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。

(4) 性質に関する事項

260 導入用プラスミド PV-ZMAP1043 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 *cp4 epsps* 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>e35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス ( <i>CaMV 35S</i> ) のプロモーター (Odell <i>et al.</i> , 1985) をもとに作成されたプロモーター。トウモロコシの花粉及びタペート細胞での活性が低い(CaJacob <i>et al.</i> , 2004)。
<i>hsp70</i> イントロン	<i>Z. mays</i> (トウモロコシ) 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で、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>CTP2</i> ターゲティング配列	<i>A. thaliana</i> (シロイヌナズナ) 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 (Herrmann, 1995、Klee <i>et al.</i> , 1987)。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 (Barry <i>et al.</i> , 2001、Padgett <i>et al.</i> , 1996)。
<i>nos</i> ターミネーター	転写を終結させポリアデニル化を誘導する <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域 (Bevan <i>et al.</i> , 1983)。

### 【 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能 】

265 除草剤グリホサートは植物細胞内の 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、植物の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸の合成を阻害する (Steinrücken and Amrhein, 1980)。その結果、植物は必須アミノ酸の欠乏に陥り、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、除草剤グリホサートに対する親和性は低い  
270 ため、除草剤グリホサート存在下においても改変 CP4 EPSPS たん白質が除草剤グリホサートと結合しないことから、芳香族アミノ酸を生産し続けることができる (Padgett *et al.*, 1996)。

また、MON87427 トウモロコシには *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せが導入されている。*e35S* プロモーターはトウモロコシの花粉粒となる花粉小胞子及び花粉へ養分を供給するタペート細胞などの雄性生殖組織での発現活性はわずかであるが (CaJacob *et al.*, 2004)、栄養組織及び雌性組織での発現活性は高い (Kay *et al.*, 1987, CaJacob *et al.*, 2004)。また、*hsp70* イントロンは目的遺伝子の発現箇所での発現活性を高める (Brown and Santino, 1997)。  
275

この *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの働きにより、MON87427 トウモロコシの花粉小胞子及びタペート細胞の雄性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しないか、発現しても微量であるのに対し、栄養組織及び雌性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現している (参考資料 1)。よって、MON87427 トウモロコシは、雄性配偶体の発生に重要な雄性生殖組織においては除草剤グリホサートに対する耐性を持たないが、葉、茎、根の組織、及び穀粒や絹糸などの組織においては除草剤グリホサートに対する耐性を持っている。  
280

そのため、雄穂形成の直前又は雄穂形成期 (トウモロコシの生育段階ではおよそ 8 葉期 (V8) 頃から 13 葉期 (V13) 頃にかけて) という特定の時期に除草剤グリホサートを散布することにより、MON87427 トウモロコシは雄性不稔となる。しかし、除草剤グリホサートの使用基準表示で指定された雑草防除のための散布時期である初期栄養生長期に除草剤グリホサートを散布する場合、この時期には雄性生殖組織は活発に生長していないため、MON87427 トウモロコシの花粉形成に影響を及ぼすことはない。  
285  
290

### (5) 純度に関する事項

導入遺伝子は、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の T-DNA 領域由来の 3,681 bp である。塩基配列解析により、T-DNA に目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。  
295

### (6) コピー数に関する事項

MON87427 トウモロコシに導入された遺伝子 (以下「導入遺伝子」とする) 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、サザンブロット分析を行った。その結果、MON87427 トウモロコシ中の導入用プラスミド PV-  
300

ZMAP1043 の T-DNA 配列はゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピー導入されていることが確認された。また、これらの分析から導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の外側骨格配列などが存在しないことも確認された(参考資料 6)。

305 また、導入遺伝子とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、導入遺伝子及び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-ZMAP1043 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、MON87427 トウモロコシ中の導入遺伝子と、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 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 6)。

310 さらに、MON87427 トウモロコシの導入遺伝子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、導入遺伝子がトウモロコシ内在性の既知の遺伝子を破壊しているか確認した。その結果、MON87427 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 140 bp の欠損が認められた。315 さらに、MON87427 トウモロコシの導入遺伝子の 5'及び 3'末端とトウモロコシゲノム内在性配列との間にそれぞれ 41 bp と 24 bp の付加配列が確認された(参考資料 6)。しかし、BLASTn 及び BLASTx による近傍配列の分析から、導入遺伝子の挿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 7)。

#### 320 (7) 安定性に関する事項

MON87427 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 MON87427 トウモロコシから得られたゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を実施したところ、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを持つ 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 6)。

325 また、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 MON87427 トウモロコシの組織サンプルを用いて改変 CP4 EPSPS たん白質のウエスタンブロット分析を実施したところ、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 8)。

330 さらに、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MON87427 トウモロコシを用いて除草剤グリホサート散布により改変 CP4 EPSPS たん白質の有無を調べた。その結果、3 世代における MON87427 トウモロコシの組織特異的な除草剤グリホサート耐性の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、MON87427 トウモロコシ中の導入遺伝子はメンデルの 335 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

MON87427 トウモロコシにおける改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 1)。米国の 5 ヲ所のほ場から採取された MON87427 340 トウモロコシの組織を供試し、組織サンプル中の改変 CP4 EPSPS たん白質発現量を測定した。その結果、花粉以外のすべての組織サンプル(葉、穀粒、絹糸、黄熟期の地上部、茎葉、根、初期黄熟期の根、収穫直後の根及び地上部)から改

345 変 CP4 EPSPS たん白質が検出された。一方、MON87427 トウモロコシの花粉に  
おける改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量は、検出限界値 (LOD) 以下であるか、  
定量限界値 (LOQ) をわずかに超える程度の非常に低い発現量であるか、又は判定  
不能であった。

350 MON87427 トウモロコシはプロモーターとイントロンの組合せ (*e35S-hsp70*)  
を利用することにより栄養組織及び雌性生殖組織において改変 CP4 EPSPS たん  
白質が発現しており、これらの組織において除草剤グリホサートに対する耐性が  
付与されている。また、*e35S* プロモーターにより、花粉の前駆体である花粉小胞  
子及びタペート細胞において改変 CP4 EPSPS たん白質は発現しないか、発現し  
ても微量であるため、MON87427 トウモロコシにおけるこれらの細胞はグリホサ  
ートに耐性を持たない。したがって、この改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量デ  
ータは、MON87427 トウモロコシの使用目的と一致している。なお、花粉サンプ  
ルにおけるわずかな改変 CP4 EPSPS たん白質の発現は、MON87427 トウモロコ  
シの花粉と共に採取された葯組織の混入、又は *e35S* プロモーター (CaJacob *et*  
355 *al.*, 2004) により花粉において微量の改変 CP4 EPSPS たん白質の発現の可能性が  
考えられた。

#### 360 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

365 導入用プラスミド PV-ZMAP1043 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 T-DNA 領域外に  
存在している (Fling *et al.*, 1985)。なお、MON87427 トウモロコシ中に *aadA* 遺  
伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析で確認されている (参考資料  
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

370 MON87427 トウモロコシの導入遺伝子とその 5' 及び 3' 末端近傍配列の両境  
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  
シ内在性配列から MON87427 トウモロコシ中の導入遺伝子又は両末端付加配列に  
かけて存在し且つ 8 アミノ酸以上の ORF を持つ配列を検索した (参考資料 10)。  
375 その結果、上記の条件を満たす ORF が 14 個確認された。これら 14 個の ORF に  
ついて、既知の毒素、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性検索を  
行った結果、相同性は認められなかった。さらに、連続する 8 つのアミノ酸によ  
る相同性検索も行った。その結果、既知のアレルゲンと相同性は認められなかつ  
た。

380 また、MON87427 トウモロコシ中の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定し、既知の毒素、アレルゲン及びその他の関連す  
る生理活性のあるたん白質との相同性検索を行った (参考資料 11)。その結果、既  
知の毒素、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性は確認されなかつ

た。

385

## 6 組換え体に関する事項

### (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

390

MON87427 トウモロコシに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS たん白質をコードしており、MON87427 トウモロコシに除草剤グリホサートに対する耐性を付与している。しかし、MON87427 トウモロコシでは改変 CP4 EPSPS たん白質が組織特異的に発現し、花粉の形成に重要な雄性生殖組織においては、改変 CP4 EPSPS たん白質の発現がない、又は極めてわずかであるため、除草剤グリホサートに対する耐性を有していない。この点を除けば、MON87427 トウモロコシは既存種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。

395

### (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

400

改変 CP4 EPSPS 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調査するために、TOX\_2010 データベースを用いて FASTA 型アルゴリズムにより *E-score* (expectation score; 期待値)が  $1 \times 10^{-5}$  以下の相同性を示す配列の検索を行った。その結果、TOX\_2010 に登録された既知毒性たん白質及びその他のヒトや家畜等に有害なたん白質との間に構造相同性は認められなかった (参考資料 5)。

405

### (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

410

*E. coli* で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質を用いて人工胃液 (SGF) 及び人工腸液 (SIF) 消化試験を行った。*E. coli* から調製した改変 CP4 EPSPS たん白質と MON87427 トウモロコシ中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質の同等性に関しては、免疫反応性 (ウエスタンブロット分析)、SDS-PAGE、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 12)。

#### ①人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

415

SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析を用いて、*E. coli* で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質の人工胃液 (SGF) 中での消化性を評価した。その結果、SDS-PAGE では、改変 CP4 EPSPS たん白質の 98%以上が 15 秒以内に消化されることが確認され、ウエスタンブロット分析では、改変 CP4 EPSPS たん白質の 95%以上が人工胃液中で 15 秒以内に消化されることが確認された (参考資料 13)。

420

#### ②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

ウエスタンブロット分析を用いて、*E. coli* で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質の人工腸液 (SIF) 中での消化性を評価した。その結果、試験開始 32 分後には試験開始直後と比較して、シグナルが減少していることが確

425 認された。また、試験開始後 100 分以降に改変 CP4 EPSPS たん白質が検出されることはなかった (参考資料 14)。

### ③加熱処理

430 ELISA 分析を用いて、*E. coli* で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質の加熱処理感受性を評価した。その結果、15 分間の条件下の場合、25°Cでは非加熱時と比較して 112%に、37°Cでは 102%と減少は認められなかったが、55°Cでは 46%に減少していた。さらに、75 及び 95°Cでは検出限界以下であった。また、30 分間の条件下の場合、25°Cでは非加熱時と比較して 92%に、37°Cでは 82%に、55°Cでは 17%に減少していた。さらに、75 及び 95°Cでは検出限界以下であった。この結果により、改変 CP4 EPSPS たん白質は加熱処理によって免疫応答性を失うことが確認された (参考資料 15)。

### (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

440 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)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸 (DAHP) 合成酵素により制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階が中間代謝物質や最終生成物で阻害・抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている (Herrmann, 1983, Weiss and Edwards, 1980)。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である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。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されている (Smart *et al.*, 1985)。さらに、アミノ酸分析により、芳香族アミノ酸含量に MON 87427 トウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの間で相違のないことが確認されている (参考資料 16)。

455 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、Gruys らの論文を元に計算すると、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。

460 以上のことから、植物 EPSPS たん白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

465

## (5) 宿主との差異に関する事項

470 MON87427 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、米国の3ヵ所のは場において栽培したMON87427 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脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ミネラル類、⑤ビタミン類及び⑥有害生理活性物質の分析を行った(参考資料16)。また、各は場4品種ずつ商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。

### 475 ①主要構成成分

地上部及び穀粒中の水分、たん白質、脂質、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又は同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

480

### ②脂肪酸組成

穀粒中の脂肪酸組成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又は同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

485

### ③アミノ酸組成

穀粒中のアミノ酸組成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又は同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

490

### ④ミネラル類

地上部及び穀粒中のミネラル類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同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

495

### ⑤ビタミン類

穀粒中のビタミン類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又は同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

500

### ⑥有害生理活性物質

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又は同じは場で栽培された従来商業品種の分析値との間に差異は認められなかった。

505

**(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項**

510 2005 年から 2010 年の間に米国を中心として延べ 371 ヶ所で行われたほ場試験において、MON87427 トウモロコシの生存及び増殖能力は対照の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**

515 MON87427 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**

MON87427 トウモロコシは、物理的防除(耕転)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。

520 **(9) 外国における認可等に関する事項**

2012 年 4 月に米国食品医薬局 (FDA) において食品・飼料としての安全性が確認された。

2012 年 6 月にカナダ保健省 (Health Canada) において食品としての、また、カナダ食品検査庁 (CFIA) において環境・飼料としての安全性が確認された。

525 2012 年 7 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ) において食品としての安全性が確認された。

**(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項**

530 商業栽培において、MON87427 トウモロコシと従来の特許トウモロコシ品種の違いは除草剤グリホサートに対して耐性を持つということのみである。したがって、MON87427 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、栽培方法は従来の特許トウモロコシ品種と同様である。

**(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項**

535 MON87427 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は従来の特許トウモロコシと同様である。

**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**

540 該当しない。

**IV 審議結果**

545 除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 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。

## V 参考文献及び参考資料

### 参考文献

- 1 Aldrich, S.R., W.O. Scott and R.C. Hoeft. 1986. Modern corn production. Third, A&L Publications, Inc., Champaign, Illinois.
- 2 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgette and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 3 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.
- 4 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 5 CaJacob, C.A., P.C.C. Feng, G.R. Heck, M.F. Alibhai, R.D. Sammons and S.R. Padgette. 2004. Engineering resistance to herbicides. Pages 353-372 in *Handbook of Plant Biotechnology*. P. Christou and H. Klee (eds.). John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, New Jersey.
- 6 Callis J., M.F.a.V.W. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* 1: 1183-1200.
- 7 Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.
- 8 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.
- 9 Galinat, W.C. 1988. The origin of corn. Pages 1-31 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., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 10 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.
- 11 Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Sanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.
- 12 Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in *The shikimate pathway*. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- 13 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-50 in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
- 14 Herrmann, K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in *Amino acids: biosynthesis and genetic regulation*. K.M. Hermann and R.L. Somerville

- (eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.
- 15 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
  - 16 ILSI. 2006. Crop Composition Database Version 3.0. International Life Science Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed August 12, 2010].
  - 17 Jugenheimer, R.W. 1976. Corns for special purposes and uses. Pages 215-258 in *Corn: Improvement, Seed Production, and Uses*. John Wiley and Sons, New York, New York.
  - 18 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.
  - 19 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.
  - 20 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.
  - 21 McPherson, J.C. and R. Kay. 1994. Method for enhanced expression of a protein. Patent 5,359,142, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
  - 22 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.
  - 23 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.
  - 24 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.
  - 25 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, Boca Raton, Florida.
  - 26 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate 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.
  - 27 Smith, D.R. and D.G. White. 1988. Diseases of corn. Pages 687-766 in *Corn and Corn Improvement*. G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
  - 28 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.
- 29 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley and Sons, New York.
- 30 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.
- 31 Wilkes, H.G. 1972. Maize and Its Wild Relatives. *Science* 177 : 1071-1077.
- 32 柿本陽一. 1981. トウモロコシの起源と特性. I 植物としての分類, 類縁関係. Pages 1-45 in *畑作全書*. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 33 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳, 東京.
- 34 財務省. 2011. 財務省貿易統計. 財務省. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed May 2].
- 35 飼料月報 平成 22 年 8 月, 2010. 通巻 562 号 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発行.
- 36 瀧澤康孝. 1981. 子実用トウモロコシの栽培. II 栽培の実際. Pages 124-143 in *畑作全書*. Volume 7 雑穀編. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.
- 37 中村茂文. 2001. トウモロコシ. 生育のステージと生理, 生態. I 種子と発芽. Pages 41-43 in *畑作全書*. Volume 3 雑穀. 社. 農山漁村文化協会 (ed.). 社団法人 農山漁村文化協会, 東京.

550

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Assessment of CP4 EPSPS Protein Level in Corn Tissues Collected from MON 87427 Produced in U.S. Field Trials During 2008 (MSL0022370)
- 2 Information on Intermediate Plasmid Vector B
- 3 Sequences of Genetic Elements in PV-ZMAP1043
- 4 Plasmid lineage of PV-ZMAP1043
- 5 Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD\_2010, TOX\_2010, and PRT\_2010 Databases (MSL0022522)
- 6 Molecular Characterization of MON 87427 (MSL0021822)
- 7 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87427: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL MSL0023321)
- 8 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Corn Leaf and Seed Samples of MON 87427 Across Multiple Generations by Western Blot Analysis (MSL0022026)
- 9 Heritability and Stability of Coding Sequences Present in MON 87427 Across Multiple Generations (RPN-09-275)
- 10 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87427: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0022911)
- 11 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87427 Utilizing the AD\_2010, TOX\_2010, and PRT\_2010 Databases (MSL0022941)
- 12 Amended Report for MSL 0022391: Characterization of the CP4 EPSPS Protein Purified from the Grain of MON 87427 and Comparison of the Physicochemical and Functional

Properties of the Plant-Produced and *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Proteins (MSL 0023119)

- 13 Assessment of the *in vitro* digestibility of purified *E. coli*-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL17566)
- 14 Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSPS synthase (MSL12949)
- 15 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764)
- 16 Compositional Analyses of Corn Forage and Grain of MON 87427 Treated with Glyphosate Grown in the United States during the 2008 Field Season (MSL0022340)