

# 組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性  
トウモロコシ MON87419 系統

平成 29 年 3 月 15 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	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	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	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	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	10

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

1 「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性  
2 トウモロコシ MON87419 系統」に係る安全性確認  
3

4 I はじめに

5 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 系統（以下  
6 「MON87419 トウモロコシ」という。）について、平成 28 年 8 月 22 日付けで遺伝子  
7 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  
8 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  
9 第 1780 号）に基づき審議を行った。

10  
11 II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 系統  
性 質 : 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : Monsanto Company

12  
13 MON87419 トウモロコシには、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株及び  
14 *Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入さ  
15 れている。改変 *dmo* 遺伝子からは改変 MON87419 DMO+12 たん白質及び改変  
16 MON87419 DMO+7 たん白質 の 2 つの形態のたん白質（以下、総称して「改変  
17 MON87419 DMO たん白質」とする）が発現し、除草剤ジカンバを除草活性のない化  
18 合物に変換することにより、植物に除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。また、  
19 *pat* 遺伝子からは PAT たん白質が発現し、除草剤グルホシネートを除草活性のない化  
20 合物に変換することにより、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

21 MON87419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  
22 換え技術を用いて付与された上の性質を除き、差異は認められなかった。こ  
23 のため、MON87419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  
24 ところ、飼料として安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、  
25 MON87419トウモロコシは、飼料として摂取する家畜等の健康に影響を及ぼす  
26 おそれはないと考えられた。

27  
28 III 審議内容

29 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

30 (1) 遺伝的素材に関する事項

31 MON87419 トウモロコシの宿主植物はイネ科トウモロコシ属のトウモロコシ  
32 *Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis の非組換え品種 LH244 のデント種である。

33 MON87419 トウモロコシには、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来  
34 する改変 *dmo* 遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝  
35 子が導入されている。改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子は、それぞれ改変  
36 MON87419 DMO たん白質及び PAT たん白質を発現し、MON87419 トウモロコ

37 シに除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

38  
39 **(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項**

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

42 トウモロコシのウシ及びブタ、ニワトリ等の家畜等の飼料としての利用様式に  
43 ついては、子実を配合飼料の原料として利用することの他、サイレージ用として  
44 も利用されている。また、食品や工業製品への加工（湿式製粉、乾式製粉）におけ  
45 る副産物も飼料として利用されている（戸澤, 2005）。

46  
47 **(3) 飼料の構成成分等に関する事項**

48 MON87419 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  
49 文献値は明らかとなっており、比較が可能である。（ILSI,2011、参考資料 18）

50  
51 **(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項**

52 MON87419 トウモロコシは、改変 MON87419 DMO たん白質及び PAT たん白  
53 質を発現することにより、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する抵  
54 抗性が付与されている。この点を除けば、MON87419 トウモロコシは既存のトウ  
55 モロコシと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取（可食）部位、  
56 ③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法についても非組換えトウモロコシと変わ  
57 りはない。

58  
59 以上（1）～（4）により、MON87419 トウモロコシの飼料としての安全性評価  
60 において、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。

61  
62 **2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項**

63 MON87419 トウモロコシは、改変 MON87419 DMO たん白質及び PAT たん白質  
64 を発現し、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する抵抗性を示す。そのた  
65 め、異なる作用機作を有する 2 つの除草剤を使用することが可能となり、トウモロ  
66 コシ栽培における雑草防除を効率的に行うことが可能である。

67  
68 **3 宿主に関する事項**

69 **(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**

70 MON87419 トウモロコシの宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ  
71 (*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis) の非組換え品種 LH244 のデント種である。

72  
73 **(2) 遺伝的先祖に関する事項**

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

77 紀元前 5000 年頃のトウモロコシ野生種の穂軸と考えられる遺物が、メキシコの

78 テワカン溪谷の洞窟住居跡で発見されている。その後、紀元前 3400 年頃までに栽  
79 培化したトウモロコシが現れたと考えられている (戸澤, 2005)。  
80

### 81 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

82 トウモロコシには、家畜等の健康に悪影響を与える毒性物質の産生性は知られ  
83 ていない。抗栄養素として、フィチン酸やラフィノースが知られている (OECD,  
84 2002)。トウモロコシでは、リンの 60-75%がフィチン酸塩として存在している。  
85 そのため、非反芻動物ではトウモロコシ中のリンは極めて吸収されにくい (OECD,  
86 2002)。ラフィノースは低分子量の炭水化物で、腸内でガス化し腹部を膨満させる  
87 原因物質である (OECD, 2002)。トリプシンインヒビターは、たん白質分解酵素阻  
88 害物質であり、摂取したたん白質の消化を阻害することが知られているが (OECD,  
89 2012)、トウモロコシにおいては含有量が低く、栄養学的に問題にならないとされ  
90 ている (OECD, 2002)。  
91

### 92 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

93 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。  
94

### 95 (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

96 トウモロコシには、ウイルス (Maize dwarf mosaic virus: MDMV 等)、細菌  
97 (*Erwinia stewartii* 等) 及び糸状菌 (*Diplodia maydis* 等) による各種病害 (モザイ  
98 ク病、萎凋細菌病、茎腐病等) が知られているが (OECD, 2003)、これらが家畜等  
99 に対して病原性を持つことは知られていない。  
100

### 101 (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

102 トウモロコシは栽培作物であり、雑草性はないと考えられる。  
103

### 104 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

105 トウモロコシの近縁種として、テオシント (*Zea* 属) 及びトリプサクム  
106 (*Tripsacum* 属) がある。テオシントはトウモロコシと交雑可能であり、メキシコ  
107 やグアテマラでは近接して生育した場合に交雑が確認されている。一方、トリプ  
108 サクムとトウモロコシの交雑は非常に困難であることが知られている (OECD,  
109 2003)。わが国においてテオシントが自生するとの報告はなく、交雑の可能性は  
110 ないと考えられる。  
111

### 112 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

113 トウモロコシは、1580 年頃にポルトガル人によって導入され、九州、四国や本  
114 州で栽培されるようになった。明治時代に北海道開拓使によって、デント種及び  
115 フリント種が米国より導入され、飼料用等として定着した (戸澤, 2005)。  
116

### 117 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

118 トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

トウモロコシは成長点が地上に出た5～7葉期に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)。また、種子の休眠性は低い(CFIA, 1994)。種子の寿命は主に温度と湿度によって左右され、低温乾燥下では長く、高温多湿下では短い(戸澤, 2005)。雌穂は苞皮で覆われているため、種子が自然に雌穂から脱粒し散布される可能性は低く、種子の拡散には人間の仲介が必要である(OECD, 2003)。仮に自生したとしても、鍬や感受性を示す除草剤による物理的又は化学的な方法により防除することができる(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としてテオシント(*Zea* 属)及びトリプサカム属(*Tripsacum* 属)があるが、これら近縁種において有害生理活性物質の産生性があるという報告はない。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON87419 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMHT507801 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 等を基に作成した。

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT507801 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、既知の有害塩基配列は含まない(参考資料 1)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT507801 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、コード配列及び3'末端非翻訳領域を含む *aadA* 遺伝子(Fling et al., 1985)が、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中の選択マーカーとして外側骨格領域に存在している。

なお、MON87419 トウモロコシ中にこれらの領域を含む外側骨格領域は導入されていないことを確認している。

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT507801 は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

導入用プラスミド PV-ZMHT507801 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 *ori V* が組み込まれている。しかし、これらの領域

160 により導入用プラスミド PV-ZMHT507801 が植物や家畜等で増殖することはでき  
161 ない。なお、導入遺伝子の解析の結果、MON87419 トウモロコシ中には、これら  
162 の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。

163

#### 164 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

165 プラスミドpBR322等を基に、T-DNA I領域に改変*dmo*遺伝子発現カセット及び  
166 *pat*遺伝子発現カセットを導入すると共に、T-DNA II領域に*cp4 epsps*遺伝子発現  
167 カセットを導入し、導入用プラスミドPV-ZMHT507801を作製した。

168

#### 169 (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

170 MON87419 トウモロコシはアグロバクテリウム法により、導入用プラスミド  
171 PV-ZMHT507801 を従来品種 LH244 に導入することにより作出された。

172

### 173 5 挿入遺伝子に関する事項

#### 174 (1) 供与体に関する事項

##### 175 ① 名称、由来及び分類に関する事項

176 改変 *dmo* 遺伝子及び *pat* 遺伝子は、それぞれ *S. maltophilia* DI-6 株及び *S.*  
177 *viridochromogenes* に由来する。

178

##### 179 ② 安全性に関する事項

180 改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は、好気性の環境中に普遍的に  
181 存在するグラム陰性細菌であり、水辺や土壌、植物等から検出されているほか、  
182 飼料や畜産物からも検出されている (Swings et al., 1983、Juhnke et al., 1987、  
183 Lambert et al., 1987、Juhnke and des Jardin, 1989、Berg et al., 1996、275  
184 Denton et al., 1998、Berg et al., 1999、Berg et al., 2002、Nunes and de Melo,  
185 2006、Echemendia, 2010)。消化管の常在細菌と同様、*S. maltophilia* は日和見感  
186 染菌である (Berg, 1996) が、健康なヒトや家畜等に対する病原性を示すことは  
187 稀である (Ryan et al., 2009、Cunha, 2010)。

188 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、腐生性及び土壌伝播性の  
189 細菌である。ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) に属する細菌は環境中に広  
190 く存在しており、ヒトへの暴露も一般的であるが (Goodfellow and Williams,  
191 1983)、既知のアレルギー性や毒性は知られていない。また、*S.*  
192 *viridochromogenes* は、植物、ヒト又はその他の動物に対する病原性を持たない  
193 と考えられている (Goodfellow and Williams, 1983、Locci, 1989)。

194

#### 195 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

196 非組換えトウモロコシ品種 LH244 系統の未成熟胚を、導入用プラスミド PV-  
197 ZMHT507801 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  
198 行った。

199 その後、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

200 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  
201 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  
202 除去した。

203 その後、体細胞胚を発芽及び根の形成を促す植物成長調整剤を含む培地に移し、  
204 根をつけた個体のうち正常な表現型を示す個体を R0 個体として選抜し、土壌に移  
205 植した後、生育させた。

206 得られた R0 個体のうち、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを有するものを自家受  
207 粉させて R1 世代を作出し、R1 世代において T-DNA I 領域をホモで有し、T-  
208 DNA II 領域を持たない個体を PCR 法により選抜し、その中から、形態特性及び  
209 導入遺伝子の解析結果に基づき、最終的な商品化系統として MON87419 系統を選  
210 抜した。

211

### 212 (3) 構造に関する事項

#### 213 ① プロモーターに関する事項

214 MON87419 トウモロコシに導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセットは、  
215 *PCISV* プロモーターによりその発現が制御されている。*PCISV* プロモーターは、  
216 Peanut chlorotic streak caulimovirus (*PCISV*) の完全長転写物のプロモーター  
217 で、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Makarova et al., 2009)。

218 また、同じく導入された *pat* 遺伝子発現カセットは、*Ubq* プロモーターによ  
219 りその発現が制御されている。*Ubq* プロモーターは *Andropogon gerardii* 由来  
220 (Flasinski, 2015) のユビキチン遺伝子のプロモーター (Joung and Kamo,  
221 2006) で、恒常的に目的遺伝子を発現させる。

222

#### 223 ② ターミネーターに関する事項

224 改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ (*Triticum*  
225 *aestivum*) の熱ショックたん白質 (Hsp17) の 3'末端非翻訳領域 (McElwain  
226 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。

227 また、*pat* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、イネ (*Oryza. sativa*) の  
228  $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター (*Ara5*) (GenBank, 2015) をコードして  
229 いる RA5B 前駆体遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列であり、mRNA のポリアデ  
230 ニル化を誘導し、転写の終結を調節する (Hunt, 1994)。

231

#### 232 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

233 導入用プラスミド PV-ZMHT507801 の外側骨格領域の全塩基配列、各構成  
234 要素、その由来及び機能は既に明らかになっており、既知の有害なたん白質を  
235 産生する塩基配列は含まれていない。

236

### 237 (4) 性質に関する事項

238 導入用プラスミド PV-ZMHT507801 中の各構成要素の由来及び機能について  
239 は、表 1 に示した。

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
改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット	
<i>PCISV</i> プロモーター	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の完全長転写物のプロモーターで、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
<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'末端非翻訳領域のリーダー配列 (Lamppa et al., 1985)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
<i>Ract1</i> イントロン配列	イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来のイネアクチン 1 たん白質をコードしている <i>act1</i> 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (McElroy et al., 1990)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
改変 <i>dmo</i> 遺伝子	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与。
<i>Hsp17</i> ターミネーター	コムギ ( <i>T. aestivum</i> ) 由来の熱ショックたん白質(Hsp17) の 3'末端非翻訳領域の配列 (McElwain and Spiker, 1989)。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>Ubq</i> プロモーター	<i>Andropogon gerardii</i> 由来 (Flasinski, 2015) のユビキチン遺伝子のプロモーター配列 (Joung and Kamo, 2006)。恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>Ubq</i> リーダー配列	<i>A. gerardii</i> 由来 (Flasinski, 2015) のユビキチン遺伝子の 5'末端非翻訳領域のリーダー配列 (Joung and Kamo, 2006)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。□
<i>Ubq</i> イントロン配列	<i>A. gerardii</i> 由来 (Flasinski, 2015) のユビキチン遺伝子のイントロン配列 (Joung and Kamo, 2006)。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
<i>pat</i> 遺伝子	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (PAT たん白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)。
<i>Ara5</i> ターミネーター	イネ ( <i>O. sativa</i> ) 由来の $\alpha$ -アミラーゼ/トリプシンインヒビター ( <i>Ara5</i> ) (GenBank, 2015) をコードしている RA5B 前駆体遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列である。mRNA のポリアデニル化を誘導し、転写の終結を調節する (Hunt, 1994)。

242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282

① 改変 *dmo* 遺伝子の機能

改変 *dmo* 遺伝子から発現される改変 MON87419 DMO たん白質は、除草剤ジカンバから除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA; 3,6-dichlorosalicylic acid) とホルムアルデヒドへの脱メチル化を触媒する酵素である (Chakraborty et al., 2005)。改変 *dmo* 遺伝子のコード配列は、葉緑体輸送ペプチド (CTP) の一種である CTP4 のコード配列と結合している。これにより、N 末端側に CTP4 由来の 72 個のアミノ酸が付加された DMO 前駆たん白質が産生される。この前駆たん白質は CTP4 が付加されていることにより葉緑体に運ばれる (Klee et al., 1987, Herrmann, 1995)。一般的に、輸送ペプチドは前駆たん白質を目的の葉緑体へ輸送した後正確に切り離されるが (della-Cioppa et al., 1986)、一部の輸送ペプチドが残った状態のたん白質が葉緑体に存在する例が報告されている (Clark and Lamppa, 1992; Behrens et al., 2007)。MON87419 トウモロコシは、N 末端側に CTP4 由来の 12 個のアミノ酸が付加されたたん白質 (改変 MON87419 DMO+12 たん白質) と、7 個のアミノ酸が付加されたたん白質 (改変 MON87419 DMO+7 たん白質) の 2 つの形態のたん白質 (改変 MON87419 DMO たん白質) が発現している (参考資料 2)。

また、改変 MON87419 DMO たん白質のアミノ酸配列は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO たん白質のアミノ酸配列と比較して、CTP4 の切断を容易にする目的で野生型 DMO たん白質の N 末端配列から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。

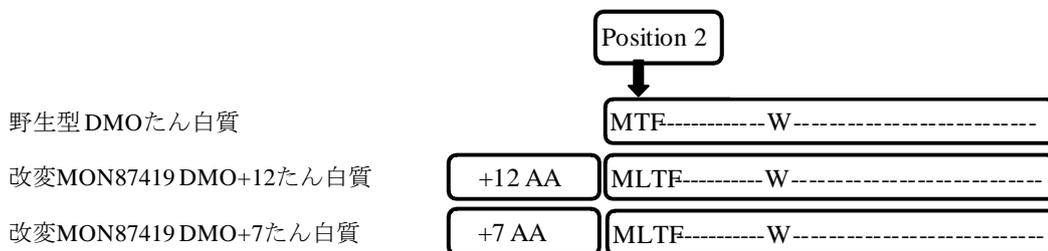


図 改変 MON87419 DMO たん白質の形態及び野生型 DMO たん白質との関係

② *pat* 遺伝子の機能

*pat* 遺伝子から発現するホスフィノスリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (PAT) たん白質は、除草剤グルホシネートの L-ホスフィノスリシンの遊離アミン基をアセチル化し、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートを生成する。*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素に結合できないため、グルタミン合成酵素が阻害されることはない。その結果、MON87419 トウモロコシは、除草剤グルホシネートに対する耐性を示す。

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT507801 に含まれる遺伝子は、塩基配列解析により、T-DNA I 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している (参考資料 4)。

283

284 (6) コピー数に関する事項

285 MON87419 トウモロコシ中に導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数、及び  
286 外側骨格配列の有無を次世代シーケンス技術<sup>1</sup>及びバイオインフォマティクスに  
287 よる接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis:  
288 NGS/JSA)<sup>2</sup> 並びに導入遺伝子領域の PCR 分析及び塩基配列解析により確認した  
289 (参考資料 4)。その結果、MON87419 トウモロコシ中の導入用プラスミド  
290 ZMHT507801 の T-DNA I 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されており、導  
291 入用プラスミド PZ-ZMHT507801 由来の T-DNA II 領域及び外側骨格領域は存在  
292 しないことが確認された。

293 また、挿入 DNA の構成を確認し、挿入 DNA とその近傍配列の塩基配列を決定  
294 するため、挿入 DNA 及び近傍領域の塩基配列解析を行った。その結果、  
295 MON87419 トウモロコシ中の挿入 DNA と、導入用プラスミド PZ-ZMHT507801  
296 の T-DNA I 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。また、  
297 MON87419 トウモロコシの導入遺伝子挿入部位において、トウモロコシゲノム内  
298 在性配列に 602 bp の欠失が認められたが、近傍配列の BLASTn 及び BLASTx 検  
299 索による解析結果から、挿入 DNA の導入により既知の内在性の遺伝子の破壊はな  
300 いと考えられた(参考資料 5, 6)。

301

302 (7) 安定性に関する事項

303 MON87419 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  
304 ため、5 世代の MON87419 トウモロコシから得られたゲノム DNA を用いて、  
305 NGS/JSA を実施したところ、導入遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝してい  
306 ることが確認された(参考資料 4)。

307 また、改変 MON87419 DMO たん白質及び PAT たん白質の複数世代にわたる  
308 安定性を確認するため、5 世代の MON87419 トウモロコシから採取した穀粒につ  
309 いて、ウエスタンブロット分析を実施したところ、当該たん白質が安定して後代  
310 で発現していることが確認された(参考資料 7)。

311 さらに、導入遺伝子の分離様式及び安定性を確認するために、3 世代の  
312 MON89419 トウモロコシを用いて除草剤グルホシネート散布及び PCR 法により  
313 T-DNA I 領域の有無を確認した結果、3 世代の MON87419 トウモロコシにおける  
314 分離比の観測値と期待値の間に統計学的な有意差は認められなかったことから、

<sup>1</sup> 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が解読できる。

<sup>2</sup> 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 MON87419 トウモロコシのゲノムの全領域に相当する配列を 100bp 程度のフラグメントとして増幅してその塩基配列を解析し、次に、これらのフラグメントの情報を用い、JSA によって T-DNA 領域の導入箇所数と非意図的断片の有無を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

315 MON87419 トウモロコシ中の T-DNAI 領域はトウモロコシゲノムの 1 カ所に存在  
316 し、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 8)。

317

#### 318 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

319 MON87419 トウモロコシにおける改変 MON87419DMO たん白質及び PAT た  
320 ん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 9)。試験には 2013 年に米国  
321 の 5 ヶ所の試験ほ場から収集された葉、根、地上部、穀粒を供試した。その結果、  
322 全ての組織から当該たん白質の発現が確認された。

323

#### 324 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

325 導入用プラスミド PZ-ZMHT507801 には、スペクチノマイシン及びストレプト  
326 マイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子 (Fling et al., 1985) が形質転換後の選抜マ  
327 ーカーとして外側骨格領域に存在している。

328 なお、MON87419 トウモロコシに *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、  
329 NGS/JSA により確認されている。

330

#### 331 (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 332 に関する事項

333 MON87419 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  
334 て、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。ストップコドンからスト  
335 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た結果、トウモロコシゲ  
336 ノム内在性配列から MON87419 トウモロコシ中の導入遺伝子にかけて存在し、か  
337 つ、8 つ以上連続するアミノ酸を有する ORF が 11 個確認された(参考資料 10)。  
338 この 11 個の ORF について、TOX\_2014、AD\_2014 及び PRT\_2014 を用い、既知  
339 の毒性たん白質、アレルゲン及び有害な生理活性たん白質との相同性検索を行っ  
340 たが、構造相同性は認められなかった(参考資料 10)。

341 また、MON87419 トウモロコシ中の挿入 DNA において、目的以外の新規たん  
342 白質が産生される可能性を検討するため、FASTA 型アルゴリズムにより既知の毒  
343 性たん白質等との相同性検索を行ったが、相同性は認められなかった(参考資料  
344 11)。

345

## 346 6 組換え体に関する事項

### 347 (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

348 MON87419 トウモロコシに導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *pat*  
349 遺伝子発現カセットは、改変 MON87419 DMO たん白質及び PAT たん白質を発  
350 現し、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する抵抗性を付与する。こ  
351 の点を除けば、MON87419 トウモロコシは既存種とその形態及び生育特性におい  
352 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。

353

### 354 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

355 MON87419 トウモロコシ中で発現する改変 MON87419 DMO たん白質及び  
356 PAT たん白質が既知の毒性たん白質と相同性を有するかを確認するために、  
357 TOX\_2014 を用いた FASTA 型アルゴリズムにより相同性検索を行ったが、既知  
358 の毒性たん白質との間に相同性は認められなかった(参考資料 3,11)。  
359

### 360 (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

361 *E. coli* で発現させた改変 MON87419 DMO+12 たん白質及び PAT たん白質を  
362 用いて、物理化学的処理に対する感受性を調べるため、以下アからウについて検  
363 討を行った。なお、*E. coli* から調製した両たん白質と MON87419 トウモロコシ  
364 中で発現する両たん白質との同等性に関しては、免疫学的反応性(ウエスタンブ  
365 ロット法)、分子量(SDS-PAGE 法)、グリコシル化状態及び機能活性、純度により  
366 確認している(参考資料 12,13)。  
367

#### 368 ①改変 MON87419 DMO+12 たん白質

##### 369 ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

370 改変 MON87419 DMO+12 たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-  
371 PAGE 法及びウエスタンブロット分析により検討した結果、いずれにおいても  
372 人工胃液中で試験開始から 30 秒以内に消化されることが確認された。なお、  
373 SDS-PAGE の結果、2 分後の時点で約 3kDa の一時的な断片が観察されたが、5  
374 分後には観察されなかった(参考資料 14)。  
375

##### 376 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

377 改変 MON87419 DMO+12 たん白質の人工腸液中での消化性について、ウエス  
378 タンブロット分析により検討した結果、人工腸液中で試験開始から 5 分以内に  
379 検出限界以下まで消化されることが確認された。なお、試験開始後 5 分の時点  
380 において約 12kDa 及び約 21kDa のバンドが確認されたが、15 分後の時点では  
381 確認されなかった(参考資料 14)。  
382

##### 383 ウ 加熱処理

384 改変 MON87419 DMO+12 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分  
385 析により評価した結果、15 分及び 30 分間の条件下において 55℃以上の加熱処  
386 理により免疫応答性を失うことが確認された(参考資料 16)。  
387

#### 388 ②PAT たん白質

##### 389 ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

390 PAT たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタン  
391 ブロット分析により検討した結果、それぞれにおいて、人工胃液中で試験開始  
392 から 30 秒以内に消化されることが確認された。なお、SDS-PAGE の結果、試験  
393 開始 5 分後の時点まで約 3kDa の一時的な断片が観察されたが、10 分後には観  
394 察できなかった(参考資料 15)。

395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434

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

PAT たん白質の人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により検討した結果、人工腸液中で試験開始から 5 分以内に検出限界以下まで消化されることが確認された(参考資料 15)。

ウ 加熱処理

PAT 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 分間の条件下においては 55℃では 12%、75℃以上では定量限界値未満に、30 分間の条件下では 55℃以上の加熱処理により定量限界値未満になったことから、PAT たん白質は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 17）。

#### (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

##### ① 改変 MON87419 DMO たん白質

DMO たん白質はジカンバに高い特異性を示すことが知られており、構造的にジカンバに類似した化合物（カルボキシル基、メトキシ基及びクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物）は、DMO たん白質の基質となる可能性があると考えられる(D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

トウモロコシにおいてクロロ基を含むフェニル環を持つ化合物は知られておらず、クロロ基を持たずカルボキシル基及びメトキシ基を含むフェニル環をもち、植物に存在している中で最も構造的にジカンバに類似している  $\sigma$ -アニス酸（2-メトキシ安息香酸）が DMO たん白質により代謝されないことが確認されている(D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

MON87419 系統中で発現している改変 MON87419 DMO たん白質は、野生型の DMO たん白質とのアミノ酸配列の違いは DMO たん白質の触媒部位から立体構造的に離れている部分にしか影響を与えないため、DMO たん白質の基質特異性に影響しないと考えられる。この結果、改変 MON87419 DMO たん白質がジカンバ以外の化合物を代謝して、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性はないと考えられた。

##### ② PAT たん白質

PAT たん白質は、アセチル CoA の存在下においてグルホシネートに高い特異性を有することが知られている(Thompson et al., 1987; Wehrmann et al., 1996)。

除草剤グルホシネートの除草剤活性は L 体のホスフィノスリシンによるものであるが、その他の L 体アミノ酸は PAT たん白質によりアセチル化されることはない。実際に、グルホシネート、高濃度のアミノ酸及び PAT たん白質を供試した競合アッセイでは、グルホシネートのアセチル化の阻害は認められなかった(Wehrmann et al., 1996)。また、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸は競合アッセイにおいて、PAT たん白質によるグルホシネートのアセチル化を

435 阻害しないことが示された(Wehrmann et al., 1996)。さらに、PAT たん白質は、  
436 植物体内の類縁体と比較して L-ホスフィノスリシンに対し 30 倍以上と高い親和  
437 性を有している (Thompson et al., 1987)。

438 このことから、PAT たん白質は、グルホシネートに対し高い基質特異性を有  
439 しており、MON87419 系統の代謝経路に影響はないと考えられる。

440

#### 441 (5) 宿主との差異に関する事項

442 MON87419 トウモロコシと対照の非組換えトウモロコシとの構成成分の同等性  
443 を評価するため、米国の 5 箇所のは場において栽培した MON87419 トウモロコシ  
444 及び対照の非組換えトウモロコシ品種の種子及び地上部について、①主要構成成  
445 分、②ビタミン、③アミノ酸、④ミネラル、⑤脂肪酸及び⑥有害生理活性物質の  
446 分析を行った(参考資料 18)。また、各は場で 4 品種ずつ合計 12 種の非組換え商業  
447 品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。MON87419 トウモロコシについては、  
448 2~4 葉期に最大散布量 (0.56kg acid equivalent/ha)で除草剤ジカンバ処理を行い、  
449 4~7 葉期に最大散布量 (0.45kg activate ingredient/ha) で除草剤グリホサート処  
450 理を行った。

451

##### 452 ① 主要構成成分

453 種子及び地上部の粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊  
454 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  
455 も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等であった。

456

##### 457 ② ビタミン

458 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  
459 えトウモロコシ品種と同等であった。

460

##### 461 ③ アミノ酸

462 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  
463 えトウモロコシ品種と同等であった。

464

##### 465 ④ ミネラル

466 穀粒中の各ミネラル及び地上部のカルシウム及びリンについて分析した結果、  
467 いずれのミネラルも対照の非組換えトウモロコシ品種と同等又は ILSI データベ  
468 ースに記載された分析値の範囲内であった(ILSI,2011)。

469

##### 470 ⑤ 脂肪酸

471 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  
472 ウモロコシ品種と同等であった。

473

##### 474 ⑥ 有害生理活性物質

475 穀粒中の有害生理活性物質として、フィチン酸及びラフィノース、二次代謝産  
476 物としてフェルラ酸及び *p*-クマル酸について分析した結果、いずれの有害生理  
477 活性物質も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等であった。

478

#### 479 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

480 2011 年から 2015 年までの間に MON87419 トウモロコシのほ場試験が米国を  
481 中心として延べ 203 箇所で行われているが、MON87419 トウモロコシの生存及び  
482 増殖能力は対照の非組換え品種と同等であることが確認されている。

483

#### 484 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

485 MON87419 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  
486 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。

487

#### 488 (8) 不活化法に関する事項

489 MON87419 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  
490 剤の使用)等、トウモロコシを枯死させる従来の方法で不活化される。

491

#### 492 (9) 外国における認可等に関する事項

493 2016 年 2 月 カナダ保健省 (Health Canada) において食品としての、カナ  
494 ダ食品検査庁 (CFIA) において環境・飼料としての安全性確  
495 認が終了した。

496 2016 年 3 月 米国農務省 (USDA) から無規制裁培 (商業栽培) の承認を得  
497 た。

498 2016 年 3 月 米国食品医薬品庁 (FDA) において食品・飼料としての安全性  
499 確認が終了した。

500 2016 年 9 月 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)に食  
501 品としての安全性確認が終了した。

502

#### 503 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

504 MON87419 トウモロコシと従来のトウモロコシの違いは、MON87419 トウモ  
505 ロコシが生育期に雑草防除のために除草剤ジカンバ及びグルホシネートを使用で  
506 きる点のみである。MON87419 トウモロコシへの使用が想定される除草剤ジカン  
507 バ及びグルホシネート及びその代謝物について、MON87419 トウモロコシへの残  
508 留及びそれらの摂取が家畜等の健康に及ぼす影響を検証した結果、安全性の問題  
509 は認められなかった。

510

511

#### 512 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

513 MON87419 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は、非組換えのトウモロコ  
514 シ品種と同様である。

515

516 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  
517 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  
518 該当しない。

519

#### 520 IV 審議結果

521 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性トウモロコシ MON87419 系統について、  
522 「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  
523 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。

524

#### 525 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.
- 2 Berg, G., P. Marten and G. Ballin. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. *Microbiological Research* 151: 19-27.
- 3 Berg, G., N. Roskot and K. Smalla. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3594-3600.
- 4 Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock and K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3328-3338.
- 5 Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4: 430-435.
- 6 CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- 7 Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
- 8 Clark, S.E. and G.K. Lamppa. 1992. Processing of the precursors for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystem II and photosystem I during import and in an organelle-free assay. *Plant Physiology* 98: 595-601.
- 9 Cunha, B.A. 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*. WebMD, LLC, New York, New York. <http://www.emedicine.com/med/topic3457.htm> [Accessed January 2, 2010].
- 10 D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
- 11 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.
- 12 Denton, M., N.J. Todd, K.G. Kerr, P.M. Hawkey and J.M. Littlewood. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1953-1958.
  - 13 Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
  - 14 Echemendia, Y. 2010. Microorganism of the month: *Stenotrophomonas maltophilia*. Environmental Microbiology Laboratory, Inc., Cherry Hill, New Jersey. <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-07-2007.html> [Accessed August 10, 2010].
  - 15 Flasinski, S. 2015. Plant regulatory elements and uses thereof. Patent US 9,062,316 B2, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
  - 16 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.
  - 17 GenBank. 2015. OJ1779\_B07.106 allergen RA5B precursor [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)]. National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
  - 18 Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
  - 19 Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.
  - 20 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
  - 21 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
  - 22 ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed May 9, 2014].
  - 23 Joung, Y.H. and K. Kamo. 2006. Expression of a polyubiquitin promoter isolated from *Gladiolus*. *Plant Cell Rep* 25: 1081-1088.
  - 24 Juhnke, M.E. and E. des Jardin. 1989. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 747-750.
  - 25 Juhnke, M.E., D.E. Mathre and D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2793-2799.

- 26 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.
- 27 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. Padgette 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.
- 28 Lambert, B., F. Leyns, L. Van Rooyen, F. Gosselé, Y. Papon and J. Swings. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1866-1871.
- 29 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.
- 30 Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. Pages 2451-2508 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. S.T. Williams and M.E. Sharpe (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland
- 31 Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
- 32 Makarova, K.S., Y.I. Wolf and E.V. Koonin. 2009. Comprehensive comparative-genomic analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biology Direct* 4: 19.
- 33 McElroy, D., W. Zhang, J. Cao and R. Wu. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *The Plant Cell* 2: 163-171.
- 34 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.
- 35 Nunes, F.V. and I.S. de Melo. 2006. Isolation and characterization of endophytic bacteria of coffee plants and their potential in caffeine degradation. *Environmental Toxicology* 10: 293-297.
- 36 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.
- 37 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 for Economic Co-operation and

Development, Paris, France.

- 38 OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, anti-nutrients, toxicants and allergens. ENV/JM/MONO(2012)24. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 39 Ryan, R.P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M.B. Avison, G. Berg, D. van der Lelie and J.M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7: 514-525.
- 40 Swings, J., P. De Vos, M. Van den Mooter and J. De Ley. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 409-413.
- 41 Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.
- 42 Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1623-1626.
- 43 Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.
- 44 Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
- 45 戸澤英男 2005 トウモロコシ ー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー. 社団法人農山漁村文化協会, 東京.

526

527

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT507801
- 2 N-terminal sequence analysis of the Dicamba Mono-Oxygenase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 (SCR-2016-0322)
- 3 Bioinformatics Evaluation of the DMO and PAT Proteins in MON 87419 Utilizing the AD\_2014, TOX\_2014 and PRT\_2014 Databases (MSL0025907)
- 4 Amended Report for MSL0025438: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Corn MON 87419 (MSL0025902)
- 5 Bioinformatics Evaluation of MON 87419 Utilizing the EST\_2014, NT\_2014, and NR\_2014 Databases (MSL0025771)

- 6 An Expanded Bioinformatic Evaluation of the DNA Sequence Flanking the Insertion Site in MON 87419 (RAR-2015-0467)
- 7 Amended Report for MSL0025597: Demonstration of the Presence of DMO and PAT Proteins in Maize Seed Samples across Multiple Generations of MON 87419 (MSL0026348)
- 8 Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Herbicide Tolerant Corn MON 87419 Across Three Generations (MSL0025519)
- 9 Assessment of DMO and PAT Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from Maize MON 87419 Produced in United States Field Trials During 2013 (MSL0025758)
- 10 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87419: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0025920)
- 11 Amended Report for MSL0025770: Bioinformatics Evaluation of MON 87419 Utilizing the AD\_2014, TOX\_2014 and PRT\_2014 Databases (MSL0026123)
- 12 Amended Report for MSL0025999: Characterization of the Dicamba Mono-Oxygenase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and Escherichia coli (E. coli)-Produced Dicamba Mono-Oxygenase Proteins (MSL0026361)
- 13 Characterization of the Phosphinothricin N-Acetyltransferase Protein Purified from the Maize Grain of MON 87419 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and Escherichia coli (E. Coli)-Produced Phosphinothricin N-Acetyltransferase Proteins (MSL0026031)
- 14 Amended Report for MSL0025997: Assessment of the in vitro Digestibility of Escherichia coli-Produced MON 87419 DMO Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0026364)
- 15 Amended Report for MSL0025998: Assessment of the in vitro Digestibility of Phosphinothricin N-Acetyltransferase (pat) Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0026362)
- 16 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of Escherichia coli-Produced MON 87419 Dicamba Mono-Oxygenase Protein (MSL0026534)
- 17 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of Escherichia coli-Produced Phosphinothricin N-Acetyltransferase Protein (MSL0026533)
- 18 Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from Dicamba and Glufosinate Treated MON 87419 Grown in the United States during 2013 (MSL0025559)