

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

絹糸抽出期における高雌穂バイオマス
トウモロコシ MON87403 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	3
(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	4
(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) 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.....	11
(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.....	11
6 組換え体に関する事項.....	12
(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.....	12
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	12
(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.....	12
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	13
(5) 宿主との差異に関する事項.....	13
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	14
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	14
(8) 不活化法に関する事項.....	14
(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.....	15
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	15
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.....	15
IV 審議結果.....	15
V 提出資料で引用された参考文献.....	15

1 「絹糸抽出期における高雌穂バイオマス
2 トウモロコシ MON87403 系統」に係る安全性確認
3

4 I はじめに

5 絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 系統（以下
6 「MON87403 トウモロコシ」という。）について、平成 28 年 12 月 7 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 : 絹糸抽出期における高雌穂バイオマストウモロコシ MON87403 系統
性 質 : 絹糸抽出期における雌穂重の増大
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

12
13 MON87403 トウモロコシには、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)に由来する
14 *ATHB17* 遺伝子が導入されている。*ATHB17* 遺伝子からはホメオドメインーロイシン
15 ジッパー (HD-Zip) ファミリーのクラス II (HD-Zip II) に属する転写因子である
16 *ATHB17Δ113* たん白質が発現し、絹糸抽出期における雌穂重が増大する(参考資料 1)。

17 MON87403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
18 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
19 のため、MON87403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
20 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、
21 MON87403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
22 おそれはないと考えられた。

23
24 III 審議内容

25 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

26 (1) 遺伝的素材に関する事項

27 MON87403 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
28 (*Zea mays ssp. mays* (L.) Iltis) の非組換え品種 LH244 のデント種である。

29 MON87403 トウモロコシにはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)に由来す
30 る *ATHB17* 遺伝子が導入されている。*ATHB17* 遺伝子からは *ATHB17Δ113* たん
31 白質が発現し、絹糸抽出期における雌穂重が増大する(Rice et al., 2014)。

32
33 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

34 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
35 家畜等の飼養経験を持つ。

36 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

37 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
38 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
39 る副産物も飼料として利用されている（戸澤, 2005）。

41 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

42 MON87403 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
43 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 17）

45 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

46 MON87403 トウモロコシは既存のトウモロコシと同じであり、①収穫時期と貯
47 蔵方法、②家畜等の摂取（可食）部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法
48 についても非組換えトウモロコシと変わりはない。

50 以上（1）～（4）により、MON87403 トウモロコシの飼料としての安全性評価
51 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。

53 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

54 MON87403 トウモロコシは、ATHB17Δ113 たん白質を発現し、生殖生長初期の
55 雌穂重（雌穂バイオマス）が非組換えトウモロコシと比較して増大する（Rice et al.,
56 2014）。また、生殖生長初期に雌穂重や雌穂のサイズが増大することで、より多くの
57 同化産物が雌穂に蓄積し、生産性の向上の機会がもたらされる。その結果、成熟期に
58 おける種子数が増加（Fisher and Palmer, 1983; Severini et al., 2011）し、既存の
59 トウモロコシと比較して高収量性を見込める。

61 3 宿主に関する事項

62 (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

63 MON87403 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
64 (*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis) の非組換え品種 LH244 のデント種である。

66 (2) 遺伝的先祖に関する事項

67 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.
68 *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
69 地は、メキシコ、中米又は南米等と考えられている（OECD, 2003）。

70 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
71 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
72 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）。

74 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

75 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
76 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,
77 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。

78 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,
79 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
80 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
81 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,
82 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
83 ている (OECD, 2002)。

84
85 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

86 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。

87
88 (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

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

93
94 (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

95 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。

96
97 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

98 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
99 (*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
100 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
101 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,
102 2003b)。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
103 ないと考えられる。

104
105 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

106 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
107 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
108 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)。

109
110 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

111 トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

112
113 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

114 トウモロコシは成長点在地上に出た5～7葉期に6～8時間以上、0℃以下の外
115 気にさらされると生存できない (OECD, 2003b)。また、種子の休眠性は低い
116 (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
117 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
118 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

119 必要である (OECD, 2003a)。仮に自生したとしても、鍬や感受性を示す除草剤に
120 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, 2003b)。
121

122 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

123 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
124 (*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
125 という報告はない。
126

127

4 ベクターに関する事項

128 (1) 名称及び由来に関する事項

129 MON87403 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMAP5714 は、
130 *Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC 等を基に作成した。
131

132

132 (2) 性質に関する事項

133 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、
134 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。
135

136

136 (3) 薬剤耐性に関する事項

137 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイ
138 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
139 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
140 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
141 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。

142 なお、MON87403 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
143 れていないことを確認している。
144

145

145 (4) 伝達性に関する事項

146 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 は伝達を可能とする配列を含まない。
147

148

148 (5) 宿主依存性に関する事項

149 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 には、プラスミド pUC に由来する自律増殖の
150 ための複製開始領域 *ori-pUC* 及び広宿主域プラスミド RK2 に由来する自律増殖の
151 ための複製開始領域 *ori V* が組み込まれている。しかし、これらの領域により導入
152 用プラスミド PV-ZMAP5714 の外側骨格領域が植物や家畜等で増殖することはで
153 きない。なお、導入遺伝子の解析の結果、MON87403 トウモロコシ中には、これ
154 ら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。
155

156

156 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

157 プラスミド pUC 等を基に、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを導入し、導入用プラ
158 スミド PV-ZMAP5714 を作製した。
159

160 (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

161 MON87403 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
162 PV-ZMAP5714 を従来品種 LH244 に導入することにより作出された。

163
164 5 挿入遺伝子に関する事項

165 (1) 供与体に関する事項

166 ① 名称、由来及び分類に関する事項

167 MON87403 トウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子は、アブラナ科の植
168 物であるシロイヌナズナに由来する。

169
170 ② 安全性に関する事項

171 *ATHB17* 遺伝子の供与体であるシロイヌナズナはアブラナ科の雑草で、欧州、
172 アジア及び北米に広く自然分布している (Meinke et al., 1998)。シロイヌナズナ
173 は食用としての利用はなく、動物による摂取の報告もないが、同属の近縁植物種
174 であるミヤマハタザオ (*Arabidopsis lyrata*) は、ヒツジにより摂取されていること
175 が報告されている (Sandring et al., 2007)。油糧種子作物であるナガミノアマ
176 ナズナ (*Camelina sativa*) は、アブラナ科の栽培種のうち最もシロイヌナズナに
177 近縁であり (Flannery et al., 2006)、その葉は米国では生鮮野菜として食され
178 (Facciola, 1998)、その粉末は家畜用飼料の原材料として使われている (AAFCO,
179 2011)。研究従事者がシロイヌナズナの花粉に暴露することで生じた職業性喘息
180 の1件の報告 (Yates et al., 2008) を除いて、シロイヌナズナがアレルギー誘発
181 性や毒性を持つという報告はない。

182
183 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

184 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-
185 ZMAP5714 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
186 った。

187 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
188 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
189 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
190 除去した。

191 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、
192 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、土壤に移
193 植した後、生育させた。

194 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
195 粉させて R1 世代を作出し、R1 世代において *ATHB17* 遺伝子をホモで有し、*cp4*
196 *epsps* 遺伝子発現カセットを有しない個体を PCR 法により選抜し (Huang et al.,
197 2004)、その中から、形態特性及び導入遺伝子の解析結果に基づき、最終的な商品
198 化系統として MON87403 トウモロコシを選抜した。

199

200 (3) 構造に関する事項

201 ① プロモーターに関する事項

202 MON87403 トウモロコシに導入された *ATHB17* 遺伝子発現カセットは、
203 *e35S/Ract1* プロモーターによりその発現が制御されている。*e35S/Ract1* プロモ
204 ーターは二重エンハンサー領域を持ち、カリフラワーモザイクウイルス
205 (CaMV) 35SRNA プロモーター (Kay et al., 1987) とイネ (*Oryza sativa*) 由来
206 のアクチン 1 遺伝子のプロモーター (McElroy et al., 1990) からなるキメラプ
207 ロモーターで、植物細胞内で転写を誘導する。

208

209 ② ターミネーターに関する事項

210 *ATHB17* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ (*Triticum*
211 *aestivum*) の熱ショックたん白質 (Hsp17) の 3'末端非翻訳領域 (McElwain
212 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。

213

214 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

215 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 の外側骨格領域の全塩基配列、各構成要
216 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産
217 生する塩基配列は含まれていない。

218

219 (4) 性質に関する事項

220 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 中の各構成要素の由来及び機能については、
221 表 1 に示した。

222

223

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/Ract1</i> プロモーター	二重エンハンサー領域を持つカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35SRNA プロモーター (Kay et al., 1987) とイネ (<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> 遺伝子のプロモーター (McElroy et al., 1990) からなるキメラプロモーターで、恒常的に目的遺伝子を発現させる。
<i>Cab</i> リーダー配列	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) の葉緑素 a/b 結合たん白質の 5'末端非翻訳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。

<p style="text-align: center;"><i>ATHB17</i> コード配列</p>	<p>シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のホメオドメインーロイシンジッパー遺伝子ファミリーのクラス II (HD-Zip II) に属する <i>ATHB17</i> をコードする遺伝子 (Ariel et al., 2007)。転写因子として機能すると考えられる。</p>
<p style="text-align: center;"><i>Hsp17</i> ターミネーター</p>	<p>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。</p>

224

225

ATHB17 遺伝子の機能

226

227

228

229

230

231

232

233

ATHB17 遺伝子から発現される *ATHB17* たん白質は、ホメオドメインーロイシンジッパー (HD-Zip) ファミリーのクラス II (HD-Zip II) に属する転写因子である (Ariel et al., 2007)。この HD-Zip II たん白質はリプレッションドメインを持ち (Ciarbelli et al., 2008; Kagale et al., 2010)、標的遺伝子の発現を抑制することがシロイヌナズナで知られている (Hymus et al., 2013)。HD-Zip II たん白質をコードするシロイヌナズナの遺伝子の 1 つは、生殖生長における子実の生長に関与しており、適切な子実の生長及び発達に必要であることが知られている。

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

MON87403 トウモロコシに導入した遺伝子は、遺伝子発現の際に単子葉植物特有のスプライシングを受けるため、双子葉植物であるシロイヌナズナで発現する *ATHB17* たん白質と異なり、N 末端の 113 アミノ酸が欠失したたん白質 (*ATHB17Δ113* たん白質) として発現する (参考資料 3; Rice et al., 2014)。欠失している 113 アミノ酸は、リプレッションドメインの大部分に相当するため、*ATHB17Δ113* たん白質は標的遺伝子のプロモーター領域に結合する機能は維持しているが、標的遺伝子の発現を抑制することができない (Rice et al., 2014)。このため、MON87403 系統で発現する *ATHB17Δ113* たん白質は、トウモロコシ内在性の HD-Zip II たん白質が標的遺伝子のプロモーター領域に結合するのを拮抗的に阻害するドミナント・ネガティブ作用¹を起し、内在性遺伝子の発現を変化させると考えられた (Rice et al., 2014)。

245

246

247

248

249

250

251

252

253

ATHB17Δ113 たん白質の発現がトウモロコシ内在性遺伝子の発現に及ぼす影響を明らかにするため、*ATHB17* 遺伝子発現カセットを有する 2 つの組換え系統の雌穂花序及び雌穂を用いて RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行ったが、対照の非組換えトウモロコシと比較して遺伝子発現レベルの違いは少なく、MON87403 トウモロコシにおける内在性遺伝子の発現の変化は小さなものであると考えられた (Rice et al., 2014)。この要因として、*ATHB17Δ113* たん白質が転写リプレッサーとしての機能を失っているが標的遺伝子のプロモーター領域に結合する機能は維持しているため、トウモロコシ内在性の HD-Zip II たん白質と同じ経路に存在する遺伝子のみが影響を受

¹ ドミナント・ネガティブ作用とは、一部分を失ったポリペプチド又は変異したポリペプチドが、野生型の内在性の遺伝子の機能を阻害することである (Veitia, 2007)。例えば、野生型では活性ドメインを持つ転写因子は、活性ドメインを持たないポリペプチドの存在によって、その転写は競合的に阻害される (Veitia, 2007)。

254 けることが考えられた。また、シロイヌナズナでは、内在性の *HD-Zip II* 遺
255 伝子のプロモーター領域には *HD-Zip II* たん白質が結合する配列が存在し、
256 自身の発現を抑制するネガティブ・フィードバック機構を持つことが報告さ
257 れており (Ohgishi et al., 2001; Sawa et al., 2002)、MON87403 トウモロコシ
258 においても、*ATHB17Δ113* たん白質によって内在性の *HD-Zip II* 遺伝子の発
259 現抑制が解除された結果生じる *HD-Zip II* たん白質が、*ATHB17Δ113* たん白
260 質のドミナント・ネガティブ作用を抑えていると考えられた。

261 実際に、トウモロコシに存在する 18 種類の *HD-Zip II* 遺伝子 (Zhao et al.,
262 2011) の全てについて遺伝子の発現量を確認したところ、いずれの遺伝子も
263 *ATHB17* 遺伝子を導入していない対照のトウモロコシと比較して変化は見ら
264 れなかった (参考資料 4)。

265

266 (5) 純度に関する事項

267 導入用プラスミド PV-ZMAP5714 に含まれる遺伝子は、塩基配列解析により、
268 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 2)。

269

270 (6) コピー数に関する事項

271 MON87403 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
272 外側骨格配列の有無を次世代シーケンス技術²及びバイオインフォマティクスに
273 よる接合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis:
274 NGS/JSA)³ 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
275 (参考資料 6)。その結果、MON87403 トウモロコシ中の導入用プラスミド PV-
276 ZMAP5714 の T-DNA 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されており、導入
277 用プラスミド PV-ZMAP5714 由来の外側骨格領域は存在しないことが確認された
278 (参考資料 7)。

279 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
280 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、
281 MON87403 トウモロコシ中の挿入 DNA と、導入用プラスミド PV-ZMAP5714 の
282 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 7)。
283 また、MON87403 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
284 ノム内在性配列に 149 bp の欠失が認められたが、近傍配列の BLASTn 及び
285 BLASTx 検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
286 子の破壊はないと考えられた (参考資料 8)。

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

³ NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いた分子生物学的評価の手法である。NGS/JSA では、まず、NGS により MON87403 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)。

287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326

(7) 安定性に関する事項

MON87403 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 MON87403 トウモロコシから得られたゲノム DNA を用いて、NGS/JSA を実施したところ、導入遺伝子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 7)。

また、ATHB17Δ113 たん白質の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON87403 トウモロコシから採取した穀粒について、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で発現していることが確認された(参考資料 9)。

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 MON87403 トウモロコシを用いて End-Point TaqMan PCR 法により 3 世代の MON87403 トウモロコシにおける分離比を算出したが、観測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかったことから、MON87403 トウモロコシ中の T-DNAI 領域はトウモロコシ核ゲノムの単一遺伝子座に存在し、かつ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 10)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON87403 トウモロコシにおける ATHB17Δ113 たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 11)。試験には 2012 年に米国の 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、穀粒以外から ATHB17Δ113 たん白質の発現が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMAP5714 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 *aadA* 遺伝子 (Fling et al., 1985) が形質転換後の選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している。

なお、MON87403 トウモロコシに *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、NGS により確認されている。

(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

MON87403 トウモロコシの導入遺伝子とその両末端近傍配列の境界領域について、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、トウモロコシゲノム内在性配列から MON87403 トウモロコシ中の導入遺伝子にかけて存在し、かつ、8 つ以上連続するアミノ酸を有する ORF が 10 個確認された(参考資料 12)。この 10 個の ORF について、TOX_2014、AD_2014 及び PRT_2014 を用い、FASTA アルゴリズムにより既知の毒性たん白質、アレルゲン及び有害な生理活性たん白質との同源性検索を行った(参考資料 12)。その結果、PRT_2014 と 5'末端

327 側近傍配列のフレームで E-score が 1×10^{-5} 以下の配列が 18 個確認され、それら
328 はカリフラワーモザイクウイルス由来の配列であったが、一致した領域は
329 *ATHB17* 遺伝子発現カセット中の *e35S/Ract1* プロモーター (参考資料 7) から推
330 定されるアミノ酸配列であり、生理活性のあるたん白質にあたるとは考えられな
331 いことから、仮に MON87403 トウモロコシの導入遺伝子の両末端近傍配列にまた
332 がる塩基配列に由来する領域が翻訳されたとしても、それらがヒトに影響のある
333 既知の毒性たん白質、アレルゲン及び有害な生理活性たん白質との相同性を有す
334 るとは考えにくいとされた。

335 また、MON87403 トウモロコシ中の挿入 DNA において、目的以外の新規たん
336 白質が産生される可能性を検討するため、TOX_2014、AD_2014 及び PRT_2014
337 を用いた FASTA 型アルゴリズムにより既知の毒性たん白質等との相同性検索を行
338 ったが、相同性は認められなかった(参考資料 13)。

339

340 6 組換え体に関する事項

341 (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

342 MON87403 トウモロコシに導入された改 *ATHB17* 遺伝子から *ATHB17Δ113* た
343 ん白質を発現し、絹糸抽出期 (R1) の雌穂重が増大するという形質を有する。この
344 点を除けば、MON87403 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
345 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。

346

347 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

348 MON87403 トウモロコシ中で発現する *ATHB17Δ113* たん白質が既知の毒性た
349 ん白質と相同性を有するかを確認するために、TOX_2013 を用いた FASTA 型ア
350 ルゴリズムにより相同性検索を行ったが、既知の毒性たん白質との間に相同性は
351 認められなかった (参考資料 6)。

352

353 (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

354 *E. coli* で発現させた *ATHB17Δ113* たん白質を用いて、物理化学的処理に対す
355 る感受性を調べるため、以下アからウについて検討を行った。なお、*E. coli* から
356 調製した *ATHB17Δ113* たん白質と MON87403 トウモロコシ中の葉組織で発現
357 する *ATHB17Δ113* 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
358 ブロット法)、分子量(SDS-PAGE 法)、により確認している(参考資料 14)。

359

360 ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

361 *ATHB17Δ113* たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE 法及び
362 ウエスタンブロット分析により検討した結果、いずれにおいても人工胃液中で
363 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、SDS-PAGE の結
364 果、30 秒後の時点で 4~5kDa の一時的な断片が観察されたが、試験開始から 2
365 分後には観察されなかった(参考資料 15)。

366

367 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
368 ATHB17Δ113 たん白質の人工腸液中での消化性について、ウエスタンブロッ
369 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
370 下まで消化されることが確認された(参考資料 15)。

371
372 ウ 加熱処理
373 ATHB17Δ113 たん白質の加熱処理感受性について、5つの温度の条件下で
374 ELISA 分析により評価した結果、15 分間の条件下において 55°C以上では免疫
375 反応性減少せず、75°C以上でも免疫反応性の低下はわずかであった。また 30
376 分間の条件下では、37°C以下では免疫反応性は減少せず、55°C以上でも免疫反
377 応性の低下はわずかであった。ATHB17Δ113 たん白質の免疫反応性が維持さ
378 れていることから、ATHB17Δ113 たん白質が熱処理後もその構造を保持して
379 いると考えられた (参考資料 16)。

380 381 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

382 ATHB17Δ113 たん白質による影響を受ける可能性がある代謝経路は、トウモ
383 ロコシ内在性 HD-Zip II たん白質が関与する既存の代謝経路であると考えられる
384 が、MON87403 トウモロコシで新規の代謝経路が生じるような転写の変化が起
385 こっているとは考えにくいとされた。

386 また、内在性 HD-Zip II たん白質のネガティブ・フィードバック機構によって
387 ATHB17Δ113 たん白質が内在性遺伝子の発現に与える影響が抑えられることが
388 考えられる。実際に、ATHB17 遺伝子発現カセットを有する 2 つのトウモロコシ
389 系統の雌穂花序及び雌穂を用いて RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現
390 解析を行った結果、検出の基準を緩めた場合でも、発現レベルの違いが認められ
391 た遺伝子の数は 9 種と少なかった。この 9 種の遺伝子のうち 5 種について機能が
392 推定されたが、その機能は代謝経路に影響を与えるものではないと考えられた。
393 さらに、9 種の遺伝子について既知の毒性たん白質との相同性検索を行ったところ、
394 いずれも既知の毒性たん白質と構造的に類似性のある配列を有していないか、
395 発現量の変化により毒性が高まることはないと考えられた (参考資料 5)。これ
396 らのことから、ATHB17Δ113 たん白質がトウモロコシ内在性の遺伝子発現に与
397 える影響は小さく、トウモロコシ内在性の代謝経路に与える影響も、同様に小さ
398 なものであると考えられた。

399 400 (5) 宿主との差異に関する事項

401 MON87403 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
402 を評価するため、米国の 8 箇所のは場において栽培した MON87403 トウモロコシ
403 及び対照の非組換えトウモロコシ品種の穀粒及び地上部について、①主要構成成
404 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
405 分析を行った(参考資料 17)。

406

- 407 ① 主要構成成分
408 穀粒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
409 も対照の非組換えトウモロコシ品種と同等であった。
410
411
- 412 ② ビタミン
413 穀粒中の各ビタミンについて分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換え
414 トウモロコシ品種と同等であった。
415
- 416 ③ アミノ酸
417 穀粒中の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換え
418 トウモロコシ品種と同等であった。
419
- 420 ④ ミネラル
421 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、
422 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であった。
423
- 424 ⑤ 脂肪酸
425 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
426 ウモロコシ品種と同等であった。
427
- 428 ⑥ 有害生理活性物質
429 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
430 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
431 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。
432
- 433 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項
434 2010 年から 2014 年までの間に MON87403 トウモロコシのほ場試験が米国を
435 中心として延べ 799 箇所で行われているが、MON87403 トウモロコシの生存及び
436 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。
437
- 438 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
439 MON87403 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
440 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。
441
- 442 (8) 不活化法に関する事項
443 MON87403 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
444 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。
445
- 446 (9) 外国における認可等に関する事項

- Crops Under Different Environments. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- 7 Flannery, M.L., F.J. Mitchell, S. Coyne, T.A. Kavanagh, J.I. Burke, N. Salamin, P. Dowding and T.R. Hodkinson. 2006. Plastid genome characterisation in Brassica and Brassicaceae using a new set of nine SSRs. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 1221-1231.
 - 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 Huang, S., L.A. Gilbertson, T.H. Adams, K.P. Malloy, E.K. Reisenbigler, D.H. Birr, M.W. Snyder, Q. Zhang and M.H. Luethy. 2004. Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Research* 13: 451-461.
 - 10 Hymus, G.J., S. Cai, E.A. Kohl, H.E. Holtan, C.M. Marion, S. Tiwari, D.R. Maszle, M.R. Lundgren, M.C. Hong, N. Channa, P. Loida, R. Thompson, J.P. Taylor, E. Rice, P.P. Repetti, O.J. Ratcliffe, T.L. Reuber and R.A. Creelman. 2013. Application of HB17, an *Arabidopsis* class II homeodomain-leucine zipper transcription factor, to regulate chloroplast number and photosynthetic capacity. *Journal of Experimental Botany* 64: 4479-4490.
 - 11 ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed May 9, 2014].
 - 12 Kagale, S., M.G. Links and K. Rozwadowski. 2010. Genome-wide analysis of ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression motif-containing transcriptional regulators in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 152: 1109-1134.
 - 13 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.
 - 14 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
 - 15 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.
 - 16 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.
 - 17 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.

- 18 Meinke, D.W., J.M. Cherry, C. Dean, S.D. Rounsley and M. Koornneef. 1998. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662-682.
- 19 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.
- 20 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.
- 21 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.
- 22 Ohgishi, M., A. Oka, G. Morelli, I. Ruberti and T. Aoyama. 2001. Negative autoregulation of the *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-2*. *The Plant Journal* 25: 389-398.
- 23 Rice, E.A., A. Khandelwal, R.A. Creelman, C. Griffith, J.E. Ahrens, J.P. Taylor, L.R. Murphy, S. Manjunath, R.L. Thompson, M.J. Lingard, S.L. Back, H. Larue, B.R. Brayton, A.J. Burek, S. Tiwari, L. Adam, J.A. Morrell, R.A. Caldo, Q. Huai, J.-L.K. Kouadio, R. Kuehn, A.M. Sant, W.J. Wingbermuehle, R. Sala, M. Foster, J.D. Kinser, R. Mohanty, D. Jiang, T.E. Ziegler, M.G. Huang, S.V. Kuriakose, K. Skottke, P.P. Repetti, T.L. Reuber, T.G. Ruff, M.E. Petracek and P.J. Loida. 2014. Expression of a truncated *ATHB17* protein in maize increases ear weight at silking. *PLoS One* 9: e94238.
- 24 Sandring, S., M.-A. Riihimäki, O. Savolainen and J. Ågren. 2007. Selection on flowering time and floral display in an alpine and a lowland population of *Arabidopsis lyrata*. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 558-567.
- 25 Sawa, S., M. Ohgishi, H. Goda, K. Higushi, Y. Shimada, S. Yoshida and T. Koshiba. 2002. The *HAT2* gene, a member of the HD-Zip gene family, isolated as an auxin inducible gene by DNA microarray screening, affects auxin response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 32: 1011-1022.
- 26 Severini, A.D., L. Borrás, M.E. Westgate and A.G. Cirilo. 2011. Kernel number and kernel weight determination in dent and popcorn maize. *Field Crops Research* 120: 360-369.
- 27 Veitia, R.A. 2007. Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations. *The Plant Cell* 19: 3843-3851.
- 28 Yates, B., A. De Soyza, R. Harkawat and C. Stenton. 2008. Occupational asthma caused by *Arabidopsis thaliana*: A case of laboratory plant allergy. *European*

Respiratory Journal 32: 1111-1112.

- 29 Zhao, Y., Y. Zhou, H. Jiang, X. Li, D. Gan, X. Peng, S. Zhu and B. Cheng. 2011. Systematic analysis of sequences and expression patterns of drought-responsive members of the HD-Zip gene family in maize. PLoS ONE 6: e28488.
- 30 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.

475

476

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Physiological Assessments of Maize MON 87403 in 2012 U.S. Field Trials (MSL0025451) (社外秘)
- 2 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMAP5714 (社外秘)
- 3 Sequence Analysis of the ATHB17 RNA Transcript Produced in MON 87403 (MSL0024955) (社外秘)
- 4 Analysis of Endogenous Maize HD-Zip II Expression by RNA-seq for Japan (RAR-2017-0068) (社外秘)
- 5 Bioinformatics Evaluation of the Potential for Allergenicity and Toxicity of Differentially Expressed genes in MON87403 Utilizing the AD_2016 and TOX_2016 Databases (RAR-2017-0065) (社外秘)
- 6 Bioinformatics Evaluation of the ATHB17 Δ 113 Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0025242) (社外秘)
- 7 Amended Report for MSL0025316: Molecular Characterization of MON 87403 (MSL0025909) (社外秘)
- 8 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87403: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0025871) (社外秘)
- 9 Amended Report for MSL0025012: Demonstration of the Presence of ATHB17 Δ 113 Protein in Maize Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87403 (MSL0025213) (社外秘)
- 10 Segregation of the T DNA Insert in MON 87403 Across Three Generations (MSL0024676) (社外秘)
- 11 Assessment of ATHB17 Δ 113 Protein Levels in Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from Maize MON 87403 Produced in United States Field Trials during 2012 (MSL0026598) (社外秘)
- 12 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87403: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0025733) (社外秘)
- 13 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87403 Utilizing the AD_2014, TOX_2014 and PRT_2014 Databases (MSL0025648) (社外秘)
- 14 Amended Report for MSL0025447: Characterization of the ATHB17 Δ 113 Protein Purified from the Maize Leaf of MON 87403 and Comparison of the Physicochemical Properties of the Plant-Produced and Escherichia coli (E.

- coli)-Produced ATHB17 Δ 113 Proteins (MSL0025829) (社外秘)
- 15 Assessment of the *in vitro* Digestibility of ATHB17 Δ 113 Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0025516) (社外秘)
 - 16 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of Escherichia coli-Produced MON 87403 ATHB17 Δ 113 Protein (MSL0026235) (社外秘)
 - 17 Compositional Analyses of Maize Forage and Grain from MON 87403 Grown in the United States during 2012 (MSL0025567) (社外秘)

477