

**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及びグルホシネート  
耐性トウモロコシ MZHG0JG 系統**

**平成30年1月29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 .....	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 .....	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 .....	1 0
(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 1
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 .....	1 1
(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 2
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項 .....	1 3
(5) 宿主との差異に関する事項 .....	1 4
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項 .....	1 5
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項 .....	1 5
(8) 不活化法に関する事項 .....	1 5
(9) 外国における認可等に関する事項 .....	1 5
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項 .....	1 5
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項 .....	1 5
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 5
IV 審議結果 .....	1 6
V 参考文献及び参考資料 .....	1 7

# 「除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ MZHG0JG 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及びグルホシネート耐性トウモロコシ MZHG0JG 系統（以下「MZHG0JG トウモロコシ」という。）について、平成 29 年 2 月 15 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及びグルホシネート耐性トウモロコシ MZHG0JG 系統  
性 質：除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性  
申請者：シンジェンタジャパン株式会社  
開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

15 MZHG0JG トウモロコシには、除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を付与するため、トウモロコシに由来する *mepsps-02* 遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 由来の *pat-09* 遺伝子が導入されている。

20 MZHG0JG トウモロコシにおいては、*mepsps-02* 遺伝子によって産生される 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素（以下、「EPSPS たん白質」という。）の変異体は、除草剤グリホサートによる影響を受けないことから、グリホサート存在下でも芳香族アミノ酸の合成を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。また、*pat-09* 遺伝子によって産生されるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（以下、「PAT たん白質」という。）は、除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換し、その結果、植物はグルホシネートの影響を受けずに生育できる。

25 MZHG0JG トウモロコシと非組換え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、MZHG0JG 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、MZHG0JG 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。

30 なお、トウモロコシは、主に穀粒が飼料に利用される他、青刈りされたもの（サイレージ用）や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、コンスチープリカー等）が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
- (1) 遺伝的素材に関する事項

40 MZHG0JG トウモロコシを作出するのに用いた宿主は、イネ科トウモロコシ属  
(*Zea*) に属するデント種の非組換えトウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.)  
Illis) 品種 NP2222 である。

45 MZHG0JG トウモロコシには、トウモロコシに由来する EPSPS たん白質の変  
異体であり、EPSPS たん白質と同じ機能を有する mEPSPS たん白質をコードす  
る *mepsps-02* 遺伝子が導入されている。また *S. viridochromogenes* strain Tü494  
に由来する *pat-09* 遺伝子が導入されており、MZHG0JG トウモロコシにおいて  
PAT たん白質をコードする。

MZHG0JG トウモロコシは、mEPSPS たん白質及び PAT たん白質を発現する  
ことにより、除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を持つ。

50

## (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

MZHG0JG 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。

55

## (3) 飼料の構成成分等に関する事項

MZHG0JG 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 (ILSI, 2014)。

60

## (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MZHG0JG トウモロコシは、導入された *mepsps-02* 遺伝子及び *pat-09* 遺伝子  
により発現される mEPSPS たん白質及び PAT たん白質により、除草剤グリホサ  
ート及びグルホシネートに対する耐性が付与されている。これらの点を除けば、  
MZHG0JG 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。

65

(1) ~ (4) より、MZHG0JG トウモロコシの飼料としての安全性評価において  
は、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。

70

## 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MZHG0JG トウモロコシは、導入された *mepsps-02* 遺伝子によって mEPSPS た  
ん白質を発現し、除草剤グリホサート耐性を示す。また、導入された *pat-09* 遺伝子  
によって PAT たん白質を発現し、除草剤グルホシネート耐性を示す。これにより  
MZHG0JG トウモロコシは、作用機序の異なる 2 種類の除草剤を使用できるため、  
トウモロコシ生産者へ幅広い雑草防除の選択肢を提供する。

75

- 80      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**  
        MZHG0JG トウモロコシの作出に用いた宿主は、イネ科トウモロコシ属トウモ  
        ロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 NP2222 系統である。
- 85      (2) **遺伝的先祖に関する事項**  
        トウモロコシの遺伝的先祖は同じ *Zea* 属のテオシント (*Z. mays* subsp.  
        *Mexicana*) であり、人為的選抜を経て栽培化したといわれている (OECD, 2003)。  
        原産地は、メキシコ、中米又は南米等と考えられている (OECD, 2003)。
- 90      (3) **有害生理活性物質の生産に関する事項**  
        トウモロコシの有害生理活性物質について、毒性物質の産生性は知られていな  
        いが、抗栄養素としてフィチン酸やラフィノースが含まれている。
- (4) **寄生性及び定着性に関する事項**
- 95          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又は定  
        着することはない。
- (5) **ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項**  
        トウモロコシには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られている  
100          (OECD, 2003)が、これら病原菌のヒト及び家畜等への病原性は知られていない。
- (6) **自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項**  
        トウモロコシは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い。
- 105      (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。  
        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, 2001)。  
        トウモロコシの近縁植物として、テオシント (*Zea* 属) とトリプサカム  
110          (*Tripsacum* 属) 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)、トウモロコシの主な栽培地域である米国のコーン・ベルト地帯並  
115          びにヨーロッパ、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、トウモロコシとの交雑の可能性はない。
- (8) **飼料に利用された歴史に関する事項**  
        デント種のトウモロコシは、主に飼料として利用されてきた。また、食品分野

120 や工業分野においても幅広く利用されている（菊池，1987、農林水産省，2014、財務省，2016）。

#### （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。

125

#### （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℃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）。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℃以下の外気にさらされると生存できない（OECD, 2003）。

130

135

#### （11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシの近縁種であるテオシント及びトリプサカム属種においても、トウモロコシと同じ有害生理活性物質が含まれているが、有害となる程度の産生性は知られていない。

140

### 4 ベクターに関する事項

#### （1）名称及び由来に関する事項

MZHG0JG トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド pSYN18857 は、Danisco Biotechnology 社のプラスミド pVictor (Poulsen, 1997) を基に作成された。

145

#### （2）性質に関する事項

導入用プラスミド pSYN18857 の塩基数は 14,262 bp である。また、導入用プラスミド pSYN18857 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 1)、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。

150

#### （3）薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pSYN18857 の外骨格領域には、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 *Escherichia coli* のトランスポゾン Tn7 を由来とするアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼのコード領域である *aadA-03* 遺伝子(Fling *et al.*, 1985)が含まれており、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中の選抜マーカーとして用いられた。

155

#### （4）伝達性に関する事項

160 導入用プラスミド pSYN18857 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

165 上記(4)のことから、導入用プラスミド pSYN18857 が植物や家畜等で増殖  
することはできない。

#### (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

170 導入用プラスミド pSYN18857 は、mEPSPS たん白質を発現する *mepsps-02* 遺  
伝子発現カセット及び PAT たん白質を発現する *pat-09* 遺伝子発現カセットを含む  
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

175 MZHG0JG トウモロコシは、*mepsps-02* 遺伝子発現カセット及び *pat-09* 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非組換えトウ  
モロコシ品種 NP2222 の未熟胚に導入することで作出された。挿入位置は導入用  
プラスミド pSYN18857 の右側境界領域 (RB-01-01) から左側境界領域(LB-01-  
01)までの T-DNA 領域である。

### 5 挿入遺伝子に関する事項

#### 180 (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

MZHG0JG トウモロコシに導入された *mepeps-02* 遺伝子は、トウモロコシ  
に由来する。また、*pat-09* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* strain Tü494 に由  
来する。

185

##### ②安全性に関する事項

*mepsps-02* 遺伝子の供与体であるトウモロコシは、世界の主要穀物の 1 つで  
あり、動物やヒトは食経験を有している。また *pat-09* 遺伝子の供与体である  
*S. viridochromogenes* は腐生性の土壌微生物であり、食経験は無いが、ヒトや動  
物に対する病原菌ではないと考えられる (OECD,1999b)。

190

#### (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

195 非組換えトウモロコシ品種 NP2222 の未熟胚を、導入用プラスミド pSYN18857  
を含むアグロバクテリウムと共存培養することにより形質転換を行った後、未成  
熟胚をチカルシニンを添加した組織培養培地に移すことにより、アグロバクテリ  
ウム菌体を除去した。次にグルホシネートを添加した組織培養培地に移すことで、  
目的とする表現型を示す個体を選抜した後、さらにセフトキシムを添加した組  
織培養培地に移し、アグロバクテリウム菌体を完全に除去した。このようにして  
選抜された細胞から植物体を再分化させ、生育させた。

200 再分化個体について PCR 分析を行い、T-DNA 領域を有し、*aadA-03* 遺伝子が存在しないことを確認した個体から、最終的に MZHG0JG トウモロコシを選抜した。

### (3) 構造に関する事項

205 ① プロモーターに関する事項

*mepsps-02* 遺伝子発現カセットは、Ubi158-02 プロモーターによりその発現が制御されている。Ubi158-02 プロモーターはトウモロコシ (*Z. mays*) のユビキチン ZmU29158-3 遺伝子由来のプロモーター配列で、植物細胞内で転写を誘導する。

210 *pat-09* 遺伝子発現カセットは、35S-19 プロモーターによりその発現が制御されている。35S-19 プロモーターは Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来のプロモーター配列で (Odell *et al.*, 1985)、植物細胞内で転写を誘導する。

② ターミネーターに関する事項

215 *mepsps-02* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、トウモロコシ (*Z. mays*) のユビキチン ZmU29158-3 遺伝子由来の Ubi158-02 ターミネーターで、転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。

*pat-09* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている NOS-05-01 ターミネーターで、転写を終結させ、ポリアダニル化を誘導する。

220 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド pSYN18857 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

225 導入用プラスミド pSYN18857 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。*mepsps-02* 遺伝子及び *pat-09* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>mepsps-02</i> 遺伝子発現カセット	
FMV-05 エンハンサー	Figwort mosaic virus (FMV) 由来のエンハンサー領域で、転写活性を高める (Maiti <i>et al.</i> , 1997)。
35S-05 エンハンサー	Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来エンハンサー領域で、転写活性を高める (Ow <i>et al.</i> , 1987)。
Ubi158-02 プロモーター	トウモロコシのユビキチン ZmU29158-3 遺伝子由来のプロモーター配列で、トウモロコシポリユビキチン遺伝子のプロモーター (Christensen <i>et al.</i> , 1992) と塩基配列が類似している。目的遺伝子を恒常的に発現させる。
TMV-03	Tobacco mosaic virus (TMV) 由来のオメガ配列 (5' 末端側非翻訳リーダー

エンハンサー	配列) (Gallie <i>et al.</i> , 1987) で、植物における翻訳活性を高める (Gallie, 2002)。
OTP-02	ヒマワリとトウモロコシ由来の葉緑体輸送ペプチドを組み合わせて合成した N 末端最適輸送ペプチド (Optimized Transit Peptide) をコードする配列で、 <i>mepsps-02</i> 遺伝子によって発現する mEPSPS たん白質を葉緑体に輸送する働きを持つ (Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。
<i>mepsps-02</i> 遺伝子	トウモロコシに由来する 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素 (EPSPS たん白質) の変異体をコードする遺伝子。コードする mEPSPS たん白質では、トウモロコシの EPSPS たん白質の 102 番目のトレオニンがイソロイシンに、106 番目のプロリンがセリンに置換されている (Lebrun <i>et al.</i> , 2003) 。 mEPSPS たん白質は除草剤グリホサートの存在下でも活性を示し、植物に除草剤グリホサート耐性を付与する (Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
Ubi158-02 ターミネーター	トウモロコシのユビキチン <i>ZmU29158-3</i> 遺伝子由来のターミネーター配列で、トウモロコシユビキチン遺伝子のターミネーター (Christensen <i>et al.</i> , 1992) と塩基配列が類似している。ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
<i>pat-09</i> 遺伝子発現カセット	
35S-19 プロモーター	Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来のプロモーター配列 (Odell <i>et al.</i> , 1985)。植物において目的遺伝子を恒常的に発現させる。
<i>pat-09</i> 遺伝子	<i>S.viridochromogenes</i> strain Tü494 由来のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT たん白質) をコードする遺伝子。植物での発現を高めるために野生型の塩基配列 (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988) のコドン最適化しているが、コードする PAT たん白質のアミノ酸配列は変更していない。PAT たん白質が除草剤グルホシネートをアセチル化して不活化することで、植物にグルホシネート耐性を付与する (OECD 1999b) 。
NOS-05-01 ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン合成酵素 (NOS) 遺伝子由来のターミネーター配列 (Bevan <i>et al.</i> , 1983) で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
境界領域	
LB-01-01	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA 左側境界領域で、植物ゲノムへの T-DNA 領域の組み込みに必要 (Yadav <i>et al.</i> , 1982) 。
RB-01-01	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン Ti-プラスミド由来の T-DNA 右側境界領域で、植物ゲノムへの T-DNA 領域の組み込みに必要 (Wang <i>et al.</i> , 1984) 。
外骨格領域	
<i>aadA-03</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ遺伝子 (Fling <i>et al.</i> , 1985) で、ストレプトマイシン及びブスペクチノマイシン耐性を付与するため、細菌の選抜マーカーとして用いた。
<i>virG-01</i>	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) の pAD1289 由来の VirGN54D ( <i>virG</i> ) 遺伝

	子で、アグロバクテリウム法による効率的な形質転換に必要 (Hansen <i>et al.</i> ,1994)。
<i>repA-03</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 由来の pVS1 複製たん白質をコードする遺伝子で、グラム陰性植物寄生細菌中で機能する最小の pVS1 レプリコンの一部 (Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
VS1-02 ori	<i>P. aeruginosa</i> のプラスミド pVS1 由来の複製起点と分断領域の共通配列で、 <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) における複製開始点として機能する (Itoh <i>et al.</i> , 1984)。
ColE1-06 ori	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点 (Itoh and Tomizawa, 1979)。

230

① *mepsps-02* 遺伝子の機能

MZHG0JG トウモロコシに導入された *mepsps-02* 遺伝子から発現される mEPSPS たん白質は植物に除草剤グリホサートに対する抵抗性を付与する。EPSPS たん白質は、植物において芳香族アミノ酸 (チロシン、フェニルアラニン及びトリプトファン) の生合成に関するシキミ酸経路で作用する酵素の一つで、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸 3-リン酸 (S3P) から 5-エノールピルビンシキミ酸 3-リン酸 (EPSP) を生成する反応を触媒する (della-Cioppa *et al.*, 1986)。除草剤グリホサートは、植物の内在性 EPSPS たん白質の活性を阻害し、芳香族アミノ酸の合成を止めることで植物を枯死させる (Steinrücken and Amrhein, 1980; Lebrun *et al.*, 2003)。一方、*mepsps-02* 遺伝子がコードする mEPSPS たん白質は除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示す (Lebrun *et al.*, 2003) ため、除草剤グリホサートによって活性を阻害される内在性 EPSPS たん白質に変わって芳香族アミノ酸の合成を可能にすることで、植物に除草剤グリホサートへの耐性を付与する。

235

240

② *pat-09* 遺伝子の機能

MZHG0JG トウモロコシに導入された *pat-09* 遺伝子から発現される PAT たん白質は植物に除草剤グルホシネート耐性を付与する。植物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し植物は枯死する。一方 PAT たん白質は、グルホシネートをアセチル化して無毒性の *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝し、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害活性を不活化する (OECD, 1999b)。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても植物は枯死しない。

250

255

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pSYN18857 は、外骨格領域に抗生物質耐性マーカー遺伝子 (*aadA-03* 遺伝子) を有しており、これを利用したプラスミドの選抜及び増殖を通して純化されている。

260

#### (6) コピー数に関する事項

265 MZHG0JG トウモロコシに導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数及び外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結果、MZHG0JG トウモロコシ中の導入用プラスミド pSYN18857 の T-DNA 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されていること及び導入用プラスミド pSYN18857 の外骨格配列が存在しないことが確認された(参考資料 3)。

270 また、挿入 DNA とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、挿入 DNA 及び近傍領域の塩基配列解析を行った。その塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列が pSYN18857 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、MZHG0JG トウモロコシ中の挿入塩基配列は、導入用プラスミド pSYN18857 の右側境界領域(RB-01-01)の 22bp と左側境界領域(LB-01-01)の 21bp が欠損している点を除き、T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列と同一であることが確認された(参考資料 2)。

275 さらに、MZHG0JG トウモロコシにおいて、挿入 DNA が既知内在性の遺伝子を破壊していないかについて確認するため、DNA の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た結果、MZHG0JG 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の 22bp が欠損し、挿入 DNA の 5'及び 3'末端にそれぞれ 4bp と 39bp の DNA 断片が挿入されていた(参考資料 4)。しかし、近傍配列の BLASTx 解析の結果、挿入 DNA 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 5)。

280

#### (7) 安定性に関する事項

285 MZHG0JG 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 MZHG0JG 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、各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 3)。

290 また、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MZHG0JG トウモロコシを用いて PCR 分析により T-DNA 領域の有無を確認した結果、MZHG0JG トウモロコシにおける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、MZHG0JG トウモロコシ中の T-DNA 領域は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 6)。

290

#### (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

295 米国の 4 か所のは場から採取された MZHG0JG トウモロコシの組織を供試し、MZHG0JG トウモロコシにおける mEPSPS たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA 分析によりそれぞれ測定した(参考資料 7)。その結果、すべての組織サンプル(葉、穀粒、根、全植物体)から mEPSPS たん白質が、また収穫期の穀粒を除く組織サンプルから PAT たん白質が検出された。

295

#### 300 (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 pSYN18857 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイ

305 シンに対する耐性を付与する *E.coli* のトランスポゾン Tn7 由来の *aadA-03* 遺伝子 (Fling, *et al.*, 1985) が、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中の選抜マーカーとして外骨格領域に存在している。なお、MZHG0JG トウモロコシ中に *aadA-03* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析により確認されている (参考資料 3)。

#### (10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

310 MZHG0JG 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、30 以上の連続したアミノ酸からなるストップコドン (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た結果、149 個の ORF が確認された。それらについて、既知の毒性たん白質等との相同性の有無を確認するために、blastp 及び FASTA 検索アルゴリズムを利用してデータベースとの相同性検索を行った結果、有意な相同性は認められなかった (参考資料 8 及び 9)。

### 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

320 MZHG0JG トウモロコシは、導入された *mepsps-02* 遺伝子及び *pat-09* 遺伝子により除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を持つ。これらの点を除けば、MZHG0JG トウモロコシは非組換えトウモロコシ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。

#### (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

##### 325 ① mEPSPS たん白質

330 MZHG0JG トウモロコシ中で発現する mEPSPS たん白質が既知の毒性たん白質等と相同性を有するか確認するために、NCBI Entrez® Protein Database (NCBI, 2016)、Syngenta Toxin Database、blastp (version 2.2.28+) (Altschul *et al.*, 1997)、FARRP database (version 16) (FARRP, 2016) 及び FASTA 検索アルゴリズム (Pearson and Lipman, 1988) により相同性検索を行った。その結果、既知の毒性たん白質等との間に有意な相同性は認められなかった (参考資料 10 及び 11)。

##### ② PAT たん白質

335 MZHG0JG トウモロコシ中で発現する PAT たん白質が既知の毒性たん白質等と相同性を有するか確認するために、mEPSPS たん白質と同じ手法により相同性検索を行った。その結果、既知の毒性たん白質等との間に有意な相同性は認められなかった (参考資料 12 及び 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

340 MZHG0JG トウモロコシ中で発現している EPSPS たん白質及び PAT たん白質について、以下アからウについて検討を行った。なお、実際の処理は *E. coli* から調整したそれぞれのたん白質を用いて行なっており、これら *E. coli* 由来のたん白

345 質と MZHG0JG トウモロコシ中で発現するたん白質と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）、分子量(SDS-PAGE 分析)、グリコシル化状態、酵素活性及びアミノ酸配列分析により確認している（参考資料 14 及び 15）。

① mEPSPS たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

350 mEPSPS たん白質の人工胃液（SGF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中では試験開始 1 分後には消化されることが確認された（参考資料 16）。

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

355 mEPSPS たん白質の人工腸液（SIF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工腸液中では試験開始 10 分後には完全長の mEPSPS たん白質は消化されることが確認された（参考資料 18）。

ウ 加熱処理

360 mEPSPS 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、65℃以上の条件下では 30 分の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 20）。

② PAT たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

365 PAT たん白質の人工胃液（SGF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 1 分後には消化されることが確認された（参考資料 17）。

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

370 PAT たん白質の人工腸液（SIF）中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工腸液中での試験開始 5 分後には消化されることが確認された（参考資料 19）。

ウ 加熱処理

375 PAT たん白質の加熱処理感受性について、酵素活性により検討した結果、65℃以上の条件下では 30 分の加熱処理により失活することが確認された（参考資料 21）。

380

（4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① mEPSPS たん白質

385 EPSPS たん白質は、植物において芳香族アミノ酸の生合成に関与するシキミ  
酸経路で作用する酵素の一つで、ホスホエノールピルビン酸(PEP)とシキミ酸 3-  
リン酸(S3P)から 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸(EPSP)を生成する反応  
を触媒する(della-Cioppa *et al.*, 1986)。EPSPS たん白質は、PEP 及び S3P と  
特異的に反応することが知られている(OECD, 1999a)。PEP と S3P 以外に  
390 EPSPS たん白質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  
ミ酸のみであるが、その反応性は S3P との反応性の約 200 万分の 1 であり  
(Gruys *et al.*, 1992)、このことから植物体内でシキミ酸が基質として反応するこ  
とはないと考えられる。また、EPSPS たん白質による反応は、芳香族アミノ酸  
生合成における律速段階ではないと考えられており、EPSPS たん白質の活性が  
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  
395 いことが報告されている(Padgette *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 2002)。実際に  
mEPSPS たん白質を発現する MZHG0JG トウモロコシについて、2013 年に米  
国の計 8 か所の圃場で栽培試験を行い、収穫した穀粒における構成成分を分析  
した結果、芳香族アミノ酸についてはトリプトファンを除いて対照の非組換え  
400 トウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。また、トリプトフ  
アンも対照の非組換えトウモロコシと比較して増加はしておらず、同時に栽培  
した参考品種の分析値及び一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献  
値(ILSI, 2014)の範囲内であった(参考資料 22)。

以上のことから、MZHG0JG トウモロコシにおける mEPSPS たん白質の発現  
が宿主の代謝経路へ影響を及ぼすことはないと考えられる。

405

## ② PAT たん白質

PAT たん白質は、グルホシネートをアセチル化することで、植物に対して毒性  
のない *N*-アセチル-*L*-グルホシネートへ代謝する酵素である。PAT たん白質は、  
アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い基質特異性を示すものの、他の各種  
410 アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミ  
ン酸への特異性も低い (Thompson *et al.*, 1987)。また、過剰の各種アミノ酸の存  
在下でも、PAT たん白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応が阻害さ  
れることはなかった (OECD, 1999b)。このように PAT たん白質は高い基質特異  
性を有することから、生体内において PAT たん白質の発現が宿主の代謝経路に影  
415 響を及ぼすことはないと考えられる。

## (5) 宿主との差異に関する事項

MZHG0JG 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 8 か所のほ場において栽培した MZHG0JG トウモロコ  
シ及び対照の非組換えトウモロコシの茎葉を用いて主要構成成分とミネラルを、  
420 また、穀粒を用いて主要構成成分、脂肪酸、アミノ酸、ミネラル、ビタミン、2 次  
代謝産物及び抗栄養素の分析を行った。また、この 8 か所のほ場において参考品  
種として 6 品種の非組換えの商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った(参考  
資料 22)。MZHG0JG トウモロコシへの除草剤散布については、3 葉期頃から 4 葉

425 期頃にかけて、グルホシネート(約 0.44~0.47 kg a.i./ha)を、5 葉期頃から 6 葉期頃にかけて、グリホサート(約 0.86~0.91 kg a.i./ha)を散布した。

その結果、MZHG0JG トウモロコシの各種構成成分は、対照の非組換えトウモロコシあるいは従来のトウモロコシと同程度であることが確認された。

430 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国を中心として行われたほ場試験において、MZHG0JG トウモロコシの生存及び増殖能力は非組換えトウモロコシと相違ないことが確認されている。

435 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

MZHG0JG 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相違ないことが確認されている。

(8) 不活化法に関する事項

440 MZHG0JG トウモロコシは、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の使用)等のトウモロコシを枯死させる従来の方法で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

445 米国においては、2015 年 12 月に米国農務省(USDA)により無規制裁培の安全性が、2016 年 2 月に米国食品医薬品庁(FDA)により食品・飼料としての安全性が確認された。カナダにおいては、カナダ保健省(Health Canada)により食品としての、またカナダ食品検査庁(CFIA)により飼料・環境での安全性が共に 2016 年 5 月に確認された。オーストラリア及びニュージーランドにおいては、2016 年 4 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)により食品としての安全性が確認された。

450

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

455 MZHG0JG トウモロコシは除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を付与されており、その生育期に雑草防除のために除草剤グリホサート及びグルホシネートを使用できることを除いて、栽培方法は非組換えトウモロコシとの相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

460 MZHG0JG トウモロコシの種子の製法及び管理方法は非組換えトウモロコシとの相違はない。

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。

465

#### IV 審議結果

470 除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性トウモロコシ MZHGOJG 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、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

#### V 参考文献及び参考資料

##### 参考文献

- 1 Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- 2 Bevan M, Barnes WM, Chilton M-D. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- 3 CFIA. 2014. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Biology Document BIO1994-11. Canadian Food Inspection Agency (CFIA).  
<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367>.  
(accessed September 27, 2016).
- 4 Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. 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 della-Cioppa G, Bauer SC, Klein BK, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM. 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.
- 6 FARRP. 2016. FARRP AllergenOnline database, version 16 (released on January 27, 2016). Food Allergy Research and Resource Program, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA.
- 7 Fling ME, Kopf J, Richards C. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 8 Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. 1987. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcription *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 15: 3257-3273.
- 9 Gallie DR. 2002. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Research* 30: 3401-3411.
- 10 Gruys KJ, Walker MC, Sikorski JA. 1992. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 11 Hansen G, Das A, Chilton M-D. 1994. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America 91: 7603-7607.
- 12 Heeb S, Itoh Y, Nishijyo T, Schnider U, Keel C, Wade J, Walsh U, O'Gara F, Haas D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in Gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 232-237.
  - 13 ILSI. 2014. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, v. 5.0. [https://www.cropcomposition.org/query/workflow.wiz?\\_flowExecutionKey=c6886C559-0E6D-CA0F-8F3E-712414415484\\_kC931BD5D-53E0-2FFD-A254-E11513FC0D7E;searchparameters:crop type = "CORN Field," tissue type = "FORAGE" or "GRAIN", crop year = "All", country = "All", and regions = "All";](https://www.cropcomposition.org/query/workflow.wiz?_flowExecutionKey=c6886C559-0E6D-CA0F-8F3E-712414415484_kC931BD5D-53E0-2FFD-A254-E11513FC0D7E;searchparameters:crop%20type%3D%22CORN_Field%22,tissue%20type%3D%22FORAGE%22%20or%20%22GRAIN%22,crop%20year%3D%22All%22,country%3D%22All%22,and%20regions%3D%22All%22) (accessed October 6, 2014).
  - 14 Itoh T, Tomizawa J. 1979. Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H, and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43: 409-417.
  - 15 Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.
  - 16 Lebrun M, Leroux B, Sailland A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. Rhone-Poulenc Agrochimie, assignee. U.S. Patent No. 5,510,471. Washington, DC: U.S. Patent Office.
  - 17 Lebrun M, Sailland A, Freyssinet G, Degryse E. 2003. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. Bayer CropScience S.A., assignee. U.S. Patent No. 6,566,587 B1. Washington, DC: U.S. Patent Office.
  - 18 Maiti IB, Gowda S, Kiernan J, Ghosh SK, Shepherd R. 1997. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. *Transgenic Research* 6: 143-156.
  - 19 NCBI. 2016. Entrez® Protein database. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>.
  - 20 Odell JT, Nagy F, Chua NH. 1985. Identification of DNA sequences required for the activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
  - 21 OECD. 1999a. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 10: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9.
  - 22 OECD. 1999b. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
  - 23 OECD. 2002. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6: 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.
  - 24 OECD. 2003. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 27: Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize).

- ENV/JM/MONO(2003)11.
- 25 Ow DW, Jacobs JD, Howell SH. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4870-4874.
  - 26 Padgett SR, Taylor NB, Nida DL, Bailey MR, MacDonald J, Holden LR, Fuchs RL. 1996. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *The Journal of Nutrition* 126: 702-716.
  - 27 Pearson WR, Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 2444-2448.
  - 28 Poulsen P. 1997. Inhibition of gene expression. Danisco A/S, assignee. Patent No. WO 97/04112. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
  - 29 Ridley WP, Sidhu RS, Pyla PD, Nemeth MA, Breeze ML, Astwood JD. 2002. Comparison of the nutritional profile of glyphosate-tolerant corn event NK603 with that of conventional corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7235-7243.
  - 30 Steinrücken HC, Amrhein N. 1980. The Herbicide Glyphosate is a Potent Inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic Acid-3-Phosphate Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
  - 31 Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.
  - 32 Wang K, Herrera-Estrella L, Van Montagu M, Zambryski P. 1984. Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell* 38: 455-462.
  - 33 Wilkes HG. 1972. Maize and its wild relatives. *Science* 177: 1071-1077.
  - 34 Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Pühler A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
  - 35 Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton M-D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 6322-6326.
  - 36 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
  - 37 財務省. 2016. 財務省貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>. (accessed November 2, 2016)
  - 38 瀧澤康孝 2001 子実用トウモロコシの栽培 II 栽培の実際 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 110-128
  - 39 中村茂文 2001 生育のステージと生理, 生態 I 種子と発芽 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp. 41-43
  - 40 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 2014 飼料月報 平成 25 年度 4 月~3 月

[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryocyosa/pdf/h25.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryocyosa/pdf/h25.pdf) [Accessed Sep 17, 2014]

475

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Plasmid pSYN18857: Plasmid Lineage Analysis and Sequence. Assessment Amendment 2. Report No. TK0062606 A2. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 2 Event MZHG0JG Maize: Insert and Flanking Sequence Analysis. Final Report. Report No. TK0062609. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 3 Event MZHG0JG Maize: Southern Analyses. Final Report Amendment 1. Report No. TK0062613 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 4 Event MZHG0JG Maize: Genomic Insertion Site Analysis. Final Report. Report No. TK0062604. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 5 Event MZHG0JG Maize: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analyses of Maize Genomic Sequences Flanking the Insert. Assessment. Report No. TK0288709. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 6 Event MZHG0JG Maize: Mendelian Inheritance Analysis. Final Report Amendment 1. Report No. TK0062603 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 7 Quantification of Double-mutated 5-Enol Pyruvylshikimate-3- phosphate Synthase and Phosphinothricin Acetyltransferase in Event MZHG0JG Maize Tissues. Assessment. Report No. TK0062594\_SR\_01. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 8 Event MZHG0JG: Allergenicity and Toxicity Assessment of Hypothetical Open Reading Frames within the MZHG0JG Insert Defined by Stop to Stop Codons. Assessment. Report No. SSB-178-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 9 Event MZHG0JG junctions: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop, Genome to Insert Junction Open Reading Frames. Assessment. Report No. SSB-153-15. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 10 mEPSPS: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 2. Report No. SSB-107-16 A2. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 11 mEPSPS: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-104-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 12 PAT (pat): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 1. Report No. SSB-108-16 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 13 PAT (pat): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-106-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 14 Comparison of Double Mutated Maize 5-Enolpyruvylshikimate-3- Phosphate Synthase (mEPSPS) Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli* and mEPSPS Protein Produced in Event MZHG0JG Derived Maize Plants. Final Report. Report No. TK0062573. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 15 Comparison of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli* and PAT Protein Produced in Event MZHG0JG Derived

- Maize Plants. Final Report. Report No. TK0062575. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 16 *In vitro* Digestibility of Double-Mutated Maize 5-Enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (mEPSPS) Test Substances GA21-0104 and IAPGA21-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Amended Report No.1. Report No. SSB-007-05 A1. Syngenta Biotechnology, Inc.
  - 17 *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Final Report. Report No. TK0062551. Syngenta Crop Protection, LLC.
  - 18 *In vitro* Digestibility of Double Mutated Maize 5-Enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (mEPSPS) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Final Report. Report No. TK0179518. Syngenta Crop Protection, LLC.
  - 19 *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Study No. TK0030220. Syngenta Biotechnology, Inc.
  - 20 Effect of Temperature on the Immunoreactivity of the Double-Mutated Maize 5-Enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (mEPSPS) Enzyme. Report No. SSB-021-07. Syngenta Biotechnology, Inc.
  - 21 Effect of Temperature on the Enzymatic Activity of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein. Final Report. Report No. TK0062553. Syngenta Crop Protection, LLC.
  - 22 Compositional Analysis of Forage and Grain from MZHG0JG Maize Treated with Trait-Specific Herbicides Grown During 2013 in the USA. Assessment. Report No. TK0062583\_SR\_01. Syngenta Crop Protection, LLC.