

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グル ホシネート耐性トウモロコシ MZIR098 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	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
	(1) 遺伝的素材に関する事項	4
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	4
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
3	宿主に関する事項	5
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	5
	(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
	(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
	(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	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	7
	(4) 伝達性に関する事項	7
	(5) 宿主依存性に関する事項	7
	(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	7
	(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	7
5	挿入遺伝子に関する事項	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	8
	(3) 構造に関する事項	8
	(4) 性質に関する事項	9

(5) 純度に関する事項	1 1
(6) コピー数に関する事項	1 1
(7) 安定性に関する事項	1 2
(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 3
(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 3
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	1 3
(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 5
(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 6
IV 審議結果	1 6
V 参考文献及び参考資料	1 7

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ MZIR098 系統」 に係る安全性確認

I はじめに

5 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ MZIR098 系統（以下「MZIR098 トウモロコシ」という。）について、平成 29 年 9 月 4 日付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：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ MZIR098 系統
性 質：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤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
15 開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

20 MZIR098トウモロコシには、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与するため、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* に由来する *cry3A* 遺伝子の改変遺伝子である *mcry3A* 遺伝子、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子と前述の *mcry3A* 遺伝子のキメラ遺伝子である *ecry3.1Ab* 遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* strain Tü494 に由来する *pat-08* 遺伝子が導入されている。

25 MZIR098トウモロコシにおいては、*mcry3A* 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子から発現する mCry3A たん白質及び eCry3.1Ab たん白質が MZIR098 トウモロコシを摂取したコウチュウ目害虫に消化された後、活性をもつコアたん白質となって標的昆虫の中腸上皮細胞を破壊することで殺虫活性を示し、植物にコウチュウ目害虫への抵抗性を付与する。

また、*pat-08* 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。

30 MZIR098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、MZIR098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、MZIR098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。

35 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

45 MZIR098 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.) Iltis) 品種 NP2222 である。

MZIR098 トウモロコシには、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* に由来する *cry3A* 遺伝子の改変遺伝子である *mcry3A* 遺伝子が導入されている。*mcry3A* 遺伝子は、MZIR098 トウモロコシにおいて mCry3A たん白質をコードする。

50 また *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子と前述の *mcry3A* 遺伝子のキメラ遺伝子である *ecry3.1Ab* 遺伝子が導入されている。*ecry3.1Ab* 遺伝子は MZIR098 トウモロコシにおいて eCry3.1Ab たん白質をコードする。

55 さらに *S. viridochromogenes* strain Tü494 に由来する *pat-08* 遺伝子が導入されており、MZIR098 トウモロコシにおいて PAT たん白質をコードする。

MZIR098 トウモロコシは、mCry3A たん白質、eCry3.1Ab たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グルホシネートに対する耐性を持つ。

60 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

MZIR098 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。

65 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

MZIR098 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)。

70 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

75 MZIR098 トウモロコシは、導入された *mcry3A* 遺伝子、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pat-08* 遺伝子により発現される mCry3A たん白質、eCry3.1Ab 及び PAT たん白質により、コウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤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、MZIR098 トウモロコシは既存のトウモロコシと差異はなく、既存種と比較してア. 収穫時期 (成熟程度) と貯蔵方法、イ. 家畜等の摂取(可食)部位、ウ. 家畜等の摂取量、エ. 調製及び加工方法についても変わりはない。

(1) ~ (4) より、MZIR098 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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MZIR098 トウモロコシは、導入された *mcry3A* 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子によって mCry3A 及び eCry3.1Ab たん白質を発現し、コウチュウ目害虫抵抗性を示す。これにより MZIR098 トウモロコシでは、結合部位の異なる 2 種類のたん白質を発現

するため、単独で発現した場合と比べて標的コウチュウ目昆虫の抵抗性獲得がより困難になると期待される。

また、導入された *pat-08* 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ため、生育期間における除草剤グルホシネートの散布による雑草防除が可能である。

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

トウモロコシ (*Zea mays* L.) はイネ科トウモロコシ属に属し、子実の形状と粒質からデントコーン、フリントコーン、スイートコーン、ポップコーン、フラワーコーン、ワキシコーン、ポッドコーン等に分類される (山田, 2001)。

MZIR098 トウモロコシの作出に用いた宿主は、トウモロコシ (*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 NP2222 である。

(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)。

(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

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 (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。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

120 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
125 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 (*Z. mexicana*, $2n=20$) とトリプ
125 サクム属 (*Tripsacum* spp., $2n=36$) がある。自然条件下や人工交配でテオシント
がトウモロコシと容易に交雑するのに比べ、トリプサクム属では自然条件下と人工
130 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
130 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
135 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。

140 (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
145 ある (OECD, 2003)。種子の休眠性は知られていない。また、収穫時に雌穂又は種
子が地上に落下しても、土壌温度が 10°C に達し、適度な水分条件を伴うまで発芽
しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987、中村, 2001)。
また、トウモロコシは仮に発芽しても、生長点が地上に出た後、6~8 時間以上 0°C
以下の外気にさらされると生存できない (OECD, 2003)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

150 トウモロコシの近縁種であるテオシント及びトリプサクム属種においても、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。

4 ベクターに関する事項

155 (1) 名称及び由来に関する事項

MZIR098 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド pSYN17629 は、
Danisco Biotechnology 社のプラスミド pVictor (Poulsen, 1997) を基に作成され
た。

(2) 性質に関する事項

160 導入用プラスミド pSYN17629 の塩基数は 13,821 bp である。また、導入用プラスミド pSYN17629 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。

165 (3) 薬剤耐性に関する事項

170 導入用プラスミド pSYN17629 の外側骨格領域には、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ダ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。

(4) 伝達性に関する事項

175 導入用プラスミド pSYN17629 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

180 上記(4)のことから、導入用プラスミド pSYN17629 が植物や家畜等で増殖することはできない。

180 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

185 導入用プラスミド pSYN17629 は、mCry3A たん白質を発現する *mcry3A* 遺伝子発現カセット、eCry3.1Ab たん白質を発現する *ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び PAT たん白質を発現する *pat-08* 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

190 MZIR098 トウモロコシは、*mcry3A* 遺伝子発現カセット、*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び *pat-08* 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 の未成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 pSYN17629 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

(1) 供与体に関する事項

195 ①名称、由来及び分類に関する事項

MZIR098 トウモロコシに導入された *mcry3A* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* に由来する。また *ecry3.1Ab* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子と前述の *mcry3A* 遺伝子のキメラ遺伝子である。さらに *pat-08* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* strain Tü494 に由来す

200 る。

②安全性に関する事項

205 *mcry3A* 遺伝子及び *ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は土壤中に広く存在する微生物であり、また *pat-08* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、腐生性の土壤微生物である。共に食経験は無いが、動物やヒトに対する病原菌ではないと考えられる。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

210 非組換えトウモロコシ品種 NP2222 の未成熟胚を、導入用プラスミド pSYN17629 を含むアグロバクテリウムと共置培養することにより形質転換を行った後、未成熟胚を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しグルホシネートによって形質転換されていない植物細胞の生育を阻害し、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。

215 再分化個体 (T₀) 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 MZIR098 トウモロコシを選抜した。

220

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

225 *ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセットは、CMP-04 プロモーターによりその発現が制御されている。CMP-04 プロモーターは *Cestrum yellow leaf curling virus* 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。

mcry3A 遺伝子発現カセットは、Ubi1-18 プロモーターによりその発現が制御されている。Ubi1-18 プロモーターはトウモロコシのポリユビキチン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。

230 *pat-08* 遺伝子発現カセットは、35S-04 プロモーターによりその発現が制御されている。35S-04 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

235 *ecry3.1Ab* 及び *pat-08* 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) 遺伝子由来の NOS-05-01 ターミネーター (Bevan *et al.*, 1983) で、転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

mcry3A 遺伝子発現カセットのターミネーターは、NOS-05-01 ターミネーターの塩基配列を変更した NOS-20 ターミネーターで、転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

240

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 pSYN17629 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

245

導入用プラスミド pSYN17629 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。*ecry3.1Ab* 遺伝子、*mcry3A* 遺伝子及び *pat-08* 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>ecry3.1Ab</i> 遺伝子発現カセット	
NOS-02 エンハンサー	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子 (Bevan <i>et al.</i> , 1983)のエンハンサー領域で、転写活性を高める。
CMP-04 プロモーター	Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター配列で、目的遺伝子を恒常的に発現させる (Hohn <i>et al.</i> , 2007)。
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> 由来の 2 種類の <i>cry</i> 遺伝子 (<i>mcry3A</i> 遺伝子及び <i>cry1Ab</i> 遺伝子) 断片で構成された遺伝子で、特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す Cry3.1Ab たん白質をコードする。 <i>B. thuringiensis</i> 由来の Cry たん白質は互いに構造類似性を有することから、異なる <i>cry</i> 遺伝子間で対応するドメイン同士を交換しキメラの <i>cry</i> 遺伝子を作製することができる。 <i>mcry3A</i> 遺伝子：以下の <i>mcry3A</i> 遺伝子の項を参照。 <i>cry1Ab</i> 遺伝子： <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株由来の <i>cry1Ab</i> 遺伝子 (Geiser <i>et al.</i> , 1986) を、トウモロコシでの発現に最適なコドン配列 (Murray <i>et al.</i> , 1989) になるように一部の塩基を変更した遺伝子 (Koziel <i>et al.</i> , 1997) で、特定のチョウ目昆虫に殺虫活性を示す Cry1Ab たん白質をコードする。
NOS-05-01 ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子 (Bevan <i>et al.</i> , 1983) 由来のターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
<i>mcry3A</i> 遺伝子発現カセット	
Ubi1-18 プロモーター	トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域を含むプロモーター配列で、植物細胞において目的遺伝子を恒常的に発現させる (Christensen <i>et al.</i> , 1992) 。
<i>mcry3A</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>tenebrionis</i> 由来の <i>cry3A</i> 遺伝子 (Sekar <i>et al.</i> , 1987) を、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドン配列 (Murray <i>et al.</i> , 1989) に変更した、特定のコウチュウ目昆虫に殺虫活性を示す mCry3A たん白質をコードする遺伝子。標的であるコウチュウ目昆虫に対する殺虫活性を高めるため、野生型 Cry3A たん白質の一部アミノ酸配列をカテプシン G

	プロテアーゼ認識配列に置換している (Chen and Stacy, 2007)。
NOS-20 ターミネーター	<i>NOS-05-01</i> ターミネーターの塩基配列を変更したターミネーター配列で、ポリアデニル化により mRNA の転写を終結させる。
<i>pat-08</i> 遺伝子発現カセット	
35S-04 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-08</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 (Wohleben <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, 1999)。
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)。
ColeE1-06 ori	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点 (Itoh and Tomizawa, 1979)。

① *mcry3A* 遺伝子の機能

MZIR098 トウモロコシに導入された *mcry3A* 遺伝子から発現される mCry3A たん

255 白質は植物に特定のコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。mCry3A たん白質は、Western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*) 等の特定のコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す *B. thuringiensis* 由来の Cry たん白質である。Cry たん白質は、標的昆虫が摂取して消化すると、活性を持つコアたん白質となって標的昆虫の中腸上皮細胞の受容体に結合し、小孔を形成して細胞を破壊することで殺虫活性を示す (OECD, 2007)。

② *ecry3.1Ab* 遺伝子の機能

260 MZIR098 トウモロコシに導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子から発現される eCry3.1Ab たん白質は植物に特定のコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。eCry3.1Ab たん白質は、Western corn rootworm (*D. virgifera virgifera*) 等の特定のコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す *B. thuringiensis* 由来の Cry たん白質である。Cry たん白質は、標的昆虫が摂取して消化すると、活性を持つコアたん白質となって標的昆虫の中腸上皮細胞の受容体に結合し、小孔を形成して細胞を破壊することで殺虫活性を示す (OECD, 2007)。

③ *pat-08* 遺伝子の機能

270 MZIR098 トウモロコシに導入された *pat-08* 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精製する。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, 1999)。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。

(5) 純度に関する事項

280 導入用プラスミド pSYN17629 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。

(6) コピー数に関する事項

285 MZIR098 トウモロコシに導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数及び外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、MZIR098 トウモロコシ中の導入用プラスミド pSYN17629 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 pSYN17629 の外側骨格配列が存在しないことが確認された(参考資料 3)。

290 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 pSYN17629 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、MZIR098 トウモロコシ中の挿入塩基配列は、導入用プラスミド pSYN17629 の右

側境界領域(RB-01-01)とそれに続く 10bp の非たん白質コード配列及び左側境界領域(LB-01-01)の 10bp 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が同一であることが確認された(参考資料 2)。

295

さらに、MZIR098 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、MZIR098 トウモロコシの導入遺伝子の挿入部位においてトウモロコシゲノム内在性配列に 24bp の欠損が認められた(参考資料 4)。しかし、近傍配列の BLASTx 解析の結果、挿入 DNA の導入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた(参考資料 5)。

300

(7) 安定性に関する事項

MZIR098 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 MZIR098 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 7)。

305

また、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MZIR098 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、3 世代における MZIR098 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、MZIR098 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)。

310

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

米国の 4 か所のほ場から採取された MZIR098 トウモロコシの組織を供試し、MZIR098 トウモロコシにおける mCry3A、eCry3.1Ab 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 8)。その結果、すべての組織サンプル(葉、穀粒、根、全植物体)から mCry3A 及び eCry3.1Ab たん白質が、また穀粒を除く組織サンプルから PAT たん白質が検出された。

315

320

(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 pSYN17629 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *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側骨格領域に存在している。なお、MZIR098 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)。

325

(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

MZIR098 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(参考資料 9 及び 10)結果、151 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

330

335 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 9 及び 10)。

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

340 MZIR098 トウモロコシは、導入された *mcry3A* 遺伝子、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pat-08* 遺伝子によりコウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤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、MZIR098 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。

345

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① mCry3A たん白質

350 MZIR098 トウモロコシ中で発現する mCry3A 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 11 及び 12)。

355

② eCry3.1Ab たん白質

MZIR098 トウモロコシ中で発現する eCry3.1Ab 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、mCry3A 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 13 及び 14)。

360

③ PAT たん白質

MZIR098 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、mCry3A 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 15 及び 16)。

365

(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

370 MZIR098 トウモロコシで発現している mCry3A たん白質、eCry3.1Ab 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* から調製したそれぞれのたん白質を用いて行っており、これら *E. coli* 由来のたん白質と MZIR098 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、殺虫活性又は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 17 及び 18)。

375

① mCry3A 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

380

mCry3A 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 2 分後には消化されることが確認された（参考資料 19）。

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

385

mCry3A 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 5 分後に完全長の mCry3A たん白質は消化されて分解産物が生じるものの、それ以上は消化が進まないことが確認された（参考資料 22）。

ウ 加熱処理

390

mCry3A 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°C以上の条件下では 30 分以上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 25）。

② eCry3.1Ab 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

395

eCry3.1Ab 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 30 秒後には消化されることが確認された（参考資料 20）。

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

400

eCry3.1Ab 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 1 分後に完全長の eCry3.1Ab たん白質は消化されて分解産物が生じるものの、それ以上は消化が進まないことが確認された（参考資料 23）。

405

ウ 加熱処理

eCry3.1Ab 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°C以上の条件下では 30 分以上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 26）。

410

③ 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

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 21）。

415

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（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 24）。

420

ウ 加熱処理

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°C以上の条件下では、30 分以上の加熱処理により失活することが確認された（参考資料 27）。

425

（4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① mCry3A たん白質及び eCry3.1Ab たん白質

430

mCry3A たん白質及び eCry3.1Ab たん白質は、特定のコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry たん白質の一種であるが、Cry たん白質が酵素活性を持つとは考えられていない。したがって、MZIR098 トウモロコシにおける両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。

② PAT たん白質

435

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、L-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, 1999）。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響を及ぼすことはないと考えられる。

440

445

（5）宿主との差異に関する事項

MZIR098 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 MZIR098 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの茎葉及び穀粒について、①主要構成成分、②脂肪酸、③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミン、⑥2 次代謝産物及び⑦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 28）。MZIR098 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 葉期頃にかけて、グルホシネート（約 0.44~0.47 kg a.i./ha）を散布した。

450

その結果、MZIR098 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

455 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。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

460 これまでの間に米国を中心として行われたほ場試験において、MZIR098 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。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

465 MZIR098 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

470 MZIR098 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

475 米国においては、2016年3月に米国農務省(USDA)により無規制裁培の安全性が、2016年4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8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7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。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

480 MZIR098 トウモロコシはコウチュウ目害虫に対する抵抗性及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与されており、特定のコウチュウ目害虫の防除方法及びその生育期に雑草防除のために除草剤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

485 MZIR098 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。

490 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。

IV 審議結果

495 コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ MZIR098 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

500

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 nonpaline 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 Chen E, Stacy C. 2007. Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefore. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,230,167. Washington DC: U.S. Patent Office.
- 5 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.
- 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 Geiser M, Schweitzer S, Grimm C. 1986. The hypervariable region in the genes coding for entomopathogenic crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: nucleotide sequence of the kurhd1 gene of subsp. kurstaki HD1. *Gene* 48: 109-118.
- 9 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.
- 10 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.
- 11 Hohn T, Stavolone L, De Haan PT, Ligon HT, Kononova M. 2007. Cestrum yellow leaf curling virus promoters. Syngenta Participations AG, assignee. U.S. Patent No. 7,166,770. Washington DC: U.S. Patent Office.
- 12 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; search parameters: crop type = "CORN Field," tissue type = "FORAGE" or "GRAIN", crop year = "All", country = "All", and regions = "All"; (accessed October 6, 2014).

- 13 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.
- 14 Itoh Y, Watson JM, Haas D, Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.
- 15 Koziel MG, Desai NM, Lewis KS, Kramer VC, Warren GW, Evola SV, Crossland LD, Wright MS, Merlin EJ, Launis KL, Rothstein SJ, Bowman CG, Dawson JL, Dunder EM, Pace GM, Suttie JL. 1997. Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. Ciba-Geigy, assignee. U.S. Patent No. 5,625,136. Washington, DC: U.S. Patent Office.
- 16 Murray EE, Lotzer J, Eberle M. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research* 17: 477-498.
- 17 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>.
- 18 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.
- 19 OECD. 1999. 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.
- 20 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.
- 21 OECD. 2007. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 42: Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14.
- 22 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.
- 23 Poulsen P. 1997. Inhibition of gene expression. Danisco A/S, assignee. Patent No. WO 97/04112. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- 24 Sekar V, Thompson DV, Maroney MJ, Bookland RG, Adang MJ. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 7036-7040.
- 25 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.

- 26 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.
- 27 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.
- 28 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.
- 29 Wilkes, H.G. 1972. Maize and its wild relatives. *Science* 177: 1071-1077.
- 30 菊池一徳 1987 トウモロコシの生産と利用 光琳 東京
- 31 財務省. 2016. 財務省貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>. (accessed November 2, 2016)
- 32 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
- 33 戸澤英男. 2005. トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—. 農文協. pp. 2-3, 56-59, 69-70, 98-99, 122, 257-260 and 323-327.
- 34 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
- 35 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_siryoy/cyosa/pdf/h25.pdf [Accessed Sep 17, 2014]
- 36 山田実 2001 トウモロコシの起源と特性 転作全書 第三巻 雑穀 農山漁村文化協会 東京

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Plasmid pSYN17629: Plasmid Lineage Analysis and Sequence. Assessment. Report No. TK0117490 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 2 Event MZIR098 Maize: Insert and Flanking Sequence Analysis. Final Report Amendment 1. Report No. TK0144270 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 3 Event MZIR098 Maize: Insert Copy Number Southern Blot Analysis. Final Report Amendment 1. Report No. TK0117497 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 4 Event MZIR098 Maize: Genomic Insertion Site Analysis. Final Report. Report No. TK0117489. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 5 Event MZIR098 Maize: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analyses of Maize Genomic Sequences Flanking the Insert. Assessment. Report No. TK0288708. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 6 Event MZIR098 Maize: Mendelian Inheritance Analysis. Final Report Amendment 2. Report No. TK0117487 A2. Syngenta Crop Protection, LLC.
- 7 Event MZIR098 Maize: Genetic Stability Analysis of F2, F3, F4, F5, and F1 Generations. Final Report Amendment 2. Report No. TK0117501 A2. Syngenta Crop

- Protection, LLC.
- 8 Quantification of eCry3.1Ab, mCry3A, and Phosphinothricin Acetyltransferase in Event MZIR098 Maize Tissues. Assessment Amendment 1. Report No. TK0117462_SR_01 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 9 Event MZIR098: Allergenicity and Toxicity Assessment of Hypothetical Open Reading Frames within the MZIR098 Insert Defined by Stop to Stop Codons. Assessment. Report No. SSB-139-16 Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 10 Event MZIR098: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop, Genome to Insert Junction Open Reading Frames. Assessment Amendment 1. Report No. SSB-136-16 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 11 mCry3A: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 3. Report No. SSB-129-16 A3. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 12 mCry3A: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-123-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 13 eCry3.1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. Assessment Amendment 3. Report No. SSB-128-16 A3. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 14 eCry3.1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-105-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 15 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.
 - 16 PAT (pat): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. Assessment. Report No. SSB-106-16. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 17 Comparison of eCry3.1Ab and mCry3A Proteins Produced in Recombinant *Escherichia coli* with eCry3.1Ab and mCry3A Proteins Produced in Event MZIR098 Derived Maize Plants. Final Report. Report No. TK0117480. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 18 Comparison of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli* and PAT Protein Produced in Event MZIR098 Derived Maize Plants. Final Report. Report No. TK0121937. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 19 *In vitro* Digestibility of Modified Cry3A Protein (MCRY3A-0102 and IAPMIR604-0103) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Amended Report No. 1. Replaces Original Report Issued December 2, 2003. Report No. SSB-029-03 A1. Syngenta Seeds, Inc.
 - 20 *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Study No. TK0028111. Syngenta Biotechnology, Inc.
 - 21 *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Final Report. Report No. TK0062551. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 22 *In vitro* Digestibility of Modified Cry3A Protein from Test Substances MCRY3A-0102 and MCRY3A-SF-0106 under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Report No.

- SSB-169-06. Syngenta Biotechnology, Inc.
- 23 *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1AB-0208 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Amended Report No. 1. Report No. SSB-015-09 A1. Syngenta Biotechnology, Inc.
 - 24 *In vitro* Digestibility of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Study No. TK0030220. Syngenta Biotechnology, Inc.
 - 25 Effect of Temperature on the Stability of Modified Cry3A Protein from Test Substances MCRY3A-0102 and MCRY3A-SF-0106. Report No. SSB-108-07. Syngenta Biotechnology, Inc.
 - 26 Effect of Temperature on the Immunoreactivity of eCry3.1Ab Protein. Study No. TK0022186. Syngenta Biotechnology, Inc.
 - 27 Effect of Temperature on the Enzymatic Activity of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein. Final Report. Report No. TK0062553. Syngenta Crop Protection, LLC.
 - 28 Compositional Analysis of Forage and Grain from MZIR098 Maize Treated with Trait-Specific Herbicide Grown During 2013 in the USA. Assessment Amendment 1. Report No. TK0117452 A1_SR_01. Syngenta Crop Protection, LLC.