

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統

**令和 2 年 12 月 23 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
5	(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.....	4
10	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.....	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
15	(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
20	(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
25	(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.....	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
30	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.....	10
	(3) 構造に関する事項.....	10
	(4) 性質に関する事項.....	10
35	(5) 純度に関する事項.....	11
	(6) コピー数に関する事項.....	11
	(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.....	12
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	12
40	(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項.....	12
	6 組換え体に関する事項.....	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.....	13
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	13
45	(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項.....	13
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	14
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	14
	(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
50	(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.....	15
	(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
55	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 参考文献及び参考資料.....	15

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、
アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統」
に係る安全性確認

I はじめに

60 除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリル
オキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 系統（以下
「MON87429 系統」という。）について、令和 2 年 9 月 1 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
65 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

飼料名：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、
アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ
70 MON87429 系統

性 質：除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系除
草剤及び除草剤グリホサートへの耐性を持つ。また、グリホサート耐性遺伝
子の組織特異的発現により、除草剤グリホサートを散布することで雄性生殖
組織が正常に生育せず、雄性不稔となる。

75 申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社（日本）
開発者：バイエルグループ（米国）

MON87429 系統は、トウモロコシのデント種 LH244 系統に、改変 *cp4 epsps* 遺伝
子、改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ft_t* 遺伝子を導入し作成された。

80 MON87429 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS たん白質
を発現し除草剤グリホサート耐性を付与するが、その発現カセットには *35S* プロモー
ター及び雄性生殖組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列が存在しているため、
雄性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しないか、発現しても微量である。
それにより、除草剤グリホサートを散布することで雄性生殖組織は正常に生育せず雄性
85 不稔となり、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うことが出来る。

また、導入された遺伝子により改変 MON87429 DMO たん白質、PAT たん白質及び
FT_T たん白質を発現しており、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート及びアリルオ
キシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。複数の除草剤を様々な組
み合わせで使用するにより、トウモロコシ栽培における雑草管理を効果的に行うこ
90 とを目的としている。なお、アリルオキシアルカノエート系除草剤のうち、
MON87429 系統の販売の際に適用対象とする除草剤は、キザロホップエチル及び 2,4-
D の 2 種類である。

III 審議内容

95 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

宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Zea mays ssp. mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統である。

MON87429 系統には、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グリホサートに対する耐性を付与するため、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の改変 *dmo* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子、*Sphingobium herbicidovorans* 由来の *ft_t* 遺伝子及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

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、様々な家畜等に広く利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON87429 系統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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON87429 系統は、導入された改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子、*ft_t* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子により、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グリホサートに耐性を持つため、これらの除草剤が使用可能である。このことを除いては従来のトウモロコシと使用方法に相違はない。

(1) ～ (4) により、MON87429 系統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

MON87429 系統は、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うこと及び、効果的な雑草防除のため複数の除草剤に耐性を持たせることを目的として作出された。

本系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、その発現カセットに *35S* プロモーター及び雄性生殖組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列が存在することにより、雄性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しないか、発現しても微量である。そのため、除草剤グリホサートを散布することで雄性不稔となり、従来の除雄作業を削減できるなど、ハイブリッド種子生産をより効率的に行うことが出来る。

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

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

(2) 遺伝的先祖に関する事項

140 トウモロコシの遺伝的先祖は *Zea* 属のテオシント (*Z. mays* ssp. *mexicana*) で、人為的選抜を経て栽培型化されたといわれている (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

145 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ていない。抗栄養素として、フィチン酸、ラフィノース及びトリプシンインヒビターが知られている (OECD, 2002)。フィチン酸は、反芻動物以外の動物において、ミネラルの吸収を阻害することが知られている (OECD, 2012)。ラフィノースは腹部を膨満させる原因物質である。トリプシンインヒビターはたん白質分解酵素阻害物質であるが、含有量がごくわずかであり、栄養学的に問題にならないとされている (OECD, 2002)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

155 トウモロコシは種子植物であり、家畜に対する寄生性及び定着性は知られていない。

(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

160 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（モザイク病、萎凋細菌病、茎腐病等）が知られているが (OECD, 2003)、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

(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、雑草性は極めて低い。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

165 トウモロコシは種子繁殖する一年生のイネ科植物である。多くの品種では、風媒による他家受粉が行われる。トウモロコシの近縁植物として、テオシント (*Z. mexicana*) 及びトリプサカム属 (*Tripsacum* spp.) があるが、テオシントは米国のコーン・ベルト地帯、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア及び日本を含むアジアには自生していないこと、また、トリプサカム属との交雑は非常に困難であることが知られている (OECD, 2003)。従って、トウモロコシとの交雑は困難である。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

175 トウモロコシは、長い間飼料利用されてきた歴史がある。日本においては、明治時代にデント種及びフリント種が導入され、九州、四国や本州で栽培されるようになった。その後、飼料用、子実用及び生食用として幅広く利用されている。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

トウモロコシは、子実、サイレージ及び青刈り等が、飼料として安全に利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

トウモロコシは栽培植物であり、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)。収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、種子の休眠性は低いことが知られており、さらに土壤温度が 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)。

(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 (*Z. mexicana*)及びトリプサカム属 (*Tripsacum* spp.)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

MON87429 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMHT519224 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来のプラスミド RK2 を基に作成された。なお、プラスミド pBR322 及び RK2 の構成要素及び機能は明らかとなっている。

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の塩基数は 17,776 bp である。また、プラスミド PV-ZMHT519224 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、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 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トランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子 (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をコードする) が含まれている。*aadA* 遺伝子は、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして用いられた。

なお、MON87429 系統のゲノム DNA 中に *aadA* 遺伝子を含む外側骨格領域が挿入されていないことを次世代シーケンス解析により確認している。

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 には宿主植物から他の生物へ伝達を可能とする配列は含まれていない。

220

(5) 宿主依存性に関する事項

225

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 には、*E. coli* に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 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、これらの領域により導入用プラスミド PV-ZMHT519224 が、植物や家畜等で増殖することはできない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON87429 系統中には、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が確認されている。

230

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来のプラスミド RK2 を基に作成された。

235

(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

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 を用いて、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 LH244 系統の未成熟胚に導入することにより作出された。

5 挿入遺伝子に関する事項

240

(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

以下の表に、導入された遺伝子の名称及びその由来を示す。

表 1

構成要素	由来	機能
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>Ea.Ubq</i>	ラベンナグラス (<i>Erianthus ravennae</i>)	ユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン (GenBank Accession: MH026095)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	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) 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。
<i>Fba</i>	アワ (<i>Setaria italica</i>)	フルクトースビスリン酸アルドラーゼ (<i>Fba</i>) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (GenBank Accession: MH026101)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット		
<i>Clj.Ubq</i>	ジュズダマ (<i>Coix lacryma-jobi</i>)	ユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン (GenBank Accession: MH026101)。

		MH026097)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>APG6</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	熱ショックたん白質 (Hsp101) ホモログの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Albino and pale green 6 (Apg6)</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: NM_121549)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列。除草剤ジカンバ耐性を付与する。
<i>Mt</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	メタロチオネイン様たん白質をコードする <i>OsMt</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で (GenBank Accession: MH026099)、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
<i>ft_t</i> 遺伝子発現カセット		
<i>Ad.Ubq</i>	ダンチク (<i>Arundo donax</i>)	ユビキチン遺伝子のプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロン (GenBank Accession: MH026096)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>MDH</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	リンゴ酸デヒドロゲナーゼの葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>Mdh</i> 遺伝子のターゲティング配列 (GenBank Accession: BT000621)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
<i>ft_t</i>	<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	<i>Rdpa</i> 遺伝子の改変バージョンから発現する FOPs 及び 2,4-D ジオキシゲナーゼ (FOPs and 2,4-D dioxygenase version T: FT_T)。アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性を付与する。
<i>Nam</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	no apical meristem (Nam) たん白質ドメインの 3' 末端非翻訳領域 (GenBank Accession: MH026100)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット		
<i>35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)	<i>35S</i> プロモーター及び 5'末端非翻訳領域。一般的に目的遺伝子を全組織で恒常的に発現させるプロモーターとして知られているが (Terada and Shimamoto, 1990; Holtorf et al., 1995)、トウモロコシを含む単子葉植物においては、花粉における活性はごくわずかであることが報告されている (Hamilton et al., 1992; Heck et al., 2005)。
<i>Cab</i>	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>)	葉緑素 a/b 結合たん白質の 5'末端非翻訳領域。目的遺伝子の発現を活性化させる。

<i>Ract1</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	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。目的遺伝子の発現の制御に関わる。
<i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) CP4 株	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列。除草剤グリホサート耐性を付与する。
mts-siRNA の標的配列	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	EU974548 遺伝子の cDNA の 3'末端非翻訳領域の部分配列を改変したもので、雄性生殖組織特異的低分子干渉 RNA に認識される配列を含む。
<i>Grp3</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	グリシンリッチ RNA 結合たん白質 (GRP3) をコードする遺伝子の 3'末端非翻訳領域で (GenBank Accession: MH026098)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。

② 安全性に関する事項

245 ・改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は、環境中に遍在するグラム陰性細菌であり、土壌及び飲料水から検出されている (Echemendia, 2010; Brooke, 2012)。*S. maltophilia* は日和見病原菌であり、健康なヒトからも検出されているが (Heller et al., 2016; Lira et al., 2017)、感染がみられるのは免疫不全の患者に限られている (Lira et al., 2017)。上記の免疫不全の患者に対する日和見感染の可能性以外には、ヒトや家畜に対する病原性等を示す報告はない。

255 ・*pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、環境中に遍在する細菌である。この種が属するストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) の細菌は様々な環境に存在しており、淡水域及び飲料水からも検出されている (Goodfellow and Williams, 1983)。*S. viridochromogenes* が、ヒトや家畜に対する病原性等を示すという報告はない。

260 ・*ft_t* 遺伝子の供与体である *S. herbicidovorans* は、土壌中に遍在するグラム陰性細菌である。この種が属するスフィンゴビウム属 (*Sphingobium*) の細菌は、土壌及び淡水から検出されており (Chaudhary et al., 2017)、トウモロコシ、パパイヤ、トマトからも検出されている (Enya et al., 2007; Rijavec et al., 2007; Thomas et al., 2007)。*S. herbicidovorans* が、ヒトや家畜に対する病原性等を示すという報告はない。

265

・改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) CP4 株は、土壤中に遍在するグラム陰性細菌である。*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) が、ヒトや家畜に対する病原性等を示すという報告はない。

270 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。宿主であるトウモロコシ品種 LH244 系統の未成熟胚を、導入用プラスミド PV-ZMHT519224 を含む *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) と共置培養することにより、形質転換を行った。

275 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット、*ft_t* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、それぞれジュズダマ、ラベンナグラス、ダンチク及びカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターが使用されている

② ターミネーターに関する事項

導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット、*ft_t* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、それぞれイネ及びアワ由来のターミネーターが使用されている。

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 PV-ZMHT519224 のすべての遺伝要素は純化されていて、その塩基配列、由来及び機能は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

(4) 性質に関する事項

以下に各遺伝子の機能を示す。

・改変 *dmo* 遺伝子

改変 MON87429 DMO たん白質を発現し、このたん白質の働きにより除草剤ジカンバを脱メチル化する。ジカンバは脱メチル化されると、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 (HCHO) に代謝される (Chakraborty et al., 2005)。

改変 MON87429 DMO たん白質と既知の毒性たん白質との相同性の有無を調査するため、TOX_2018 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行ったところ、改変 MON87429 DMO たん白質と既知の毒性たん白質との相同性は確認されなかった。

・*pat* 遺伝子

PAT たん白質を発現し、このたん白質の働きにより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に代謝する。

310 PAT たん白質と既知の毒性たん白質との相同性の有無を調査するため、
TOX_2018 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより、期待値が 1×10^{-5} 以下の
相同性を示す配列の検索を行ったところ、該当するアミノ酸配列が 18 個確認
された。しかしこれらの配列は、細菌の細胞中で発現した時にのみ細菌に対
し毒性を示すことが知られている。

・ *ft_t* 遺伝子

315 FT_T たん白質を産生し、このたん白質の働きにより α -ケトグルタル酸存在
下でキザロホップを除草活性のないキザロホップフェノールとピルビン酸に
変換する。また、同じく α -ケトグルタル酸存在下において、2,4-D を除草活性
のない 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換する。

320 FT_T たん白質と既知の毒性たん白質との相同性の有無を調査するため、
TOX_2018 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が 1×10^{-5} 以下の相
同性を示す配列の検索を行ったところ、FT_T たん白質と既知の毒性たん白質
との相同性は確認されなかった。

・ 改変 *cp4 epsps* 遺伝子

325 改変 CP4 EPSPS たん白質を発現し、このたん白質の働きにより、植物体
は除草剤グリホサートの阻害を受けることなく芳香族アミノ酸を合成出来る。

野生型の *cp4 epsps* 遺伝子により発現する EPSPS たん白質は、グリホサ
ートと特異的に結合し、芳香族アミノ酸を合成出来なくなるため植物体は枯死
するが、改変 CP4 EPSPS たん白質はグリホサートの阻害を受けないため、
330 正常にアミノ酸が合成され生育することが出来る。

また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットに存在するカリフラワーモザイク
ウイルス (CaMV) 35S プロモーター及び雄性生殖組織特異的に発現する内在
性 siRNA の標的配列により、雄性生殖組織において改変 CP4 EPSPS たん白
質は発現しないか、発現しても微量であるよう制御されている。

335 改変 CP4 EPSPS たん白質と既知の毒性たん白質との相同性の有無を調査
するため、TOX_2018 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が $1 \times$
 10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行ったところ、改変 CP4 EPSPS たん白
質と既知の毒性たん白質との相同性は確認されなかった。

340 (5) 純度に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の T-DNA 領域の塩基数は 14,008 bp であ
る。塩基配列解析により、T-DNA 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確
認した。

345 (6) コピー数に関する事項

次世代シーケンス解析、PCR 及び塩基配列解析を行った結果、MON87429 系
統のゲノム中には、導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の T-DNA 領域が 1 ヲ所

350 に 1 コピー導入されていることが確認された。また、導入用プラスミド PV-ZMHT519224 に由来する非意図的な配列が存在しないこと、導入遺伝子の塩基配列は導入用プラスミド PV-ZMHT519224 の T-DNA 領域と同一であること及び、遺伝子の挿入により、トウモロコシ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことが、導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析により確認された。

(7) 安定性に関する事項

355 MON87429 系統に導入された遺伝子の後代における安定性を確認するため、5 世代の穀粒から抽出したゲノム DNA を用いて次世代シーケンス解析を行った。その結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 箇所検出され、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。

360 また、複数世代にわたる改変 MON87429 DMO たん白質、PAT たん白質、FT_T たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質の発現の安定性を確認するため、5 世代並びに対照の非組換え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行った。その結果、それぞれのたん白質が、非組換えトウモロコシでは発現していないが、MON87429 系統 5 世代では発現していることが確認された。

365

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

370 導入した改変 MON87429 DMO たん白質、PAT たん白質、FT_T たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を、地上部、穀粒、葉及び根を用いて、マルチプレックスイムノアッセイにより測定した。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質が雄性生殖組織において発現していないことを除き、全てのたん白質が、地上部、穀粒、葉及び根で発現しており、特に葉において、いずれのたん白質も最も高い発現量が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

375 導入用プラスミド PV-ZMHT519224 には、その外側骨格領域に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 *aadA* 遺伝子（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)をコードする）が存在している。

380 なお、MON87429 系統中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、次世代シーケンス解析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

385 MON87429 系統に挿入された DNA 配列で、6 つの読み枠において ORF を検索した。その結果 14 個の ORF が検出されたが、これらの ORF について、既知の毒性たん白質と相同性は認められなかった。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

390 MON87429 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS たん
白質を発現し除草剤グリホサート耐性を付与するが、その発現カセットには *35S*
プロモーター及び雄性生殖組織特異的に発現する内在性 siRNA の標的配列が存在
395 しているため、雄性生殖組織では改変 CP4 EPSPS たん白質が発現しないか、発
現しても微量である。それにより、除草剤グリホサートを散布することで雄性生
殖組織は正常に生育せず雄性不稔となり、ハイブリッド種子生産をより効率的に
行うことが出来る。

また、導入された改変 *dmo* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *ft_t* 遺伝子により、改変
MON87429 DMO たん白質、PAT たん白質及び FT_T たん白質を発現しており、
除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート及びアシルオキシアルカノエート系除草
400 剤に対する耐性が付与されている。複数の除草剤を様々な組み合わせで使用する
ことにより、トウモロコシ栽培における雑草管理を効果的に行うことを目的とし
ている。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

405 改変 MON87429 DMO たん白質、PAT たん白質、FT_T たん白質及び改変
CP4 EPSPS たん白質と、既知の毒性たん白質との相同性を確認するため、
TOX_2018 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が 1×10^{-5} 以下の相同性
を示す配列の検索を行った。その結果、PAT たん白質において相同性を示す配列
410 が確認されたが、それらの配列は、細菌の細胞中で発現した時にのみ細菌に対し
毒性を示すことが知られている。

(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

発現するたん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、人工胃液
(ペプシン) 処理、人工腸液 (パンクレアチン) 処理及び加熱処理を行った。

415 FT_T たん白質は少量であるため、試験に供試する十分量を精製できないことか
ら、*E. coli* で発現させた FT_T たん白質を試験に供試した。その結果、人工胃液
(ペプシン) 処理では、0.5 分以内に検出限界値以下まで消化され、人工腸液 (パ
ンクレアチン) 処理では、5 分以内に検出限界値以下まで消化された。また、加熱
処理では、75℃以上で免疫反応性を失うことが確認された。なお、*E. coli* で発現さ
420 せた FT_T たん白質及び MON87429 系統中で発現する FT_T たん白質は同等であ
ることを確認済みである。

PAT たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質については、これらと同一のたん
白質を発現する作物が既に承認されており (除草剤グルホシネート耐性: トウモロ
コシ MON87419 系統等、除草剤グリホサート耐性: トウモロコシ MON87411 系
425 統等)、物理化学的処理に対する感受性も同様の結果であると考えられる。

DMO たん白質については、これと同等のたん白質を発現する作物が既に承認さ
れており (トウモロコシ MON87419 系統等)、物理化学的処理に対する感受性も
同様の結果であると考えられる。

430 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 MON87429 DMO たん白質は、ジカンバに高い特異性を示す。DMO たん白質の基質となる可能性として、植物中に存在し構造的にジカンバに類似する化合物が考えられたが、それらは DMO たん白質により代謝されないことが報告されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

435 PAT たん白質は、グルホシネートの除草剤成分である L-ホスフィノスリシンに対して極めて高い基質特異性を有しており、その他の内在性化合物を代謝して、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

FT_T たん白質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ除草剤に高い特異性を示す。FT_T たん白質の基質となる可能性として、植物中に存在し構造的に FT_T たん白が代謝する可能性があり且つ FT_T たん白質の活性部位に適合する化合物を用いて基質反応性試験を行ったところ、FT_T たん白質の活性があるものは確認されなかった。

440 改変 CP4 EPSPS たん白質は、非組換えトウモロコシがもともと持っている植物 EPSPS たん白質と機能的に同一であるため、改変 CP4 EPSPS たん白質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。実際に、アミノ酸分析により、改変 CP4 EPSPS たん白質に関わる代謝系の最終産物（芳香族アミノ酸）含量が、MON87429 系統と非組換えトウモロコシとの間で相違ないことを確認した。

445 以上のことから、これらのたん白質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

450 (5) 宿主との差異に関する事項

MON87429 系統及び宿主の非組換えトウモロコシの穀粒及び地上部について、一般成分、アミノ酸、脂肪酸、繊維質、灰分、無機質、ビタミン、抗栄養素、二次代謝産物の分析を行ったところ、穀粒の栄養素の項目に統計学的有意差が認められたものがあったが、MON87429 系統の平均値はいずれも ILSI データベースのデント種の範囲内に収まっており、これまで安全に摂取されている従来トウモロコシの変動の範囲内であった。これらの相違が安全性に影響を与えているとは考えられない。

460 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに実施した圃場試験において、MON87429 系統と非組換えトウモロコシとの間に、外界における生存及び増殖能力の差異は認められなかった。

465 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

MON87429 系統と非組換えトウモロコシにおいて、生存及び増殖能力の制限要因に関しても変わりはない。

(8) 不活化法に関する事項

470 MON87429 系統も従来のトウモロコシと同様に、物理的防除（耕起）や化学的

防除（感受性を示す除草剤の使用）など、トウモロコシを枯死させる従来の方法で不活化される。

（９）外国における認可等に関する事項

表 2 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
カナダ	CFIA 承認 (2020 年 8 月)	HC 承認 (2020 年 8 月)	CFIA 承認 (2020 年 8 月)
米国	FDA 申請中 (2019 年 2 月)	FDA 申請中 (2019 年 2 月)	USDA 申請中 (2019 年 6 月)
欧州	EFSA 申請中 (2019 年 9 月)	EFSA 申請中 (2019 年 9 月)	EFSA 申請中 (2019 年 9 月)
オーストラリア・ ニュージーランド	—	FSANZ 承認 (2020 年 12 月)	—

（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON87429 系統では除草剤グリホサートに対して組織特異的な耐性をもつため、生育期に雑草防除及び効率的なハイブリッド種子生産のために除草剤グリホサートを使用できる。また、MON87429 系統では雑草防除のために、除草剤ジカンバ、除草剤グルホシネート、除草剤キザロホップエチル及び除草剤 2,4-D を使用できる。これらのことを除いて、栽培方法は従来のトウモロコシと相違ない。

（11）種子の製法及び管理方法に関する事項

従来のトウモロコシと相違はない。

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。

IV 審議結果

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔並びに除草剤ジカンバ、グルホシネート、アリルオキシアルカノエート系及びグリホサート耐性トウモロコシ MON87429 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した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1 Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.

2 Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-

DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Molecular Biology 2: 335-350.

505

3 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

510

4 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.

515

5 Bisson, J., J. McAlpine, J. Graham and G.F. Pauli. 2016. NAPRALERT, from an historical information silo to a linked resource able to address the new challenges in Natural Products Chemistry and Pharmacognosy. Proceedings of the Joint International Conference on Biological Ontology and BioCreative, Corvallis, Oregon, United States.

520

6 Brodersen, P. and O. Voinnet. 2006. The diversity of RNA silencing pathways in plants. TRENDS in Genetics 22: 268-280.

7 Brooke, J.S. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. Clinical Microbiology Reviews 25: 2-41.

525

8 Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell 136: 642-655.

9 CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.

530

10 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.

535

11 Chaudhary, D.K., S.-W. Jeong and J. Kim. 2017. *Sphingobium naphthae* sp. nov., with the ability to degrade aliphatic hydrocarbons, isolated from oil-contaminated soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 67: 2986-2993.

540

12 Christ, B., R. Hochstrasser, L. Guyer, R. Francisco, S. Aubry, S. Hörtensteiner and J.-K. Weng. 2017. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. Nature Plants 3: 937-945.

- 545 13 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.
- 550 14 Cornejo, M.-J., D. Luth, K.M. Blankenship, O.D. Anderson and A.E. Blechl. 1993. Activity of a
maize ubiquitin promoter in transgenic rice. *Plant Molecular Biology* 23: 567-581.
- 555 15 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. Flasinski 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.
- 560 16 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-*enol*pyruvylshikimate-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.
- 565 17 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase:
Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 570 18 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.
- 575 19 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].
- 20 EFSA. 2009. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active
substance quizalofop-P (considered variants quizalofop-P-ethyl and quizalofop-P-tefuryl). *EFSA
Journal* 7: 205r.
- 580 21 Enya, J., H. Shinohara, S. Yoshida, T. Tsukiboshi, H. Negishi, K. Suyama and S. Tsushima. 2007.
Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control
agents. *Microbial Ecology* 53: 524-536.
- 22 Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver and C.C. Mello. 1998. Potent and
specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:
806-811.
- 23 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene

- 585 encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 24 Goldberg, R.B., T.P. Beals and P.M. Sanders. 1993. Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- 590 25 Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
- 26 Gorski, S.A., J. Vogel and J.A. Doudna. 2017. RNA-based recognition and targeting: Sowing the seeds of specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18: 215-228.
- 595 27 Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.
- 600 28 Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 29 Hamilton, D.A., M. Roy, J. Rueda, R.K. Sindhu, J. Sanford and J.P. Mascarenhas. 1992. Dissection of a pollen-specific promoter from maize by transient transformation assays. *Plant Molecular Biology* 18: 211-218.
- 605 30 Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in *The Shikimate Pathway*. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- 610 31 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-16 in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
- 32 Heck, G.R., C.L. Armstrong, J.D. Astwood, C.F. Behr, J.T. Bookout, S.M. Brown, T.A. Cavato, D.L. DeBoer, M.Y. Deng, C. George, J.R. Hillyard, C.M. Hironaka, A.R. Howe, E.H. Jakse, B.E. Ledesma, T.C. Lee, R.P. Lirette, M.L. Mangano, J.N. Mutz, Y. Qi, R.E. Rodriguez, S.R. Sidhu, A. Silvanovich, M.A. Stoecker, R.A. Yingling and J. You. 2005. Development and characterization of a CP4 EPSPS-based, glyphosate-tolerant corn event. *Crop Science* 44: 329-339.
- 615 33 Heller, D., E.J. Helmerhorst, A.C. Gower, W.L. Siqueira, B.J. Paster and F.G. Oppenheim. 2016. Microbial diversity in the early *in vivo*-formed dental biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 1881-1888.
- 620 34 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
- 625

isolation, characterization, and heterologous expression. The Journal of Biological Chemistry 280: 24759-24767.

- 630 35 Herrmann, K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. K.M. Herrmann and R.L. Somerville (eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.
- 635 36 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907-919.
- 37 Holtorf, S., K. Apel and H. Bohlmann. 1995. Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 29: 637-646.
- 640 38 Huang, M.-D., F.-J. Wei, C.-C. Wu, Y.-I.C. Hsing and A.H.C. Huang. 2009. Analyses of advanced rice anther transcriptomes reveal global tapetum secretory functions and potential proteins for lipid exine formation. Plant Physiology 149: 694-707.
- 645 39 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 47-60.
- 40 ILSI. 2016. Composition Database Version 6.0. International Life Science Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed February 21, 2017].
- 650 41 Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel and B. Bartel. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. Annual Review of Plant Biology 57: 19-53.
- 655 42 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.
- 660 43 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.
- 665 44 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.

- 45 Larue, C.T., M. Goley, L. Shi, A.G. Evdokimov, O.C. Sparks, C. Ellis, A.M. Wollacott, T.J. Rydel, C.E. Halls, B. Van Scoyoc, X. Fu, J.R. Nageotte, A.M. Adio, M. Zheng, E.J. Sturman, G.S. Garvey and M.J. Varagona. 2019. Development of enzymes for robust
670 aryloxyphenoxypropionate and synthetic auxin herbicide tolerance traits in maize and soybean crops. Pest Management Science <https://doi.org/10.1002/ps.5393>.
- 46 Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. Journal of Biological Chemistry 239: 1142-1150.
675
- 47 Lira, F., G. Berg and J.L. Martínez. 2017. Double-face meets the bacterial world: The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Frontiers in Microbiology 8: 2190.
- 48 Müller, T.A., M.I. Zavodszky, M. Feig, L.A. Kuhn and R.P. Hausinger. 2006. Structural basis for
680 the enantiospecificities of R- and S-specific phenoxypropionate/ α -ketoglutarate dioxygenases. Protein Science 15: 1356-1368.
- 49 Makarova, K.S., Y.I. Wolf and E.V. Koonin. 2009. Comprehensive comparative-genomic
685 analysis of Type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. Biology Direct 4: 19.
- 50 Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by
690 phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. Journal of Plant Physiology 123: 135-142.
- 51 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.
- 52 Meinnel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein
695 modifications. Proteomics 8: 626-649.
- 53 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for
activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.
- 700 54 OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their
enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. Series on
Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. Organisation for Economic Co-
operation and Development, Paris, France.
- 705 55 OECD. 2002a. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in
glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14.
Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organisation for

Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- 710 56 OECD. 2002b. 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.
- 715 57 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.
- 720 58 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.
- 725 59 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 730 60 Rijavec, T., A. Lapanje, M. Dermastia and M. Rupnik. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 802-808.
- 735 61 Salomon, S. and H. Puchta. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *The EMBO Journal* 17: 6086-6095.
- 740 62 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 16338-16346.
- 745 63 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 64 Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- 65 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.

750

66 Terada, R. and K. Shimamoto. 1990. Expression of CaMV35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Molecular and General Genetics* 220: 389-392.

755

67 Thomas, P., S. Kumari, G.K. Swarna and T.K.S. Gowda. 2007. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 380-390.

760

68 U.S. EPA. 2017. 2,4-D Human health risk assessment for registration review. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

69 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.

765

70 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.

770

71 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

72 Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C* 39: 500-504.

775

73 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.

780

74 Yang, H., Y. Qi, M.E. Goley, J. Huang, S. Ivashuta, Y. Zhang, O.C. Sparks, J. Ma, B.M. van Scoyoc, A.L. Caruano-Yzermans, J. King-Sitzes, X. Li, A. Pan, M.A. Stoecker, B.E. Wiggins and M.J. Varagona. 2018. Endogenous tassel-specific small RNAs-mediated RNA interference enables a novel glyphosate-inducible male sterility system for commercial production of hybrid seed in *Zea mays* L. *PLoS ONE* 13: e0202921.

785

75 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

76 財務省 2019 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>)

790 [Accessed June 11, 2019]

77 食品安全委員会 2012 遺伝子組換え食品等評価書 アリルオキシアルカノエート系
除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統
(<http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20100705001&fileId=221>)

795 [Accessed April 13, 2020]

78 食品安全委員会 2014 農薬評価書 キザロホップエチル及びキザロホップPテフリ
ル (第2版)
(<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20131114378&fileId=201>)

800 [Accessed August 22, 2019]

79 食品安全委員会 2017 農薬評価書 2,4-D
(<https://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20130612152&fileId=201>)
[Accessed August 22, 2019]

805

80 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 農山漁村文
化協会 東京

参考資料（申請者提出 社外秘）

810 1 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMHT519224

2 Bioinformatics Evaluation of the DMO and FT_T Proteins in MON 87429 Utilizing
the AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases (MSL0029452)

815 3 Bioinformatics Evaluation of the PAT Protein Utilizing the AD_2018, TOX_2018,
and PRT_2018 Databases (RAR-2018-0231)

4 CP4 EPSPS Protein Immunolocalization in MON 87429 Anthers (SCR-2018-0265)

820 5 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the
AD_2018, TOX_2018, and PRT_2018 Databases (RAR-2018-0126)

6 Amended from MSL0028866: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant
Maize (MON 87429) (MSL0030619)

825

7 Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87429:
BLASTn and BLASTx Analyses Utilizing the EST_2018, NT_2018, and NR_2018
Databases (MSL0029455)

- 830 8 Amended Report for MSL0029498: Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS,
DMO, PAT and FT_T Proteins in Maize Grain Samples across Multiple
Generations of MON 87429 (MSL0030646)
- 9 Amended Report for MSL0029693: Assessment of DMO, PAT (*pat*), FT_T and CP4
835 EPSPS Protein Levels in Maize Tissues Collected from MON 87429 Produced in
United States Field Trials During 2017 (MSL0030257)
- 10 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions
of the MON 87429 Insert: Assessment of Putative Peptides (MSL0029453)
- 840 11 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87429 Utilizing
the AD_2018, TOX_2018 and PRT_2018 Databases (MSL0029454)
- 12 Amended Report for MSL0029897: Characterization of the FT_T Protein Purified
845 from the Maize Grain of MON 87429 and Comparison of the Physicochemical and
Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced
FT_T Proteins (MSL0030056)
- 13 Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia coli* (*E. coli*)-produced FT_T
850 Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0029802)
- 14 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-produced
MON 87429 FT_T Protein (MSL0030022)
- 855 15 Specificity of the FT_T Enzyme for Potential Endogenous Substrates
(MSL0030303)
- 16 Compositional Analyses of Maize Grain and Forage Harvested from MON 87429
Grown in the United States During the 2017 Season (MSL0029410)