

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**収量増加及び除草剤グルホシネート耐性
トウモロコシ (DP202216)**

**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
(1)	遺伝的素材に関する事項	3
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	4
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
3	宿主に関する事項	4
(1)	学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	4
(2)	遺伝的先祖に関する事項	4
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	4
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	4
(5)	ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
(6)	自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	5
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	5
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項	5
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	5
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	5
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	5
4	ベクターに関する事項	6
(1)	名称及び由来に関する事項	6
(2)	性質に関する事項	6
(3)	薬剤耐性に関する事項	6
(4)	伝達性に関する事項	6
(5)	宿主依存性に関する事項	6
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	6
(7)	発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	6
5	挿入遺伝子に関する事項	6
(1)	供与体に関する事項	6

(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	8
(5) 純度に関する事項	9
(6) コピー数に関する事項	9
(7) 安定性に関する事項	9
(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	9
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	9
(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	9
6 組換え体に関する事項	10
(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	10
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	10
(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	10
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	10
(5) 宿主との差異に関する事項	11
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	11
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	11
(8) 不活化法に関する事項	11
(9) 外国における認可等に関する事項	11
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	11
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	11
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	12
IV 審議結果	12
V 参考文献及び参考資料	12

「収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP202216)」
に係る安全性確認

I はじめに

収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP202216) (以下「DP202216 トウモロコシ」という。) について、令和 2 年 9 月 17 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

飼料名：収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP202216)
性 質：従来のトウモロコシに比べ収量が増加している。また、除草剤グルホシネートへの耐性を持つ。
申請者：コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社
開発者：パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社

DP202216 トウモロコシは、トウモロコシのデント種 PH17AW 系統に、*zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入し作成された。*zmm28* 遺伝子はトウモロコシ内在性の遺伝子であり、早期に ZMM28 たん白質を発現させることで、光合成能や窒素利用効率を向上させ、植物における収量の増加をもたらす。

また、*pat* 遺伝子は PAT たん白質を発現し、除草剤グルホシネートを除草作用のない N-アセチル-L-グルホシネートに代謝することで、グルホシネートへの耐性を付与している。

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

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 PH17AW 系統である。

DP202216 トウモロコシには、トウモロコシ(*Z. mays*)由来の *zmm28* 遺伝子及び土壌中のグラム陽性放線菌である *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。

ZMM28 たん白質は MADS ボックス転写因子であり、*zmm28* 遺伝子カセット中のプロモーターの働きでトウモロコシにおいて早期に発現及び発現増加することにより、光合成能や窒素利用効率が向上し、植物における収量の増加をもたらす。なお、導入された *zmm28* 遺伝子から産生される ZMM28 たん白質は、宿主であるトウモロコシの内在性 ZMM28 たん白質のアミノ酸配列と一致する。

PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートをアセチル化し、除草作用のない N-アセチル-L-グルホシネートに代謝することで、除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。

40

(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）の主な利用は飼料用であり、様々な家畜等に広く利用されている。

45

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

DP202216 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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

50

DP202216 トウモロコシは、導入された *pat* 遺伝子により除草剤グルホシネート耐性を持つため、除草剤グルホシネートが使用可能である。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。

55

(1) ~ (4) より、DP202216 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

DP202216 トウモロコシは、子実の収量増加及び、除草剤グルホシネート耐性を付与し効率的に雑草防除を行うことを目的として作成された。

60

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* subsp. *mays* (L.) Iltis) の非組換え品種 PH17AW のデント種である。

65

(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 *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言われている (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)。

70

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

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)。

75

80

(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、家畜等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

85 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

90 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

95 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。

100

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

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。

105

(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。

110

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

115 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°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)。

115

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

120 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

125 DP202216 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP40099 は、アグロバクテリウム(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*))由来のプラスミド pSB1 を基に作製された。なお、プラスミド pSB1 の構成要素及び機能は明らかとなっている。

130 (2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の塩基数は 50,401bp である。また、プラスミド PHP40099 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。

135 (3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の外骨格領域には、スペクチノマイシン耐性遺伝子(*spc*)、テトラサイクリン耐性遺伝子(*tetA*)及びその発現調節遺伝子(*tetR*)が含まれており、当該プラスミドを有する微生物を選抜・維持するためのマーカーとして用いられた。

140

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 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。

145 (5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 には、*E. coli*に由来する DNA 複製起点 *colE1 ori* 及び細菌に由来する複製起点 *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 PHP40099 が植物や家畜等で増殖することはできない。さらに DP202216 トウモロコシ中には、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。

150

(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 PHP40099 は、アグロバクテリウム(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*))等由来のプラスミド pSB1 を基に作成された。

155

(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 PHP40099 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 PH17AW 系統に導入することにより作成された。

160 5 挿入遺伝子に関する事項

(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、その由来及び機能を示す。

表 1

構成要素	由来	機能
<i>zmm28</i> 遺伝子発現カセット		
<i>zm-gos2</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Zea. mays</i>)	<i>gos2</i> 遺伝子のプロモーター領域(U.S. Patent 9115203)
<i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ポリユビキチン遺伝子のイントロン領域
<i>attB1</i>	バクテリオファージλ	インテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway ^B クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)
<i>zmm28</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	MADS ボックス転写因子をコードする遺伝子
<i>attB2</i>	バクテリオファージλ	インテグラーゼ認識組換え部位 (Invitrogen Gateway ^B クローニングシステム; Hartley <i>et al.</i> , 2000、Katzen, 2007)。
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>)	プロテアーゼインヒビターII 遺伝子(<i>pinII</i>)のターミネーター領域
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>ubiZM1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域
<i>ubiZM1</i> 5'UTR	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ポリユビキチン遺伝子の 5' 非翻訳領域(UTR)
<i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ポリユビキチン遺伝子のイントロン領域
FRT1	出芽酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Flp リコンビナーゼ標的的部位
<i>pat</i>	土壌中のグラム陽性放線菌 <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	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。トウモロコシでの発現を最適化するため、塩基配列中の GC 含量を高めるよう改変されているが、産生される PAT たん白質のアミノ酸配列に変化はない。
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>)	プロテアーゼインヒビターII 遺伝子(<i>pinII</i>)のターミネーター領域

② 安全性に関する事項

- ・ *zmm28* 遺伝子の供与体であるトウモロコシ(*Z. mays*)は、安全な食品及び飼料としての長い利用の歴史をもつ。

170 • *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壤中に広く存在し、
ヒト及び動物に対する病原性は報告されていない(OECD, 1999)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

175 宿主への導入は、アグロバクテリウム LBA4404 株を用いてアグロバクテリウ
ム法により行った。

 導入用プラスミド PHP40099 を含むアグロバクテリウムを、宿主 PH17AW 系
180 統の未熟胚に接種し、培養した。その後、除草剤グルホシネート及びアグロバク
テリウム除去用のカルベニシリンを添加した培地で胚を培養することにより、T-
DNA が導入された宿主を選抜した。植物体を再生し、T₀世代とした。その後、既
存の優良品種との戻し交配又は自殖を行うことで後代を維持しながら、各種分析
及び評価を行い、DP202216 トウモロコシを最終的な商品化系統として選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

185 *zmm28* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ(*Z.
mays*)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

190 *zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットには、ジャガイモ(*S. tuberosum*)
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

195 導入用プラスミド PHP40099 の T-DNA 領域に含まれる全ての遺伝子の性質
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

 以下に導入遺伝子の機能を示す。

• *zmm28* 遺伝子

200 ZMM28 たん白質を発現する。DP202216 トウモロコシにおける ZMM28 たん
白質は、非組換えトウモロコシの内在性の ZMM28 たん白質に比べ、早期の生
育段階 (4 葉期) から発現し、6 葉期から糊熟期の各生育段階において発現量が増加する。

 ZMM28 たん白質の早期発現及び発現増加により、光合成や窒素代謝効率が
向上し、植物における収量の増加がもたらされる。

205

• *pat* 遺伝子

 PAT たん白質を発現する。当該たん白質は、除草剤グルホシネートの活性成分
である L-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに代謝
して無毒化することにより植物体にグルホシネート耐性を付与する (OECD,

210 1999)。

(5) 純度に関する事項

215 導入用プラスミド PHP40099 の T-DNA 領域の塩基数は 7,470 bp である。その塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、全ての挿入遺伝子はクローニングされ、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

(6) コピー数に関する事項

220 Southern by Sequencing (SbS™) 分析の結果、DP202216 トウモロコシのゲノム中には完全長の *zmm28* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットがそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された。

225 また、導入用プラスミド PHP40099 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 PHP40099 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を、SbS 分析、導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析により確認している。

(7) 安定性に関する事項

230 DP202216 トウモロコシ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 世代の葉組織から抽出したゲノム DNA を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、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。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

235 DP202216 トウモロコシにおける ZMM28 たん白質及び PAT たん白質の発現量を、葉、花粉、根、植物体地上部、全植物体及び種子を用いて ELISA 法により測定した。その結果、ZMM28 たん白質及び PAT たん白質共に、完熟期の葉において定量下限値未満であった以外、全ての組織において発現が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

240 導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域には、抗生物質テトラサイクリン耐性マーカー遺伝子(*tetA*)及びスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子(*spc*)が組み込まれている。なお、DP202216 トウモロコシ中にこれらのマーカー遺伝子が組み込まれていないことは、SbS 分析及び PCR 分析により確認されている。

245 (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

250 DP202216 トウモロコシに挿入された DNA 及びその近傍配列のオープンリーディングフレーム(ORF)を調べるため、6 つの読み枠で ORF を検索した。その結果 141 個の ORF が検出されたが、これら 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

255 DP202216 トウモロコシにおける ZMM28 たん白質は、非組換えトウモロコシの内在性の ZMM28 たん白質に比べ、早期の生育段階（4 葉期）から発現し、6 葉期から糊熟期の各生育段階において発現量が増加する。ZMM28 たん白質の早期発現及び発現増加により、光合成や窒素代謝効率が向上し植物における収量の増加がもたらされる。

260 また、PAT たん白質により除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートを除草作用のない N-アセチル-L-グルホシネートに代謝することで、除草剤グルホシネートに対する耐性を獲得している。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

265 ZMM28 たん白質及び PAT 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、毒素たん白質データベース（2019 年 1 月更新）を用い BLASTP アルゴリズムによるアミノ酸配列相同性検索を行った。その結果、いずれのたん白質も、既知の毒性たん白質と相同性は確認されなかった。

(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

270 DP202216 トウモロコシに導入された *zmm28* 遺伝子は、トウモロコシ内在性の遺伝子である。ウエスタンブロット分析を用いて DP202216 トウモロコシ由来の ZMM28 たん白質及び対照の非組換えトウモロコシ由来の ZMM28 たん白質を比較したところ、これらのたん白質が同等であることが確認された。従って、家畜はこれまでも従来トウモロコシを通じて長い間 ZMM28 たん白質を摂取してきた経験があると考えられる。また、DP202216 トウモロコシの全植物体での ZMM28 たん白質の発現量は、9 葉期において対照トウモロコシに比べ 15%程度の増加である。

275 PAT たん白質については、同一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 1507 系統、トウモロコシ *B.t. Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7*、トウモロコシ DP-004114-3 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。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

285 DP202216 トウモロコシでは、ZMM28 たん白質の早期発現及び発現増加により、光合成や窒素代謝効率が向上することで植物における収量の増加がもたらされるため、トウモロコシ内在性の ZMM28 たん白質が関与する既存の代謝経路に影響を与える可能性が考えられたが、種子の構成成分の分析結果において、非組換えトウモロコシと DP202216 トウモロコシとの間に相違は認められなかった。

290 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。

(5) 宿主との差異に関する事項

295

DP202216 トウモロコシ及び宿主の非組換えトウモロコシの茎葉及び種子について、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び有害生理活性物質の分析を行ったところ、統計学的有意差が認められたものがあったが、分析した全ての成分において、分析値は従来商業品種の変動の範囲内又は文献値の範囲内であった。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。

300

(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、DP202216 トウモロコシ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。

305

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

DP202216 トウモロコシ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。

310

(8) 不活化法に関する事項

DP202216 トウモロコシ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。

315

(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
米国	—	—	USDA 承認 (2020年12月)
カナダ	CFIA 承認 (2020年9月)	HC 承認 (2020年9月)	CFIA 承認 (2020年9月)
オーストラリア・ ニュージーランド	—	FSANZ 申請中	—
EU	EFSA 申請中	EFSA 申請中	—

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

320

DP202216 トウモロコシでは、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

325 従来のトウモロコシと相違はない。なお、宿主の非組換えトウモロコシ
PH17AW 系統の種子及び試験に使用した DP202216 トウモロコシの各世代の
種子は保管されている。

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。

330

IV 審議結果

収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP202216) 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續」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。

335

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 340 1 An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A.
(1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible
proteinase inhibitor II gene. *The Plant Cell*. 1: 115-122.
- 2 CFIA (Canadian Food Inspection Agency). (1994). The biology of *Zea mays*
(L.).(<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-eng/1330985739405/1330985818367>)
345 /eng/1330985739405/1330985818367)
Accessed on February 27th, 2020.
- 3 Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A.
(2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro
350 site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones.
Genome Research. 14: 2111-2120.
- 4 Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin
355 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 CODEX. (2013) Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius,
STAN 210-1999.
- 360 6 Cong, B., Maxwell, C., Luck, S., Vespestad, D., Richard, K., Mickelson, J. and Zhong,
C. (2015) Genotypic and Environmental Impact on Natural Variation of Nutrient
Composition in 50 Non Genetically Modified Commercial Maize Hybrids in North

- America. Journal of Agricultural Food Chemistry 63: 5321-5334.
- 365
- 7 Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene. 91: 79-85.
- 370
- 8 De Bodt, S., Raes, J., Van de Peer, Y. and Theißen, G. (2003). And then there were many: MADS goes genomic. Trends in Plant Science 8(10): 475-483.
- 9 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-O-
- 375 nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research. 13: 7095-7106.
- 10 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. Genome Research. 10: 1788-1795.
- 380
- 11 Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis R-J. and Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 41: 134-149.
- 385
- 12 ILSI. (2011). A Review of the Environmental Safety of the PAT Protein. Center for Environmental Risk Assessment, ILSI Research Foundation. (https://ilsirf.org/wp-content/uploads/sites/5/2016/07/pat_en.pdf) . Accessed on February 27th, 2020.
- 390
- 13 ILSI. (2016). International Life Sciences Institute Crop Composition Database (Version 6.0). (<https://www.cropcomposition.org>).
- 395
- 14 Katzen, F. (2007). Gateway[®] recombinational cloning: a biological operating system. Expert Opinion on Drug Discovery 2(4): 571-589.
- 15 Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*).
- 400 Nucleic Acids Research. 14: 5641-5650.
- 16 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection

- 405 markers. *The Plant Journal*. 10(1): 165-174.
- 17 Lundry, D.R., Burns, J.A., Nemeth, M.A. and Riordan, S.G. (2013) Composition of Grain and Forage from Insect-Protected and Herbicide-Tolerant Corn, MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x DAS-59122-7 (SmartStax), Is Equivalent to That of
410 Conventional Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 1991-1998.
- 18 Münster, T., Deleu, W., Wingen, L.U., Ouzunova, M., Cacharrón, J., Faigl, W.,
415 Werth, S., Kim, J.T.T., Saedler, H. and Theißen, G. (2002). Maize MADS-Box Genes Galore. *Maydica* 47: 287-301.
- 19 OECD. (1999). Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No. 11. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(99)13.
420 (<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
Accessed on February 27th, 2020.
- 20 OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new
425 varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 6. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2002) 25.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815196.pdf>).
Accessed on February 27th, 2020.
- 430
- 21 OECD. (2003). Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology, No. 27. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO (2003)11.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815758.pdf>).
435 Accessed on February 27th, 2020.
- 22 Par̃enicová, L., de Folter, S., Kieffer, M., Horner, D.S., Favalli, C., Busscher, J.,
Cook, H.E., Ingram, R.M., Kater, M.M., Davies, B., Angenent, G.C. and Colombo, L.
(2003). Molecular and Phylogenetic Analyses of the Complete MADS-Box
440 Transcription Factor Family in Arabidopsis: New Openings to the MADS World.
The Plant Cell 15: 1538-1551.
- 23 Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA
sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of
445 yeast in vitro. *Nucleic Acids Research*. 14(2): 4787-4802.

- 24 Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT recombination sites and methods of use. World Intellectual Property Organization. Application No.PCT/US2006/027380.
- 450
- 25 Tomizawa, J-I., Ohmori, H. and Bird, R.E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences. 74: 1865-1869.
- 26 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. 農文協. pp.56-59, p.99, p.122, p.257, pp.324-327.
- 455
- 27 Watson, S.A. (1982). Corn: Amazing Maize. General Properties. CRC handbook of processing and utilization in agriculture. CRC Press Inc., Florida. pp.3-29.
- 460
- 28 Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Puhler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tu494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 70(1): 25-37.
- 465
- 29 Wu, J., Lawit, S.J., Weers, B., Sun, J., Mongar, N., Van Hemert, J., Melo, R., Meng, X., Rupe, M., Clapp, J., Haug Collet, K., Trecker, L., Roesler, K., Peddicord, L., Thomas, J., Hunt, J., Zhou, W., Hou, Z., Wimmer, M., Jantes, J., Mo, H., Liu, L., Wang, Y., Walker, C., Danilevskaya, O., Lafitte, H.R., Schussler, J.R., Shen, B. and Habben, J.E. (2019) Overexpression of *zmm28* increases maize grain yield in the field. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116 (47) : 23850 -23858.
- 470
- 30 財務省. (2020). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>). Accessed on February 27th, 2020.
- 475
- 31 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddelloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A Robust Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. *The Plant Genome* 8: 1-15.
- 480
- 32 Zhao, Z., Gu, W., Cai, T., Tagliani, L., Hondred, D., Bond, D., Schroeder, S., Rudert, M. and Pierce, D. (2001). High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. *Molecular Breeding*. 8: 323-333.
- 485
- 1 参考資料 (申請者提出 社外秘)
Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DP-202216-6: U.S. and Canada Test Sites [REDACTED]

- 2 トウモロコシ種子及び茎葉中の構成成分文献値一覧
- 490 3 Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP40099 [REDACTED]
[REDACTED]
- 4 Sequence Alignment of the Deduced Amino Acid Sequence of the ZMM28 Protein
[REDACTED]
- 495 5 Southern-by-Sequencing Analysis of DP-202216-6 Maize [REDACTED]
[REDACTED]
- 6 Confirmation of the Absence of Agrobacterium Backbone Regions for Maize
500 Events DP-202216-6 and DP-382118-7 [REDACTED]
- 7 Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-
202216-6 Maize [REDACTED]
- 505 8 Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-202216-6
[REDACTED]
- 9 Characterization of DP-202216-6 Maize for Insertion Stability in Five
Generations Using Southern Blot Analysis [REDACTED]
- 510 10 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-
202216-6: U.S. and Canada Test Sites [REDACTED]
- 11 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-202216-6
515 [REDACTED]
- 12 Comparison of the ZMM28 Protein Sequence to the Protein Sequences in the
DuPont Pioneer Toxin Database [REDACTED]
- 520 13 Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont
Pioneer Toxin Database [REDACTED]