

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

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3年(2021年)10月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

<審議の経緯>	3
<食品安全委員会委員名簿>	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>	3
要 約	4
Ⅰ. 評価対象食品の概要	5
Ⅱ. 食品健康影響評価	5
第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相 違に関する事項	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項	5
2. 宿主の食経験に関する事項	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	5
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項 ...	6
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品として の性質に関する事項	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項	6
第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	7
第 3. 宿主に関する事項	7
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項	7
4. アレルギー誘発性に関する事項	7
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項..	7
6. 安全な摂取に関する事項	7
7. 近縁の植物種に関する事項	7
第 4. ベクターに関する事項	8
1. 名称及び由来に関する事項	8
2. 性質に関する事項	8
第 5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項	9
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	11
第 6. 組換え体に関する事項	12

1. 遺伝子導入に関する事項.....	12
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	13
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	16
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	16
7. 宿主との差異に関する事項.....	17
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	18
9. 栽培方法に関する事項.....	18
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	18
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	18
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	18
<参照>.....	19

<審議の経緯>

- 2021年1月8日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0107第3号）、関係書類の接受
- 2021年1月19日 第803回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年2月26日 第208回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年7月21日 第213回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年10月12日 第835回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2021年6月30日まで	2021年7月1日から
佐藤 洋（委員長）	山本 茂貴（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）	浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹	川西 徹（委員長代理 第二順位）
吉田 緑	脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり	香西 みどり
堀口 逸子	松永 和紀
吉田 充	吉田 充

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

中島 春紫（座長）	
児玉 浩明（座長代理）	
安達 玲子	近藤 一成
飯島 陽子	手島 玲子
岡田 由美子	樋口 恭子
小関 良宏	山川 隆
小野 竜一	吉川 信幸
橘田 和美	

要 約

「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)」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、トウモロコシ (*Z. mays*) に由来する *zmm28* 遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子を導入して作出されており、ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質を発現することで、収量の増加及びグルホシネートの除草作用に対する耐性を付与する。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較の結果等について確認した結果、非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「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)」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

(申請内容)

名称：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：収量増加及び除草剤グルホシネート耐性

申請者：コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社

開発者：Pioneer Hi-Bred International, Inc., Member of Corteva Agriscience Group of Companies (米国)

「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「トウモロコシ DP202216」という。)は、*zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入して作出されており、ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質を発現することで、収量の増加及びグルホシネートの除草作用に対する耐性を付与する。

II. 食品健康影響評価

第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 PH17AW 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

zmm28 遺伝子の供与体は *Z. mays* であり、*pat* 遺伝子の供与体は *Streptomyces viridochromogenes* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

zmm28 遺伝子は、収量増加形質を付与する ZMM28 タンパク質をコードする。ZMM28 タンパク質は、宿主であるトウモロコシの内在性 ZMM28 タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

pat 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質をコードする。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシは、古くから多くの食経験があり(参照 1)、現在では世界中で食品や飼料等に広く利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等 (タンパク質、脂質等) の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、粗タンパク質 5.7～17.3%、粗脂質 1.4～7.8%、粗繊維 0.5～5.5%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.7%である(参照 2-4)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子に、毒性物質の産生性は知られていない。栄養阻害物質（対乾燥重量）については、フィチン酸 ND^a～1.9%、ラフィノース ND～0.47%である(参照 2-4)。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシ DP202216 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ DP202216 の摂取部位は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(3) 摂取量

トウモロコシ DP202216 の摂取量は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

(4) 調理及び加工方法

トウモロコシ DP202216 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ DP202216 は、*zmm28* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入して作出されており、ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質を産生することが宿主との相違点である。

1. から 6. までは、トウモロコシ DP202216 の安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断した。

^a ND：定量下限値及び検出限界値未満。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

トウモロコシ DP202216 は、収量が増加し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができる。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Z. mays* ssp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 PH17AW 系統である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの遺伝的先祖は、同属のテオシントで、原産地は、メキシコ、中米、南米等と考えられている(参照 5)。栽培適性の異なる多くの品種が育成された結果、現在では世界的に広く栽培される作物となった(参照 1)。

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、有害生理活性物質のうちヒトの健康に悪影響を与える毒性物質についてはその産生性が知られていないが、栄養阻害物質としては、フィチン酸、ラフィノースが含まれていることが知られている(参照 6)。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシの Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれる分子量 9 kDa のタンパク質、16 kDa のトリプシンインヒビター、26 kDa の α -ゼイン前駆体、30 kDa のキチナーゼ-A 及び 50 kDa の還元可溶性タンパク質が食物アレルギーとして報告されている(参照 7-9)が、一般的にトウモロコシはアレルギー誘発食品とは考えられていない(参照 6)。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）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(参照 5)が、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは世界の主要穀物の一つで、古くから多くの食経験がある。トウモロコシは、食品分野においてコーン油、コーンスターチの原料等として幅広く利用されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、テオシント及びトリプサカム属が知られているが(参照 5)、わが国において食用に供されることはない。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

トウモロコシ DP202216 の作出に使用した導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域は、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。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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 PHP40099 の外側骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域にはスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *spc* 遺伝子及びテトラサイクリンに対して耐性を付与する *tetA* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の外側骨格領域には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

zmm28 遺伝子の供与体は *Z. mays* であり、*pat* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* である。

(2) 安全性に関する事項

Z. mays は、安全な食品としての長い利用の歴史をもつ。

S. viridochromogenes は、土壌中に広く存在し、ヒトに対する病原性は報告されていない(参照 10)。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング又は合成方法に関する事項

zmm28 遺伝子は、トウモロコシからクローニングした。塩基配列は内在性 *zmm28* 遺伝子の塩基配列と同一である。

pat 遺伝子は、*S. viridochromogenes* の配列に基づき、トウモロコシ中における発現を高めるための塩基配列の変更を行ったが、アミノ酸配列に変化はない。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *zmm28* 遺伝子

zmm28 遺伝子は、スクリーニング調査により、収量増加に係わる有用遺伝子として同定され、試験の結果からその特性が確認された(参照 11)。*zmm28* 遺伝子がコードする ZMM28 タンパク質は、核に局在し、DNA 結合配列も同定されている MADS ボックス転写因子である(参照 11)。トウモロコシ由来の *zm-gos2* プロモーターを用いることで、ZMM28 タンパク質を早期に発現・増加させる。その結果、初期栄養成長期にトウモロコシ DP202216 の成長が促進され、葉における光合成及び窒素代謝効率が向上することで、収量が増加すると考えられている(参照 11)。実際に、トウモロコシ DP202216 における、ZMM28 タンパク質の直接的な標的遺伝子を探索した結果、光合成及び炭素同化に関連した遺伝子の発現増加が認められ、トウモロコシ DP202216 の表現型と一致していた(参照 11)。

ZMM28 タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無について確認するために、毒性タンパク質データベース^bを用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-4}$ を指標として検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 12)。

② *pat* 遺伝子

pat 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、L-グルホシネートをアセチル化し、除草活性のない N-アセチル-L-グルホシネートに変える結果、トウモロコシ DP202216 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる(参照 10)。

PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース^bを用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-4}$ を指標として検

^b UniProtKB/Swiss-Prot を基に作成された毒素タンパク質のデータベース。

索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 13)。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 は、スペクチノマイシン耐性を付与する *spc* 遺伝子、テトラサイクリン耐性を付与する *tetA* 遺伝子を有するが、本遺伝子は外側骨格領域に存在し、トウモロコシ DP202216 には導入されない。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

zmm28 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*Z. mays* 由来の *zm-gos2* プロモーター配列である。

pat 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*Z. mays* 由来の *ubiZM1* プロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

zmm28 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 由来の *pin II* ターミネーター配列である。

(3) その他

zmm28 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットは目的遺伝子の発現を高めるために *Z. mays* 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン配列を用いた。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) 等由来のプラスミド pSB1 を基に、T-DNA 領域等を挿入することにより作製された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている(参照 14)

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

第6-1-(2)に記載のとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド PHP40099 の意図する挿入領域は、T-DNA 領域の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までである。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド PHP40099 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜を通じて目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。

表1 トウモロコシ DP202216 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(zmm28 遺伝子発現カセット)	
<i>zm-gos2</i> プロモーター	<i>Z. mays</i> 由来の翻訳開始遺伝子 <i>gos2</i> 遺伝子のプロモーター領域 生育段階の早期から発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> イントロン	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域
<i>zmm28</i>	<i>Z. mays</i> 由来の MADS ボックス転写因子をコードする。5'側及び3'側領域に 60 bp 及び 41 bp の非翻訳領域を含む。
<i>pinII</i> ターミネーター	<i>S. tuberosum</i> 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター領域 転写を停止する。
(pat 遺伝子発現カセット)	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	<i>Z. mays</i> 由来のユビキチン遺伝子のプロモーター領域 植物体内での構成的発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> 5'UTR 及びイントロン	<i>Z. mays</i> 由来のユビキチン遺伝子の 5'UTR 及びイントロン領域
<i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 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 タンパク質) をコードする遺伝子
<i>pinII</i> ターミネーター	<i>S. tuberosum</i> 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター領域 転写を停止する。
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド PHP40099 を用いて、宿主の未熟胚をアグロバクテリウム

法による形質転換後、グルホシネート耐性をマーカーとして選抜し、形質転換再生個体を得た。このうち T-DNA 領域を 1 コピー有する植物体を一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、自殖及び既存の品種との交配又は戻し交配を行い、トウモロコシ DP202216 が得られた。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

トウモロコシ DP202216 のゲノムに挿入された T-DNA 領域のコピー数を確認するために、Southern by Sequence (SbSTM) 分析^cを行った(参照 15)(参照 16)。その結果、カバレッジ値が 1657 から 3408 の範囲であったことから、信頼性に問題はなかった。T-DNA 領域由来の配列と宿主ゲノムとの接合部は 2 つ同定され、T-DNA 領域が 1 コピー挿入されていることが確認された。また、導入用プラスミド PHP40099 の外骨格領域由来の配列は挿入されていないことが確認された(参照 17)。

トウモロコシ DP202216 の T-DNA 挿入領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの T-DNA 領域と比較した結果、右側及び左側境界領域にそれぞれ 22 bp 及び 12 bp の欠失が認められた以外、配列は同一であることが確認された(参照 18)。

次に、トウモロコシ DP202216 の挿入 DNA 近傍配列の 5'末端近傍配列(1,283 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,372 bp) について、非組換えトウモロコシの塩基配列と比較した。その結果、トウモロコシ DP202216 の近傍配列と非組換えトウモロコシの塩基配列は一致しており、導入遺伝子の近傍配列が宿主ゲノム由来であることが確認された(参照 19)。

また、トウモロコシゲノムに T-DNA を挿入することによる宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列について、核酸データベース^d及び EST データベース^dを用いて blastn 検索並びにタンパク質データベース^dを用いた blastx 検索を行った。核酸データベースを用いた検索の結果、3'近傍配列において仮想的 mRNA が検出されたが、EST 及びタンパク質データベース検索結果との一致はなく、したがって両近傍領域にトウモロコシ内在性遺伝子が存在している可能性は低いと考えられた(参照 19)。

^c キャプチャー技術と次世代シーケンスを組み合わせた解析手法：カバレッジ値が 35 以下の場合バックグラウンドと判断される。

^d 各データベースとも 2018 年 7 月公表 (NCBI nucleotide, EST, non-redundant protein)

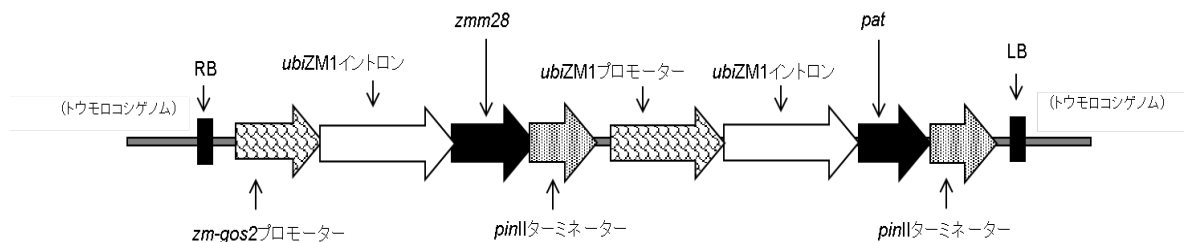


図1 トウモロコシ DP202216 に挿入された DNA (模式図)

(2) 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

トウモロコシ DP202216 の T-DNA 領域と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列を含む領域において意図しないオープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) が生じていないことを確認するために、6つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 141 個見いだされた(参照 20)。

既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^eを用いて FASTA 検索を行い、 $E\text{-value}=1 \times 10^{-4}$ を指標として連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を有する配列及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する配列を検索した。その結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を有する ORF は検出されなかった。また、連続する 8 アミノ酸配列については、*Aspergillus fumigatus* の Asp f 7 及び *Gallus gallus* の 2 つの推定アレルゲンとの相同性を示した。それぞれの連続した 8 アミノ酸配列には、開始コドンが上流に存在せず、PAT タンパク質や ZMM28 タンパク質と読み枠が異なることから、実際に翻訳される可能性は低いと考えられた。また、ブドウ及びソルガムにも同配列が含まれることが見いだされているが(参照 20)、ブドウ及びソルガムに含まれる既知のアレルゲンにこれらの配列は含まれていない。以上から、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため毒性タンパク質データベース^fを用いて $E\text{-value}=1 \times 10^{-4}$ を指標として blastp 検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった(参照 20)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

トウモロコシ DP202216 の葉、花粉、根、地上部、全植物体及び種子について、ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析した。

^e Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) ver 2019

^f UniProtKB/Swiss-Pro に基づいて作成された自社の毒性データベース (2019年1月)

なお、内在性 ZMM28 タンパク質と導入遺伝子から産生される ZMM28 タンパク質は同一でありエライザ法で区別することはできないため、トウモロコシ DP202216 中の ZMM28 タンパク質の産生量は、内在性 ZMM28 タンパク質と導入遺伝子から産生される ZMM28 タンパク質の合算値となる。そのため比較対照として、対照トウモロコシにおける ZMM28 タンパク質量を同法にて測定した。結果は表 2 及び 3 のとおりである(参照 21)。

表 2 トウモロコシ DP202216 及び対照トウモロコシにおける ZMM28 タンパク質の発現量 (平均値)

(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織	ZMM28 タンパク質	
	トウモロコシ DP202216	対照トウモロコシ
葉	ND~0.32	ND~0.22
花粉	0.015	ND
根	0.015~0.031	ND~0.019
地上部	0.049	0.029
全植物体	0.019~0.23	0.019~0.20
種子	0.012	ND

ND(Not determined) : 採取時期における全サンプルが定量限界値未満。

サンプルの採取時期について、葉は 6 葉期~完熟期、花粉は絹糸抽出期、根及び全植物体は 9 葉期~完熟期、地上部は糊熟期、種子は完熟期である。

発現量は平均値 (葉、根及び植物全体は、採取時期毎の平均値を幅表示) で示した。

定量限界値は、0.054 (葉)、0.028 (花粉)、0.027 (根)、0.036 (地上部及び全植物体) 及び 0.0069 (種子) ng/mg 乾燥重である。

表 3 トウモロコシ DP202216 における PAT タンパク質の発現量 (平均値)

(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織	PAT タンパク質
葉	ND~88
花粉	76
根	7.4~17
地上部	32
全植物体	21~32

種子	15
----	----

ND(Not determined) : 採取時期における全サンプルが定量限界値未満。

サンプルの採取時期について、葉は 6 葉期～完熟期、花粉は絹糸抽出期、根及び全植物体は 9 葉期～完熟期、地上部は糊熟期、種子は完熟期である。

発現量は平均値（葉、根及び植物全体は、採取時期毎の平均値を幅表示）で示した。

定量限界は、0.11（葉）、0.22（花粉）、0.054（根）、0.036（地上部及び全植物体）及び 0.054（種子）ng/mg 乾燥重である。

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日に摂取するトウモロコシ・加工品の摂取量 1.0 g (参照 22)を全てトウモロコシ DP202216 に置き換えて ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質の摂取量を計算すると 0.012 及び 15 µg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.4 g (参照 22)に占める割合は 1.7×10^{-10} 及び 2.2×10^{-7} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

zmm28 遺伝子の供与体であるトウモロコシは、第 3 - 4 に記載したアレルゲンの可能性を示唆する物質を有するが、一般的なアレルギー誘発食品ではなく(参照 6, 23)、我が国のアレルギー表示対象品目(参照 24)に含まれていない。

pat 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* に、アレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

食用に用いられるスイートコーン種で産生される ZMM28 タンパク質のアミノ酸配列は、トウモロコシ DP202216 のアミノ酸配列と同一である(参照 25)。ウェスタンブロット分析を用いてトウモロコシ DP202216 由来の ZMM28 タンパク質及び対照の非組換えトウモロコシ由来の ZMM28 タンパク質を比較した結果、分子量は同一であった。食用に用いられる乳熟期のスイートコーン種種子中の ZMM28 タンパク質量を分析した結果、平均 0.022 ng/mg (乾物重)であり(参照 26)、トウモロコシ DP202216 中に含まれる ZMM28 タンパク質量はその範囲内であった。したがって、ZMM28 タンパク質は、食用として安全に利用された経験のあるトウモロコシに含まれているものと質的及び量的に同

等であり、トウモロコシ DP202216 で産生される ZMM28 タンパク質が新にアレルギーを誘発する可能性は低いと考えられた。

トウモロコシ DP202216 で産生される PAT タンパク質は、既に安全性審査の終了したトウモロコシ 1507 系統（官報発行年月日：2002 年 7 月 8 日）等で産生される PAT タンパク質のアミノ酸配列と同一であり、物理化学的処理に対して感受性を示す結果と同等であると考えられた。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項

ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質のと既知のアレルゲン等との構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致する配列は見いだされなかった。

(1) から (4) まで及び前項 3 から総合的に判断し、ZMM28 タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ DP202216 の葉から抽出されたゲノム DNA を用いてサザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが確認され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された(参照 27)。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

トウモロコシ DP202216 における網羅的な遺伝子発現解析及び標的遺伝子解析の結果、ZMM28 タンパク質の標的として、光合成及び炭素同化に関連する遺伝子が同定された。また窒素吸収量及び窒素同化量も増加していた。このように ZMM28 タンパク質の発現増加が光合成や窒素代謝効率の向上及び初期の栄養成長を促し、収量増加に寄与すると考えられた(参照 11)。

また、遺伝子導入により発現した ZMM28 タンパク質は、内在性 ZMM28 タンパク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るが、新たな代謝経路が生じる可能性は低いと考えられた。トウモロコシ DP202216 の構成成分分析の結果及び農業的特性の調査結果において、非組換え体と比較して相違は認められなかった（第 6 - 7）(参照 28)。したがって、ZMM28 タンパク質の発現がトウモロコシ内在性の代謝経路に与える影響は小さいと考えられる。

PAT タンパク質は、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

^e Comprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) ver 2019

に対して高い基質特異性を有することから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたトウモロコシ DP202216 と非組換えトウモロコシについて、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、二次代謝産物及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った(参照 29)。

(1) 主要構成成分

種子中の主要構成成分（総食物繊維、粗タンパク質、粗脂質、粗繊維分、酸性及び中性デタージェント繊維、灰分、炭水化物）について分析を行った結果、炭水化物において統計学的有意差が認められたが、全サンプルの値は自社商業品種変動の範囲^g及び文献値の範囲^h内であった。

(2) 脂肪酸組成

種子中の脂肪酸 15 種類について分析を行った結果、リノール酸において統計学的有意差が認められたが、全サンプルの値は自社商業品種変動の範囲及び文献値の範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

種子中のアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、ロイシンにおいて統計学的有意差が認められたが、全サンプルの値は自社商業品種変動の範囲及び文献値の範囲内であった。

(4) ミネラル類

種子中のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛）について分析を行った結果、統計学的有意差は認められなかった。

(5) ビタミン類

種子中の β -カロチン、ビタミン B₁（チアミン）、ビタミン B₂（リボフラビン）、ビタミン B₃（ナイアシン）、ビタミン B₅（パントテン酸）、ビタミン B₆（ピリドキシン）、ビタミン B₉（葉酸）及びトコフェロール類について分析を行った結果、ビタミン B₁ において統計学的有意差が認められたが、全サンプルの値は自社商業品種変動の範囲及び文献値の範囲内であった。

^g 93 の商業品種の分析結果に基づき、分析値の 99% を含む上限値と下限値の範囲。

^h Codex, 2013, Cong *et al.*, 2015, ILSI, 2019, Lundry *et al.*, 2013, OECD, 2002 及び Watson, 1982 に基づく最小値及び最大値（添付資料 1）。

(6) 栄養阻害物質及び二次代謝産物

種子中のフィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター、*p*-クマル酸、フェルラ酸、フルフラール及びイノシトールについて分析を行った結果、イノシトールにおいて統計学的有意差が認められたが、全サンプルの値は自社商業品種変動の範囲及び文献値の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国農務省（USDA）に対して無規制裁培の申請が行われ、2020年12月に承認された。

カナダにおいては、カナダ食品検査庁（CFIA）及びカナダ保健省（Health Canada）に対して飼料・環境及び食品の安全性審査の申請が行われ、2020年9月に承認された。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2021年2月に承認された。

欧州においては、欧州食品安全機関（EFSA）に対して食品・飼料の安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ DP202216 の栽培方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ DP202216 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「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 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 戸澤英男, トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用 農山漁村文化協会, 2005; 2-5、56-59、88-89、127
2. ILSI. International Life Sciences Institute Crop Composition Database (Version 7.0), 2019
3. CODEX. CODEX Standard for Named Vegetable oils (CODEX STAN 210-1999) 2013; 60
4. Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR522223 (社内文書)
5. OECD. ENV/JM/MONO(2003)11 Consensus Document on the Biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize), 2003
6. OECD. ENV/JM/MONO(2002)25 Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea Mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Secondary Plant Metabolites, 2002
7. Pastorello E.: Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 ° C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results。 Journal of Allergy and Clinical Immunology 2003; 112: 775-83
8. Pastorello E. A., Farioli L., Pravettoni V., Scibilia J., Conti A., Fortunato D., 他: Maize food allergy: lipid-transfer proteins, endochitinases, and alpha-zein precursor are relevant maize allergens in double-blind placebo-controlled maize-challenge-positive patients。 Anal Bioanal Chem 2009; 395: 93-102
9. Volpicella M., Leoni C., Fanizza I., Distaso M., Leoni G., Farioli L., 他: Characterization of maize chitinase-A, a tough allergenic molecule。 Allergy 2017; 72: 1423-29
10. OECD. ENV/JM/MONO(99)13 Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide, 1999
11. Wu J., Lawit S. J., Weers B., Sun J., Mongar N., Van Hemert J., 他: Overexpression of zmm28 increases maize grain yield in the field。 Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116: 23850-58
12. Comparison of the ZMM28 Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database (社内文書)
13. Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database (社内文書)
14. Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP40099 (社内文書)
15. Zastrow-Hayes Gina M., Lin Haining, Sigmund Amy L., Hoffman Jenna L., Alarcon Clara M., Hayes Kevin R., 他: Southern-by-Sequencing: A Robust

- Screening Approach for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops。 The Plant Genome 2015; 8: plantgenome2014.08.0037
16. Brink K., Anitha S., Beatty M., Anderson J.A., Lyon M. , Weaver J., 他: Comparison of Southern-by-Sequencing (SbSTM) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops。 Journal of Regulatory Science 2019: 1-14
 17. Southern-by-Sequencing Analysis of DP-202216-6 Maize (社内文書)
 18. Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-202216-6 Maize (社内文書)
 19. Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-202216-6 (社内文書)
 20. Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-202216-6 (社内文書)
 21. Agronomic Characteristics, Expressed Trait Protein Concentration, and Nutrient Composition of a Maize Line Containing Event DP-202216-6: U.S. and Canada Test Sites (社内文書)
 22. 厚生労働省. 平成 29 年国民健康・栄養調査報告(平成 30 年 12 月) , 2018; 58, 68
 23. Codex. Draft recommendations for the labeling of foods that can cause hypersensitivity (Draft amendment to the general standard for the labelling of prepackaged foods), 1999
 24. 消費者庁. アレルギー表示に関する情報—別添 アレルギーを含む食品に関する表示, 2015
 25. Sequence Alignment of the Deduced Amino Acid Sequence of the ZMM28 Protein (社内文書)
 26. Anderson J. A., Brustkern S., Cong B., Deege L., Delaney B., Hong B., 他: Evaluation of the History of Safe Use of the Maize ZMM28 Protein。 J Agric Food Chem 2019; 67: 7466-74
 27. Characterization of DP-202216-6 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (社内文書)
 28. Agronomic Characteristics of a Maize Line Containing Event DP-202216-6 : U.S. and Canada Test Sites (社内文書)
 29. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DP-202216-6: U.S. and Canada Test Sites (社内文書)