

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」に係る安全性確認(案)

I はじめに

農業資材審議会は、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604（以下「MIR604」という。）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」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行い、平成 19 年 6 月に、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断した。

平成 20 年 4 月、申請者より導入遺伝子の近傍配列について、以前提出した資料の塩基配列との相違が認められたとの報告があったため、再度審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼 料 名 : コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR604

性 質 : 害虫抵抗性

申 請 者 : シンジェンタシート株式会社

開 発 者 : Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

MIR604 は、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry3A たん白質（以下「mCry3A たん白質」という。）を発現する改変 *cry3A* 遺伝子（以下「*mcry3A* 遺伝子」という。）を導入したものであり、コウチュウ目害虫に抵抗性をもつ性質を付与されている。

III 審議内容

第 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

宿主に用いた植物は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) でデント種に属する。MIR604 に導入された *mcry3A* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する（参考文献 1）。また、形質転換体の選抜マーカーとして導入されたマンノースリン酸イソメラーゼ (phosphomannose isomerase) 遺伝子（以下「*pmi* 遺伝子」という。）は大腸菌に由来する。

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、広範囲な家畜等の飼養経験を持つ。

3 飼料の構成成分等に関する事項

MIR604 の穀粒の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 10.44%~11.80%、脂質 2.65%~3.88%、ADF5.2%~5.5%、NDF12.9%~13.4%、灰分 1.50%~1.59%、炭水化物 82.8%~84.0%であり、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 7.27%~9.03%、脂質 1.37%~2.15%、ADF20.84%~28.1%、NDF37.41%~44.3%、灰分 3.46%~4.43%、炭水化物 84.4%~85.9%であった。

37 トウモロコシの穀粒の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 6%~15%、脂質 3%
38 ~6%、ADF2%~11%、NDF6%~23%、灰分 0.6%~6%、炭水化物 74%~90%であり（文
39 献値、参考文献 2~6）、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 3%~12%、
40 脂質 0.3%~5%、ADF16%~42%、NDF20%~64%、灰分 2%~10%、炭水化物 76%~92%
41 であった（文献値、参考文献 2、3）。

42

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

44 MIR604 と既存のトウモロコシとの相違は、MIR604 が mCry3A たん白質の発現により
45 コウチュウ目害虫に対して抵抗性を示す点のみである。これらの点を除けば、MIR604
46 は既存のトウモロコシと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取部位、
47 ③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について相違はない。

48

49 以上 1.1~1.4 により、MIR604 の飼料としての安全性を評価するために、既存のトウモ
50 ロコシを比較対象として用いる方法が適用できると判断された。

51

52 第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

53 MIR604 は、mCry3A たん白質の発現によりコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示し、
54 トウモロコシに被害を及ぼすウエスタンコーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に
55 対し効果的な防除を行うことが可能となる。

56

57 第3 宿主に関する事項

58 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

59 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* L.)で、MIR604 の作
60 出には交雑種を用いた。

61

62 2 遺伝的先祖に関する事項

63 トウモロコシは、一般に、紀元前 5,000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地
64 と考えられ、その植物学的起源は、育種過程でブタモロコシから派生したとする説が
65 有力とされている。

66

67 3 有害生理活性物質の生産に関する事項

68 トウモロコシが有害生理活性物質を生産することは知られていない。

69

70 4 寄生性及び定着性に関する事項

71 トウモロコシの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

72

73 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

74 トウモロコシに感染する病原体は知られているが、家畜等に対する病原性は知られ
75 ていない。

76

77 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

78 トウモロコシは栽培作物であり、我が国において自生したという報告はない。

79

80 7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

81 トウモロコシは種子繁殖する一年生のイネ科作物である。品種や地域によって栽培
82 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。トウモロコシの近縁種に
83 はトリプサカム属及びブタモロコシがあるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはブ
84 タモロコシのみである。なお、我が国においてブタモロコシの自生は知られていない。

85

86 8 飼料に利用された歴史に関する事項

87 子実を直接飼料として利用するほかサイレージ用としても利用されている。また、
88 食品や工業製品の副産物も飼料として利用されている。

89

90 9 飼料の安全な利用に関する事項

91 上記8のとおり、トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

92

93 10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

94 現在のトウモロコシは、栽培作物として適するように人為的に高度に改良された作
95 物であり、人の助けなしに生存、繁殖することはできない。

96

97 11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

98 トウモロコシの近縁種である他のトリプサカム属種において有害生理活性物質の産
99 生は報告されていない。

100

101 第4 ベクターに関する事項

102 1 名称及び由来に関する事項

103 MIR604 の作出には発現ベクター-pZM26 が用いられた。pZM26 は pVictor を用いて作
104 成された。

105

106 2 性質に関する事項

107 pZM26 の塩基数は 13,811bp であり、制限酵素による切断地図は明らかになってい
108 る。また、pZM26 に存在する全ての遺伝子の由来及び機能は明らかになっており、既
109 知の有害塩基配列を含まない。

110

111 3 薬剤耐性に関する事項

112 pZM26 には、細菌中での選抜・維持のため、エリスロマイシン、ストレプトマイシ
113 ン及びスペクチノマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が存在しているが、
114 この遺伝子は MIR604 に存在しないことが、サザンブロット分析によって確認された。

115

116 4 伝達性に関する事項

117 pZM26 には伝達性に関与する、*Pseudomonas* 菌由来の *VS1ori* (参考文献 7) 、*E.*
118 *coli* 由来の *ColEIori* (参考文献 8) 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の *virG*

119 (参考文献 9) が含まれるが、いずれも伝達域が明らかであり、宿主植物以外に伝達
120 することはない。

121

122 5 宿主依存性に関する事項

123 pZM26 の宿主域は限られており、家畜等が宿主となることはない。

124

125 6 発現ベクターの作成方法に関する事項

126 pZM26 は、pVictor を基に、挿入遺伝子である *mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子とこれ
127 らの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子を組み込み作成された。

128

129 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

130 pZM26 の T-DNA 領域がアグロバクテリウム法により宿主に導入された。

131

132 第5 挿入遺伝子に関する事項

133 1 供与体に関する事項

134 (1) 名称、由来及び分類に関する事項

135 *mcry3A* 遺伝子は、*B. t. t* に由来する *cry3A* 遺伝子をもとに、トウモロコシでの発
136 現に最適な塩基配列 (参考文献 10) に置換・人工合成 (参考文献 11) され、さら
137 に、標的コウチュウ目害虫に対する抵抗性を高めるために改変した遺伝子である。

138 *pmi* 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされたマンノースリン酸イソメ
139 ラーゼを産出する *manA* 遺伝子で、形質転換体の選抜マーカーとして用いられた
140 (参考文献 12)。

141 (2) 安全性に関する事項

142 *B. t. t.* については微生物農薬の有効成分として安全に利用されており、*E. coli*
143 は自然界に広く存在することが知られている。

144

145 2 遺伝子の挿入方法に関する事項

146 pZM26 は、pVictor を基に、挿入遺伝子である *mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子とこ
147 れらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子を組み込み作成された。宿主への導入はアグ
148 ロバクテリウム法により行い、導入後は、マンノースを添加した培地を用いて形質転
149 換体を選抜した。

150

151 3 構造に関する事項

152 *mcry3A* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシ由来の MTL プロモーター (参考文献
153 13) で、*pmi* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシ由来の ZmUbiInt プロモーターで
154 ある (参考文献 14)。*mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子のターミネーターは *A.*
155 *tumefaciens* 由来の NOS である (参考文献 15)。なお、これらのプロモーター及びター
156 ミネーターの塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まない。

157

158 4 性質に関する事項

159 MIR604 に導入された *mcry3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットの各

160 構成要素、由来及び機能を表 1 にまとめた。

161

162

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
MTL	プロモーター領域。トウモロコシ由来で、トウモロコシの根での発現に適したプロモーターとして用いられた (参考文献 13)。
<i>mcry3A</i>	<i>B. t. t.</i> 由来の <i>cry3A</i> 遺伝子 (参考文献 1)。トウモロコシでの発現を最適化し、標的コウチュウ目害虫への抵抗性を高めるために改変されている。
NOS	ターミネーター領域。 <i>A. tumefaciens</i> 由来の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化配列 (参考文献 15)。
ZmUbiInt	プロモーター領域。トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来で第一イントロン領域を含む単子葉植物用プロモーターである (参考文献 14)。
<i>pmi</i>	マンノースリン酸イソメラーゼを産出する <i>E. coli</i> K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子 (参考文献 16) で、遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられた (参考文献 12)。
NOS	ターミネーター領域。 <i>A. tumefaciens</i> 由来の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化配列 (参考文献 14)。

163

164

【*mcry3A* 遺伝子の機能】

165

166

167

mcry3A 遺伝子は、コウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワーム及びノーザンコーンルートワームに抵抗性を付与する 597 のアミノ酸から成る mCry3A たん

168

169

170

171

172

173

174

白質を産出する。
土壌細菌である *B. t. t.* から単離された Bt たん白質は、特定の昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種が Bt たん白質を摂取して消化すると、特異なたん白質消化によって活性ポリペプチド (コアたん白質) となり、昆虫の中腸表面の特異的な受容体に結合し、イオンチャネルが形成されて消化器官が損傷を受け、死に至ることが知られている (参考文献 17~21)。この作用機作は *B. t. t.* 由来の Cry3A たん白質も同様である (参考文献 22~29)。なお、Cry3A たん白質は家畜等に対して健康を害するような影響の懸念がないことが報告されている (参考文献 30~31)。

175

176

【*pmi* 遺伝子の機能】

177

178

179

180

181

182

183

184

pmi 遺伝子は、391 のアミノ酸から成る PMI たん白質を産出する。
PMI タンパク質は、*E. coli* のマンノースリン酸イソメラーゼであり、MIR604 の作出過程において、形質転換体の選抜マーカーとして用いられた (参考文献 12)。トウモロコシを含む多くの植物細胞はマンノースを炭素源として生育に利用できないが、*pmi* 遺伝子の導入により PMI たん白質を発現する細胞では、マンノースを利用可能なフルクトース 6-リン酸に変換して生長することができるので、マンノースを組織培養培地に添加することにより、形質転換体の選抜が可能となる。

185

5 純度に関する事項

186 挿入遺伝子を含む pZM26 は、細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化
187 されている。

188

189 6 安定性に関する事項

190 MIR604 の各世代での挿入遺伝子の安定性を確認するため、*mcry3A* 遺伝子をプロ
191 ブに用いたサザンブロット分析を行ったところ、各世代において *mcry3A* 遺伝子が安
192 定していることが確認された。また、MIR604 における挿入遺伝子の分離様式を確認
193 するため、mCry3A たん白質の ELISA 分析、*pmi* 遺伝子と *mcry3A* 遺伝子に対する
194 TaqMan®PCR 分析を行ったところ、挿入遺伝子の分離比の実測値は期待値 (3:1) と一
195 致し、MIR604 の挿入遺伝子はメンデルの分離法則に基づいて遺伝することが確認さ
196 れた。

197

198 7 コピー数に関する事項

199 サザンブロット分析の結果から、*mcry3A* 遺伝子、*pmi* 遺伝子及びこれらの遺伝子の
200 発現に必要な調節遺伝子が、トウモロコシゲノムに 1 コピー挿入されたことが確認さ
201 れた。

202

203 8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

204 MIR604 における mCry3A たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、生育
205 初期から収穫期（穀粒のみ成熟期から収穫期）までの mCry3A たん白質発現量の平均
206 値 ($n=3\sim 4$) の範囲は、葉 $3.31\ \mu\text{g/g fwt}\sim 23.27\ \mu\text{g/g fwt}$ 、根 $1.97\ \mu\text{g/g fwt}\sim$
207 $13.79\ \mu\text{g/g fwt}$ 、全植物体 $0.91\sim 11.13\ \mu\text{g/g fwt}$ 、穀粒 $0.63\ \mu\text{g/g fwt}\sim 1.37\ \mu\text{g/g}$
208 fwt であった。また、PMI たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、生育
209 初期から収穫期（穀粒のみ成熟期から収穫期）までの PMI たん白質の発現量の平均値
210 ($n=3\sim 4$) は、葉 $\text{LOQ}\sim 0.44\ \mu\text{g/g fwt}$ 、根 $\text{LOQ}\sim 0.18\ \mu\text{g/g fwt}$ 、全植物体 $\text{LOQ}\sim$
211 $0.26\ \mu\text{g/g fwt}$ 、穀粒 $\text{LOQ}\sim 0.35\ \mu\text{g/g fwt}$ であった ($\text{LOQ}: 0.06\ \mu\text{g/g fwt}$)。

212

213 9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

214 pZM26 の T-DNA 領域外には、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチ
215 ノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が存在しているが、この遺伝子は MIR604 には
216 存在せず、このことはサザンブロット分析により確認された。

217

218 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 219 に関する事項

220 VNTi (version 9.0、InforMax 社) を用いた解析の結果から、MIR604 に挿入された
221 T-DNA とトウモロコシゲノムの接合部分に、258 塩基からなる 1 つのオープンリーデ
222 ィングフレームが確認された。 (参考文献 34) しかし、その上流には、転写に必要な
223 プロモーター配列が存在しないことから、このオープンリーディングフレームが転
224 写される可能性は極めて低いと考えられた。

225 念のため、このオープンリーディングフレームの翻訳アミノ酸配列について、既知
226 毒素及び既知アレルゲンとの相同性検索を行い、有意な相同性がないことを確認した。

227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267

第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

MIR604 は、mCry3A たん白質が発現することによりコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示す。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

mCry3A たん白質及び PMI たん白質について既知毒素との構造相同性を確認するため、データベースの National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (NCBI, 2004) 及び検索プログラムの BLASTP search program (version 2.2.6) (参考文献 32) を用いて検索を行った。その結果、いずれも既知毒素との間に構造相同性は認められなかった。

mCry3A たん白質及び PMI たん白質のマウスの単回投与毒性試験を行った結果、mCry3A たん白質では最大投与量 2,377mg/kg、PMI たん白質では最大投与量 3,030mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった。

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

(1) 人工胃液に対する感受性

MIR604 由来の mCry3A たん白質及び *E. coli* 過剰発現系で発現させた mCry3A たん白質を人工胃液で処理し、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行ったところ、いずれも試験開始後 2 分以内に検出限界以下に消失することが確認された。また、*E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質を人工胃液で処理し、SDS-PAGE 及び酵素活性分析を行ったところ、試験開始後 2 分以内に検出限界以下に消失することが確認され、酵素活性は反応開始後 10 分以内に消失することが確認された。なお、酵素活性分析は、マンノース 6-リン酸を加えた PMI 活性検定反応液中で生じる NADPH の産出量を 340nm の吸光度で測定した。

(2) 人工腸液に対する感受性

mCry3A たん白質は、トリプシン又はキモトリプシン処理によって 55kDa のコアたん白質に消化されるが、このコアたん白質はほとんど消化されないことが明らかであることから、人工腸液を用いた消化試験は行わなかった。また、*E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質を人工腸液で処理し、SDS-PAGE 分析を行ったところ、試験開始後 2 分で検出限界以下に消失することが確認された。

(3) 加熱処理に対する感受性

4、25、37、65、95°Cで 30 分間の加熱条件により処理した *E. coli* 過剰発現系で発現させた mCry3A たん白質 (4.0mg/mL) について、ウエスタンコーンルートワームの 1 齢幼虫を用いた生物検定を行ったところ、95°C、30 分間の加熱処理ではほぼ殺虫活性が失われ、変性することが確認された。また、25、37、55、65、95°Cで 30 分間の加熱条件により処理した *E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質

268 (0.44mg/mL) について、酵素活性検定を行ったところ、65°C、30 分間の加熱処理
269 でほぼ酵素活性が失われ、変性することが確認された。

270

271 4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

272 mCry3A たん白質は酵素活性を待たず、宿主の代謝系と独立して機能していること
273 から、植物の代謝系に影響を及ぼさないと考えられた。また、PMI たん白質は、マン
274 ノース 6-リン酸とフルクトース 6-リン酸を可逆的に相互変換する触媒酵素たん白質
275 であり、その反応は両物質に対して特異的で、PMI たん白質に対する他の天然基質は
276 知られていない（参考文献 33）。

277

278 5 宿主との差異に関する事項

279 MIR604、対照の非組換えトウモロコシを用いて、穀粒中の主要構成成分（水分、た
280 ん白質、脂質、灰分及び炭水化物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デター
281 ジェント繊維（NDF）、総食物繊維（TDF）、粗繊維、ミネラル（リン、カルシウム、
282 銅、鉄、マグネシウム、マンガン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、クロム、セレン）、
283 アミノ酸、脂肪酸、ビタミン類、フィチン酸、トリプシンインヒビター、イノシトール、
284 ラフィノース、フルフラール、p-クマル酸、フェルラ酸、フィトステロール（コ
285 レステロール、カンペステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール）の分
286 析を行った。また、茎葉中の主要構成成分（水分、たん白質、脂質、灰分及び炭水化
287 物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、総食物繊
288 維（TDF）、粗繊維及びミネラル（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、
289 リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、クロム、セレン）の分析を行った。

290 その結果、穀粒中の水分、たん白質、炭水化物、酸性デタージェント繊維（ADF）、
291 総食物繊維（TDF）、亜鉛、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、
292 アミノ酸（メチオニン、チロシン、アスパラギン、トレオニン、セリン、グルタミン、
293 アラニン、システイン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン）、脂
294 肪酸（ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸）、ビタミン類（ β -カ
295 ロテン、クリプトキサンチン、ビタミン B1、ビタミン B3、B6、 α -トコフェロール、
296 γ -トコフェロール）、フェルラ酸、p-クマル酸、カンペステロール、スチグマステ
297 ロールにおいて、MIR604 と非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認めら
298 れたが、それらの分析値は文献値の範囲内に収まっていた。また、茎葉中の銅、カリ
299 ウム、マグネシウムにおいて、MIR604 と非組換えトウモロコシとの間に統計学的有
300 意差が認められたが、比較に用いる文献値は見当たらなかった。

301

302 6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

303 米国で行われた MIR604 のほ場試験において、その生存・増殖能力は非組換え品種
304 と差異は認められなかった。

305

306 7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

307 上記 6 のとおり、MIR604 の生存・増殖能力は非組換えトウモロコシと差異は認め
308 られなかったことから、制限要因についても両者の間に変化はないと考えられた。

309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349

8 不活化法に関する事項

物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の散布）など、トウモロコシを枯死させる従来の方法によってMIR604は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局(FDA)に、平成17年2月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、平成19年1月に安全性が確認されている。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MIR604と既存のトウモロコシとの相違は、MIR604がコウチュウ目害虫抵抗性の性質を有する点のみであり、栽培方法は既存のトウモロコシと同様である。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

MIR604の種子の製法及び管理方法は、既存のトウモロコシと同じである。組換え体の各世代の種子は、シンジェンタシード社（米国）において保存されている。

第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、必要な試験の成績に関する事項該当しない。

IV 審議結果

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR604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、同第3条第1項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

1. Sekar, V., D. V. Thompson, M. J. Maroney, R. G. Bookland and M. J. Adang (1987) Molecular cloning and characterization of insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7036-7040.
2. OECD (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Publication No.6, 2002. ENV/JM/MONO(2002)25.
3. ILSI (2004) International Life Science Institute Crop Composition Database Version 2.0. <http://www.cropcomposition.org>.
4. USDA (2004) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=9673>.
5. Watson, S. A. (1987) Structure and Composition. In Corn: Chemistry and Technology. S. A. Watson and P. E. Ranstead (eds). American Association of

- 350 Cereal Chemists, Minnesota.
- 351 6. Souci, S. W., W. Fachmann and H. Kraut. (1994) Food Composition and
352 Nutrition Tables, 5th edition. CRC Press. Scientific Publishers Stuttgart.
- 353 7. Itoh, Y., J. M. Watson, D. Haas and T. Lesinger (1984) Genetic and molecular
354 characterization of the Pseudomonas plasmid pVS1. *Plasmid*, 11: 206-220.
- 355 8. Itoh, T. and J. Tomizawa (1978) Initiation of replication of plasmid ColE1
356 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. Cold Spring
357 Harbor Symposium on Quantitative Biology, 43: 409-418.
- 358 9. Hansen, G., A. Das and M. D. Chilton (1994) Constitutive expression of the
359 virulence genes improves the efficiency of plant transformation by
360 Agrobacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 7603-7607.
- 361 10. Murray, E. E., J. Lotzer and M. Eberle (1989) Codon usage in plant genes.
362 Nucleic Acid Research, 17: 477-498.
- 363 11. Chen, E. and C. Stacy (2003) Modified Cry3A toxins and nucleic acid
364 sequences coding therefore. WO Patent No. 03/018810.
- 365 12. Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen (2000) The use
366 of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic
367 maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell
368 Reports, 19: 798-803.
- 369 13. De Framond, A. J. (1991) A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*).
370 Cloning and characterization. FEBS, 290: 103-106.
- 371 14. Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail (1992). Maize
372 polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and
373 transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts
374 by electroporation. Plant Molecular Biology, 18: 675-689.
- 375 15. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman (1982)
376 Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. J. Molecular Applied
377 Genetics, 1: 561-573.
- 378 16. Miles, J. S. and J. R. Guest (1984) Nucleotide sequence and transcriptional
379 start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*.
380 Gene, 32: 41-48.
- 381 17. Hofmann, C., H. Vanderbruggen, *et al.* (1988) Specificity of *Bacillus*
382 *thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity
383 binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proc.
384 Natl. Acad. Sci. USA, 85: 7844-7848.
- 385 18. Van Rie, J., S. Jansens, *et al.* (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis*
386 delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border
387 membrane of the midgut of target insects. Eur. J. Biochem., 186: 239-247.
- 388 19. Ogiwara, K., L. Indrasith, *et al.* (1992) Processing of δ -endotoxin from
389 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of
390 various insect larvae. J. Invert. Pathol., 60: 121-126.

- 391 20. Knowles, B. H. and J. A. T. Dow (1993) The crystal δ -endotoxins of *Bacillus*
392 *thuringiensis*: Models for their mechanism of action in the insect gut.
393 BioEssays, 15: 469-476.
- 394 21. Knowles, B. (1994) Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis*
395 insecticidal δ -endotoxins. Advances in Insect Physiology, 24: 275-308.
- 396 22. Ge, A., D. Rivers, et al. (1991) Functional domains of *Bacillus*
397 *thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis*
398 *virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on Cry I A(c). J. Biol.
399 Chem., 266: 17954-17958.
- 400 23. Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal
401 δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. Nature, 353:
402 815-821.
- 403 24. Koller, C. N., L. S. Bauer and R. M. Hollingsworth (1992) Characterization
404 of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native
405 δ -endotoxin crystal. Biochemical and Biophysical Research Communications,
406 184: 692-699.
- 407 25. Slaney, A. C., H. L. Robbins and L. English (1992) Mode of action of
408 *Bacillus thuringiensis* toxin Cry IIIA: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa*
409 *decehlineata* and *Diabrotica undecimpunctata howardi*. Insect Biochem. Mol.
410 Biol., 22: 9-18.
- 411 26. Chen, X., M. Lee, et al. (1993) Site-directed mutations in a highly
412 conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition
413 of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. Proc. Natl. Acad. Sci.
414 USA, 90: 9041-9045.
- 415 27. Gazit, E. and Y. Shai (1993) Structural Characterization, Membrane
416 Interaction, and Specific Assembly within Phospholipid Membranes of
417 Hydrophobic Segments from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cytolytic
418 Toxin. Biochemistry, 32: 12363-12371.
- 419 28. Carroll, J., J. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie and D. J. Ellar
420 (1997). Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A
421 δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. J. Invert. Pathol.,
422 70: 41-49.
- 423 29. Schnepf E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.
424 R. Zeigler and D. H. Dean (1998) *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal
425 Crystal Proteins. Micro. Mol. Bio. Rev., 62: 775-806.
- 426 30. US EPA (1998) Reregistration eligibility decision; *Bacillus thuringiensis*
- 427 31. Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis and K. Matthews (2003) Are Bt crops
428 safe? Nature Biotechnology. 21: 9. 1003-1009.
- 429 32. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller
430 and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of
431 protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

- 432 33. Freeze, H. H. (2002) Phosphomannose isomerase. *In.*: Handbook of
433 glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K.
434 and Fukuda, M., Eds; Springer-Verlag, Tokyo and New York, pp.595-599.
- 435 34. Event MIR604 Flanking Sequences BLAST and ORF Analysis Amended Report No.2
436 35. Putative Open Reading Frame in the Maize Genomic Sequence Flanking the
437 Transgenic Insert in Event MIR604 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence
438 Homology with Known Toxins.
- 439 36. Putative Open Reading Frame in the Maize Genomic Sequence Flanking the
440 Transgenic Insert in Event MIR 604 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence
441 Homology with Known Allergens.