

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR162系統」に係る安全性確認(案)

I はじめに

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統（以下「MIR162」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）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名：チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMIR162系統

性質：チョウ目害虫抵抗性

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

MIR162 は、グラム陽性土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* AB88 株(以下「*B.t.* AB88 株」とする。)に由来する vip3Aa1 遺伝子の塩基配列を一部改変した改変 vip3A 遺伝子（以下「*mvip3A* 遺伝子」）を導入したトウモロコシである。*mvip3A* 遺伝子により、チョウ目害虫に対し高い殺虫活性を示す改変 Vip3A たん白質（以下「*mVip3A* たん白質」）を発現し、チョウ目害虫の被害を受けずに生育できるとされている。なお、MIR162 には、選抜マーカーとして大腸菌(*Escherichia coli*)K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子(以下「*pmi* 遺伝子」という。)が導入されている。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

宿主に用いられた植物は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ (*Zea mays* L.) でありデント種に属する。MIR162 に導入された、*mvip3A* 遺伝子は *B.t.* AB88 株に由来し、*pmi* 遺伝子は *E. coli* K-12 株に由来する。(参考文献 1、2)

(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は、世界各国において飼料として長期にわたり利用されている(参考文献 3、4、5)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

宿主であるトウモロコシ及び MIR162 の穀粒や茎葉における主要構成成分（たん白質、脂質、食物繊維、灰分、炭水化物）、2 次代謝産物（フェルラ酸、*p*クマル酸、フルフラール、イノシトール、フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター）の量は明らかになっている。(参考文献 6、7)

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MIR162 と既存のトウモロコシとの相違は、MIR162 が *mVip3A* たん白質の発現によりチョ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、MIR162 は既存のト

42 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（可食）部位、③家畜
43 等の摂取量、④調製及び加工方法について既存のトウモロコシと相違はない。

44
45 以上（1）～（4）により、MIR162 の飼料としての安全性を評価するために、既存のトウ
46 モ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。

47 48 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

49 MIR162 は、mVip3A たん白質を発現することにより、チョウ目害虫に対して抵抗性を示し、
50 トウモロコシに被害を及ぼすコーンイヤールーム等のチョウ目害虫に対し効果的な防除を行う
51 ことが可能となる。

52 53 3 宿主に関する事項

54 （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

55 宿主は、イネ科トウモロコシ (*Zea*) 属のトウモロコシ (*Zea mays* L.) でありデント種
56 に属する。

57 58 （2）遺伝的先祖に関する事項

59 一般には、紀元前 5000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられ、育種過程
60 において近縁野生種であるブタモロコシから派生したとする説が有力とされている（参考文
61 献 5、8、9）。

62 63 （3）有害生理活性物質の生産に関する事項

64 トウモロコシには、栄養学的に有害と考えられる有害生理活性物質の生産は知られていな
65 い（参考文献 7）。

66 67 （4）寄生性及び定着性に関する事項

68 トウモロコシが家畜等に寄生又は定着するという報告はされていない。

69 70 （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

71 トウモロコシに感染する病原体は知られているが（参考文献 10）、家畜等に対する病原
72 性は報告されていない（参考文献 11）。

73 74 （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

75 トウモロコシは栽培作物であり、自然環境で生存又は繁殖したという報告はされていない。

76 77 （7）有性生殖周期及び交雑性に関する事項

78 トウモロコシの栽培時期は品種、地域及び栽培形態によって異なるが、主に春に播種され
79 て秋に収穫される（参考文献 12）。

80 トウモロコシの近縁種はブタモロコシとトリプサカム属であるが、トウモロコシと自然交
81 雑可能なのはブタモロコシのみである（参考文献 10）。我が国ではブタモロコシは自生し
82 ていないので MIR162 との交雑性は考えられない。

- 83
- 84 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項
- 85 トウモロコシの栽培起源は、およそ紀元前 5000 年のメキシコあるいはグアテマラと考え
- 86 られ、現在、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で世界的に栽培されている（参考文献
- 87 5）。このような栽培の歴史を通じて、トウモロコシは世界的に飼料として利用されている。
- 88
- 89 (9) 飼料の安全な利用に関する事項
- 90 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。
- 91
- 92 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項
- 93 トウモロコシは、栽培作物として適するよう人為的に高度に改良された作物であり、自然
- 94 条件下で独自に自生し、増殖する能力は失われている（参考文献 9、10、8、12）。
- 95
- 96 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項
- 97 トウモロコシと交雑可能な近縁種はブタモロコシとトリプサカム属であるが、いずれも有
- 98 害生理活性物質の生産は報告されていない（参考文献 13、14）。
- 99
- 100 4 ベクターに関する事項
- 101 (1) 名称及び由来に関する事項
- 102 MIR162 の作出に用いた発現ベクター pNOV1300 の構築は、ベクター pSB12 に由来する
- 103 （参考文献 15）。
- 104
- 105 (2) 性質に関する事項
- 106 pNOV1300 の全塩基数は 14,405 bp であり、その塩基配列は明らかにされている。既知
- 107 の有害塩基配列を含まない（参考文献 16）。
- 108
- 109 (3) 薬剤耐性に関する事項
- 110 pNOV1300 には、抗生物質耐性マーカーとして *E. coli* Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が含まれ
- 111 ているが、MIR162 には、*aadA* 遺伝子は含まれていないことが確認されている。（参考文
- 112 献 17）
- 113
- 114 (4) 伝達性に関する事項
- 115 pNOV1300 には、伝達性に関与する *E. coli* の pUC19 由来の ColE1ori 及びバクテリオ
- 116 ファージラムダ由来の *cos* が含まれる。（参考文献 18、19、20）
- 117
- 118 (5) 宿主依存性に関する事項
- 119 pNOV1300 の伝達可能な宿主域は、*E. coli* のみであり、家畜等が宿主となることはない
- 120 と考えられる。
- 121
- 122 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項
- 123 MIR162 トウモロコシを作出するための発現ベクター pNOV1300 は pSB12 を基に、以

124 下の手順で作成した。初めに、pNOV200 由来の *pmi* 遺伝子発現カセットを pSB12 に挿入
125 することにより、pNOV2109 を構築(参考文献 15)。次に、ポリリンカーの開始位置を変更
126 するため、pNOV2109 にオリゴライゲーションを行い、pNOV3000 を構築。最後に、
127 pCIB9806 由来の *mvip3A* 遺伝子発現カセットを pNOV3000 に挿入することにより
128 pNOV1300 を構築 (参考文献 21)。

129

130 (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

131 pNOV1300 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入した。

132

133 5 挿入遺伝子に関する事項

134 (1) 供与体に関する事項

135 ①名称、由来及び分類に関する事項

136 *mvip3A* 遺伝子は土壤中に遍在するグラム陽性細菌である *B.t.* AB88 株の *vip3Aa1* 遺
137 伝子由来で、宿主であるトウモロコシでの発現を高めるために、シンジェンタシード社が
138 人工合成した改変遺伝子である(参考文献 1)。なお、Vip とは Vegative Insecticidal
139 Protein の略である。

140 *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ラーゼを
141 コードする *manA* 遺伝子である(参考文献 2、22)。

142

143 ②安全性に関する事項

144 *mvip3A* 遺伝子の供与体である *B.t.* AB88 株に対する家畜等の食経験はないが、微生物
145 農薬の基材として長期に利用されており、家畜等に対する病原性は報告されていない。

146 *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* は自然界や動物の消化器官に広く存在していること
147 が知られており、これまで家畜等は飼料を通じて間接的に摂取している。また、*pmi* 遺
148 伝子の供与体である *E. coli* K-12 株について、動物に対する毒性は否定されている(参考
149 文献 23、24、25、26)。

150

151 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

152 pNOV1300 は pSB12 に、*pmi* 遺伝子発現カセット及び *mvip3A* 遺伝子発現カセットを
153 導入して作成された。宿主への導入方法にはアグロバクテリウム法が用いられ、導入後は
154 マンノースを添加した培地で形質転換体を選抜した (参考文献 16)。

155

156 (3) 構造に関する事項

157 *mvip3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは ZmUbiInt
158 プロモーターである (参考文献 27)。

159 *mvip3A* 遺伝子発現カセットのターミネーターはカリフラワーモザイクウイルスの 35S
160 RNA 由来のポリアデニル化シグナルを含む 35S ターミネーター(参考文献 28)であり、*pmi*
161 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rizobium radiobacter* (*Agrobacterium*
162 *tumefaciens*)の *nopaline synthase* 遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む NOS ター
163 ミネーター(参考文献 29)である。

164 *mvip3A* 遺伝子発現カセットには、*mvip3A* 遺伝子の発現量を高めるために、トウモロ
 165 コシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列が用い
 166 られている(参考文献 30)。

167 ZmUbiInt プロモーター、35S ターミネーター、iPEPC9 及び NOS ターミネーターの塩
 168 基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない(参考文献 21)。

169

170 (4) 性質に関する事項

171 表 1 にまとめた(参考文献 16)。

172

173

表 1 発現ベクター pNOV7013 の各構成 DNA の由来及び機能

構成 DNA	由来及び機能
<i>mvip3A</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域(1,010 bp)までを含む単 子葉植物用プロモーター配列(参考文献 27)。
<i>mvip3A</i>	<i>B.t</i> AB88 株から見出された <i>vip3Aa1</i> 遺伝子(参考文献 1)を改変した遺伝子。 <i>mvip3A</i> 遺 伝子はトウモロコシにおける発現に最適なコドンに変更・置換されている(参考文献 28)。 <i>vip3Aa19</i> 遺伝子にコードされる mVip3A たん白質は、 <i>vip3Aa1</i> 遺伝子にコードさ れる Vip3Aa1 たん白質とは 284 番目のアミノ酸が異なる。 <i>vip3Aa1</i> 遺伝子は 284 番目 のアミノ酸としてリシンをコードするが <i>mvip3A</i> 遺伝子は 284 番目のアミノ酸としてグ ルタミンをコードする。Vip3Aa たん白質はいくつかのチョウ目昆虫に抵抗性を持つ。
iPEPC9	トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン#9 配列(参考文献 30)。
35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA 由来の転写終結を指令するポリアデニル化シ グナルを含む配列(参考文献 28)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域(1,010 bp)までを含む単 子葉植物用プロモーター配列(参考文献 27)。
<i>Pmi</i>	<i>E. coli</i> K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子で(参考文献 22)、形質転換体の選抜マーカーであるマ ンノースリン酸イソメラーゼ(phosphomannose isomerase)をコードする(参考文献 2)。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)の nopaline synthase 遺伝子由来の転写終結を指令する ポリアデニル化配列(参考文献 29)。

174

175 (5) 純度に関する事項

176 pNOV1300 は、その T-DNA の外骨格領域に細菌選抜マーカー遺伝子として *spedAaDA*
 177 遺伝子)を有しており、細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

178

179 (6) 安定性に関する事項

180 MIR162 の挿入遺伝子の安定性を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、挿
 181 入遺伝子が後代世代に安定して遺伝していることが示された(参考文献 16)。

182 また、MIR162 の 3 つの世代を用いて、各戻し交雑世代における挿入遺伝子の期待分離

183 比と実測値を比較した結果、挿入遺伝子はメンデルの分離法則に基づいて遺伝していること
184 が示された(参考文献 31)。

185

186 (7) コピー数に関する事項

187 サザンブロット分析の結果から、MIR162 における挿入遺伝子は、トウモロコシゲノム
188 の 1 ヶ所に存在し、発現可能な *mvip3A* 遺伝子と *pmi* 遺伝子から成る発現ベクター
189 pNOV1300 の完全な T-DNA 領域の 1 コピーであり、また、発現ベクター pNOV1300 の
190 外骨格領域は存在しないことが示された (参考文献 16、32)。

191 また、MIR162の挿入遺伝子の5'及び3'末端近傍配列を決定し、データベースを用いて相
192 同性検索を行った結果、既知のトウモロコシ内在性遺伝子が損なわれている可能性、並び
193 に、挿入遺伝子と5'及び3'末端近傍配列の接合部において新規の意図しないオープンリーデ
194 イングフレームが形成される可能性は、いずれも極めて低いと判断された。

195

196 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

197 複数の試験ほ場において栽培した MIR162 から、異なる生育時期における、葉、根、子
198 実(穀粒)及び植物体中の mVip3A たん白質及び PMI たん白質の発現量を ELISA 分析に
199 より確認した結果、生育期から収穫期までの生育ステージを通じた mVip3A たん白質の発
200 現量の平均分析値の範囲は、葉で 9.52~56.56 µg/g 新鮮重(13.88~148.21 µg/g 乾物重)、根
201 で 3.41~6.20 µg/g 新鮮重(12.57~33.33 µg/g 乾物重)、全植物体で 9.04~24.62 µg/g 新鮮重
202 (25.05~93.52 µg/g 乾物重)であり、また、成熟期から収穫期における穀粒では 27.23~
203 30.90 µg/g 新鮮重(33.57~45.72 µg/g 乾物重)であり、PMI たん白質は、葉で LOD~2.66
204 µg/g 新鮮重(LOD~12.85 µg/g 乾物重)、根で 0.30~0.75 µg/g 新鮮重(0.76~4.97 µg/g 乾物
205 重)、全植物体で 0.86~1.94 µg/g 新鮮重(1.92~8.99 µg/g 乾物重)であり、また、成熟期か
206 ら収穫期における穀粒では 0.60~1.51 µg/g 新鮮重(0.69~2.23 µg/g 乾物重)であった (参考
207 文献 33)。

208

209 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

210 pNOV1300 の外骨格領域には、*aadA* 遺伝子が含まれているが (参考文献 17)、
211 MIR162 には *aadA* 遺伝子を含む外骨格領域は存在しないことがサザンブロット分析によ
212 り確認されており、MIR162 には抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しない。

213

214 (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
215 事項

216 MIR162 の挿入遺伝子の 5'及び 3'末端近傍配列を決定し、データベースを用いて相同性
217 検索を行った結果、挿入遺伝子と 5'及び 3'末端近傍配列の接合部において新規の意図しな
218 いオープンリーディングフレームが形成される可能性は、いずれも極めて低いと判断され
219 た。

220

221 6 組換え体に関する事項

222 (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

223 MIR162 では、挿入された *mvip3A* 遺伝子と *pmi* 遺伝子によって、それぞれ mVip3A

224 たん白質と PMI たん白質が発現している。

225

226 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

227 ①mVip3A たん白質

228 mVip3A たん白質と既知毒性たん白質との構造相同性を確認するため、National
229 Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (参考文献 34)及
230 びblastp search program (version 2.2.6) (参考文献 35)を用いて検索を行った(参考文献
231 36、37)。その結果、mVip3A たん白質と有意な構造相同性を持つ既知毒素はないことが
232 示された (参考文献 38)。

233 加えて、マウスを用いた単回投与毒性試験 (正味投与量 : 1,250mg/kg) 及びほ乳動物
234 細胞を用いた細胞毒性試験 (最高暴露濃度 50,000ng/ml) も行われているが、mVip3A
235 たん白質に起因する毒性影響は認められなかった (参考文献 39、40)。

236

237 ②PMI たん白質

238 PMI たん白質と既知毒性たん白質との構造相同性について、mVip3A たん白質と同様
239 の手法を用いて評価した(参考文献 41、42、43、44)。その結果、PMI たん白質と有意な
240 構造相同性を持つ既知毒素はないことが示された (参考文献 45)。

241

242 (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

243 mVip3A たん白質及び PMI たん白質は MIR162 における産生量は極めて微量で、以下
244 の物理化学的処理に対する感受性評価試験等に必要な量を MIR162 から抽出することが極
245 めて困難であったため、*E. coli* 過剰発現系で産生・抽出したものを用いた (参考文献 46、
246 47)。

247 *E. coli* 過剰発現系由来の mVip3A たん白質及び PMI たん白質は、MIR162 で発現する
248 mVip3A たん白質及び PMI たん白質と同様の酵素活性、免疫学的反応を有していた (参考
249 文献 48)。したがって、以下の物理化学的処理に対する感受性評価試験や単回投与毒性試
250 験及び細胞毒性試験に、*E. coli* 過剰発現系由来の mVip3A たん白質及び PMI たん白質を
251 用いても、結果に影響を及ぼすことはない判断した。

252

253 ①人工胃液に対する感受性

254 (i) mVip3A たん白質

255 mVip3A たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウエスタ
256 ンブロット分析で評価した。その結果、反応開始 1 分後には完全な mVip3A たん白
257 質のバンドは検出されなくなった (参考文献 49)。

258

259 (ii) PMI たん白質

260 PMI たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を SDS-PAGE 分析によって評価した。
261 その結果、PMI たん白質は、反応開始直後から容易に分解され、標準よりも 1/1000
262 倍低いペプシン濃度の SGF 中でも 2 分間の反応で小さな断片に分解された。また、
263 1/10000 倍希釈のペプシン濃度の SGF を用いた経時的な消化実験においても、反応
264 開始 10 分後には小さな断片に分解され、反応開始 60 分後にはそれらの断片も検出さ

265 れなかった(参考文献 50)。

266
267 ②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素(パンクレアチン)処理

268 (i) mVip3A たん白質

269 mVip3A たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウエスタン
270 ブロット分析で評価した。その結果、約 89kDa の完全長 mVip3A たん白質は、反応
271 開始 5 分後に約 62kDa のポリペプチド断片に速やかに分解され、それ以降、約
272 55kDa のポリペプチド断片の分解物も生じる。両ポリペプチド断片は反応開始 48 時
273 間後でも検出され、人工腸液中では消化が進まないことが確認された(参考文献
274 51)。

275
276 (ii) PMI たん白質

277 PMI たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を SDS-PAGE 分析とウエスタンブ
278 ット分析で評価した。その結果、PMI たん白質は標準の SIF において、2 分間の反
279 応で容易に分解することが示された。さらに 1/10 倍の SIF 反応開始において、30 分
280 後には、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析の両方で、PMI たん白質に由
281 来するバンドは検出されなくなり、1/100 倍の SIF 反応開始において経時的(反応開始
282 0~30 分)に分解することが示された(参考文献 50、52)。

283
284 ③加熱処理

285 (i) mVip3A たん白質

286 加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、mVip3A たん白質は、120°C、
287 30 分間の処理で定量限界値以下になり、150 及び 170°C、30 分間の処理では検出さ
288 れなくなることが確認された(参考文献 53)。

289 (ii) PMI たん白質

290 加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、PMI たん白質は 95°C、30 分
291 間の処理で完全に失活することが確認された(参考文献 28、54)。

292
293 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

294 ①mVip3A たん白質

295 mVip3A たん白質が酵素活性を持つとは考えられておらず、宿主の代謝系と独立して機
296 能していることから、植物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。

297
298 ②PMI たん白質

299 *pmi* 遺伝子によって発現する PMI たん白質は、マンノース 6-リン酸とフルクトース 6-
300 リン酸を可逆的に相互変換する触媒酵素たん白質であり、その反応はマンノース-6-リン酸
301 とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、PMI たん白質に対する他の天然基質は知ら
302 れていない(参考文献 55)。

303
304 以上のことから、MIR162 における mVip3A たん白質及び PMI たん白質の発現が、宿主
305 植物の代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

306
307
308
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

(5) 宿主との差異に関する事項

2005 年に、MIR162 と非組換えトウモロコシについて成分分析を行った（参考文献 56）。栽培試験に供するため、MIR162 と自殖系統トウモロコシを交配して得られた F1 雑種と、MIR162 と同系統の非遺伝子組換えトウモロコシと自殖系統トウモロコシを交配して得られた F1 雑種を栽培し、それぞれ茎葉と穀粒を収穫した。

①穀粒、茎葉における主要構成成分及びミネラル成分の分析結果

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、たん白質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、総食物繊維、デンプン）及びミネラル成分（穀粒：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、セレンウム 茎葉：カルシウム、リン）の分析を行った。

穀粒における主要構成成分の分析の結果、灰分、中性デタージェント繊維（NDF）及びデンプンにおいて、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外の主要構成成分では統計学的有意差は認められなかった。茎葉における主要構成成分の分析の結果、中性デタージェント繊維（NDF）において、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外の主要構成成分では統計学的有意差は認められなかった。なお、穀粒及び茎葉で有意差が認められた成分も含め、全ての分析値は一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であった。

穀粒におけるミネラル成分の分析の結果、カルシウム、鉄及びリンにおいて、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外のミネラル成分では統計学的有意差は認められなかった。茎葉におけるミネラル成分の分析の結果、分析されたカルシウムとリンの両ミネラルにおいて、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。なお、穀粒及び茎葉で有意差が認められた成分も含め、全ての分析値は一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であった。

②穀粒におけるビタミン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析結果

穀粒のビタミン類（β-カロテン、葉酸、ビタミン B1、ビタミン B2、ナイアシン、ビタミン B6、ビタミン C、ビタミン E）、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析を行った。

ビタミン類の分析の結果、β-カロテン、ビタミン B6 及びビタミン E において、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外のビタミン類では統計学的有意差は認められなかった。なお、有意差が認められた成分も含め、全ての分析値は一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であった。

アミノ酸組成の分析の結果、全ての分析アミノ酸において、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差は認められなかった。

脂肪酸組成の分析の結果、リノール酸及びリノレン酸において、MIR162 と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められたが、それ以外の脂肪酸では統計学的有意差は認められなかった。なお、有意差が認められた成分も含め、全ての分析値は一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であった。

346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386

③穀粒における2次代謝産物及び抗栄養素の分析結果

穀粒の2次代謝産物及び抗栄養素（イノシトール、フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター、フェルラ酸、p-クマル酸、フルフラール）の分析を行った。

その結果、フェルラ酸とp-クマル酸において、MIR162と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められた。また、フルフラールは全ての分析値が定量限界値以下であり、さらに、ラフィノースの分析値の多くは定量限界値以下であった。なお、有意差が認められた成分も含め、全ての分析値は一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国で行われた野外ほ場試験を通じて、MIR162の生存・増殖能力(種子休眠性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性及び種子の生産量・脱粒性)は、非組換えトウモロコシと同程度であった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

MIR162の生殖・増殖能力は既存の非組換えトウモロコシと同様であると考えられる。

(8) 不活化法に関する事項

MIR162も既存の非組換えトウモロコシと同様に、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の使用)等、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

米国食品医薬品庁(FDA)より2007年8月に食品・飼料としての安全性が確認された。米国環境保護庁(EPA)より2004年5月にPMIタンパク質の許容値設定免除の承認を得た。また、2007年5月にmVip3Aタンパク質の許容値設定の免除の申請を行った。

カナダ食品検査庁(CFIA)へ2007年11月に飼料の安全性に係る承認申請を提出した。オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)より2009年2月に食品としての安全性が確認された。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MIR162と既存のトウモロコシとの相違は、MIR162にチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている点のみであり、栽培方法に関して既存のトウモロコシとの相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MIR162における種子の製法及び管理方法については、既存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。

387

388 IV 審議結果

389 チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び
390 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
391 を行って差し支えないと判断された。

392

393 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5389-5394.
- 2 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803.
- 3 FAO (2007) Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
<http://faostat.fao.org/>
- 4 配合飼料供給安定機構 (2006) <http://mf-kikou.lin.go.jp/seisan/seisan.htm>
- 5 農学大辞典 (1994) 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 養賢堂.
- 6 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.
- 7 White, P. J. and L. M. Pollak (1995) Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World*, 40: 756-762.
- 8 Galinat, W. C. (1988) The origin of corn. *In: Corn and corn improvement*. G.F Sprague and J.W. Dudley, Eds. Agronomy Monographs No.18; pp. 1-31. American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin.
- 9 菊池一徳 (1987) トウモロコシの生産と利用. 光琳.
- 10 OECD (2003) CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF *ZEAMAYS* SUBSP. *MAYS* (MAIZE). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27. Env/JM/MONO(2003)11.
- 11 Martelli, G.P. (2001) Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J. Plant Pathol.* 82:37-46.
- 12 畑作全書 (1981) 農文協会編. 農村漁村文化協会.
- 13 Sprague, G. F. and J.W. Dudley. (1988) The Origin of Corn pp.1-31: Corn and Corn Improvement Third Edition. Agronomy No.18 American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin
- 14 Watson, S.A. (1987) Structure and Composition. *In Corn: Chemistry and Technology*. S. A. Watson and P.E. Ranstead (eds). American Association of

Cereal Chemists, Minnesota.

- 15 Komari T, Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai 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 markers. *Plant J.* 10: 165-174.
- 16 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-130-07.
Study Title: Molecular Characterization of the Transgenic DNA in Event MIR162 Maize for Japan. (社内報告書)
- 17 Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 13: 7095-7106.
- 18 Itoh, T. and J. Tomizawa (1978) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 43: 409-418.
- 19 Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., and Petersen, G. B. (1982). Nucleotide Sequence of Bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162, 729-773.
- 20 Szybalski, E.H. and Szybalski, W. (1979). A Comprehensive Molecular Map of Bacteriophage Lambda. *Gene*, 7, 217-270.
- 21 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-142-07.
Study Title: Description of the Plasmid Lineage Leading to the Final Plasmid Used in the Transformation Resulting in Event MIR162 Maize, pNOV1300. (社内報告書)
- 22 Miles, J. S. and J. R. Guest (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.
- 23 Levy, S. B., Marshall, B., Rowse-Eagel, D. and Onderdonk, A. (1980) Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*, 209:391-394.
- 24 Muhldorfer, I. and Hacker, J. (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*, 16:171-81.
- 25 Smith, H. W. (1975) Survival of orally administered *E. coli* K-12 in alimentary tract of man. *Nature*, 255:500-502.
- 26 US EPA (1997) *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment.
www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm
- 27 Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689.
- 28 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21, 285-294.

- 29 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman (1982) Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Molecular Applied Genetics*, 1: 561-573.
- 30 Hudspeth, R.L. and Grula, J.W. (1989). Structure and expression of the maize gene encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 12, 579-589.
- 31 Strickberger, M. W. (1976) Probability and statistical testing. Genetics. (2nd ed., pp. 140-163). New York: Macmillan Publishing Company.
- 32 Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P. & Scott, N.S. (1993) Repetitive DNA of grapevine: classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 173-180.
- 33 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-020-06.
Study Title: Quantification of Vip3Aa20 and Phosphomannose Isomerase (PMI) in Tissues of Maize Derived from Transformation Event MIR162. (社内報告書)
- 34 NCBI (2007) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- 35 Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
- 36 FARRP (2001) Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Database, version 1.02, www.allergenonline.com, last updated Feb. 12, 2002.
- 37 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-116-07.
Study Title: Vip3Aa20: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 38 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-102-07.
Study Title: Vip3Aa20: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
- 39 MIR162VIP3A-0106 Single Does Oral Toxicity Study In Mice AM7543/Regulatory/Report (社内報告書)
- 40 Customized Screening Report Prepared for: Syngenta Crop Protection, Inc. T/O 09-5832 June 9, 2009 (社内報告書)
- 41 Deacon, A., Y. Ni, W.G. Coleman Jr., and S.E. Ealick (2000). The crystal structure of ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase: catalysis with a twist. *Structure*, 8: 453-462.
- 42 Kneidinger, B., C. Marolda, M. Graninger, A. Zamyatina, F. McArthur, P. Kosma, M. Valvano, and P. Messner (2002). Biosynthesis pathway of ADP-L-glycero-β-D-manno-Heptose in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(2): 363-369.
- 43 Valvano, M.A., P. Messner, and P. Kosma (2002). Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated *glycerol-manno*heptose precursors of

- bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiology*, 148: 1979-1989.
- 44 Syngenta Seeds Biotechnology Report Report # SSB-117-07.
Study Title: Phosphomannose Isomerase Protein (Entrez Accession No. AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
 - 45 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-101-07.
Study Title: Phosphomannose Isomerase (Entrez Accession Number AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
 - 46 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-023-06.
Study Title: Characterization of Microbially-Produced Vip3A Test Substance MIR162VIP3A-0106 and Comparison with Vip3A Expressed in Event MIR162-Derived Maize (Corn). (社内報告書)
 - 47 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-037-06.
Study Title: Characterization of Phosphomannose Isomerase (PMI) Produced in Event MIR162 Maize and Comparison to PMI as Contained in Test Substance PMI-0198. (社内報告書)
 - 48 Markovitz, A., R. J. Sydiskis and M. Lieberman (1967) Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 94: 1492-1496.
 - 49 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-038-06.
Study Title: In vitro Digestibility of Vip3Aa20 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 - 50 Novartis Seeds Biotechnology Report No. NSB-002-99.
IN VITRO DIGESTIBILITY OF PMI PROTEIN UNDER SIMULATED MAMMALIAN GASTRIC AND INTESTINAL CONDITIONS.
 - 51 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-002-07.
Study Title: In vitro Digestibility of Vip3Aa20 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 52 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-106-07.
Study Title: In vitro Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance PMI-0198 Under Diluted Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 - 53 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-019-07. (社内報告書)
Study Title: Effect of Temperature on the Immunoreactivity of Vip3Aa20 Protein. (社内報告書)
 - 54 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-154-06.
Study Title: Effect of Temperature on the Stability of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance PMI-0198. (社内報告書)

- 55 Joersbo, M. (2001) Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic resistance marker genes. *Physiol. Plant.*, 111: 269-272.
- 56 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-146-06.
Study Title: Compositional Analysis of Grain and Forage Derived from Event MIR162 Hybrid Maize Grown During 2005 in the USA. (社内報告書)