

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

チョウ目害虫抵抗性 トウモロコシ MON95379 系統

令和 3 年 9 月 6 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.....	3
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項.....	3
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項.....	3
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項.....	3
	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.....	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
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.....	4
	(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.....	4
	(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.....	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.....	5
	(1) 名称及び由来に関する事項.....	5
	(2) 性質に関する事項.....	5
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.....	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
30	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	9
35	(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	10
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	10
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	10
	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
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	10
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	11
	(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
50	(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	12
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	12
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	12
	IV 審議結果	12
	V 参考文献及び参考資料	12

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 系統」
に係る安全性確認

I はじめに

60 チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 系統（以下「MON95379 系統」という。）について、令和 3 年 5 月 26 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。

65 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 MON95379 系統

性 質：チョウ目害虫への抵抗性を持つ。

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：バイエルグループ

70

MON95379 系統は、トウモロコシのデント種 LH244 系統に、*cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子を導入し作成された。

75 MON95379 系統に導入された *cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子は、Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質を発現しており、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。このことにより、トウモロコシ栽培における害虫防除を効果的に行うことを目的としている。

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

80 (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* subsp. *mays* (L.) *Illtis*) のデント種 LH244 系統である。

85 MON95379 系統には、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子が導入され、いずれもチョウ目に属する特定の昆虫に対する殺虫活性を発揮する。

(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もつ。

90

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON95379 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。

95 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON95379 系統は、導入された *cry1B.868* 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子によ

り、チョウ目害虫に抵抗性を持つ。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。

100 (1)～(4)により、MON95379 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

105 MON95379 系統で発現する Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質は、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。本系統は、チョウ目害虫による深刻な地域において効果的な害虫防除方法を農家に提供する目的として作出された。

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

110 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 LH244 系統のデント種である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

115 トウモロコシの遺伝的先祖は *Zea* 属のテオシント (*Z. mays* subsp. *mexicana*) で、人為的選抜を経て栽培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

120 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、リン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)。

125

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

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。

(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

130 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

135 トウモロコシは栽培作物であり、雑草性は極めて低い。なお、我が国においても自生するとの報告はない。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

140 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 (*Zea*
属) 及びトリプサカム (*Tripsacum* 属) があるが、テオシントはわが国において自
生するとの報告はなく、また、トリプサカムとトウモロコシの交雑は非常に困難
145 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

150 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、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

155 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

160 トウモロコシは成長点が地上に出た 5~7 葉期に 6~8 時間以上、0℃以下の外気
にさらされると生存できない(OECD, 2003)。また、種子の休眠性は低い(CFIA,
1994)。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)。仮に、自
生したとしても、鍬や感受性を示す除草剤による物理的又は科学的な方法により
防除することができる(OECD, 2003)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

165 トウモロコシの近縁種としてテオシント (*Zea* 属)及びトリプサカム(*Tripsacum*
属)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

170 (1) 名称及び由来に関する事項

MON95379 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMIR522223 は、
Escherichia coli 由来のプラスミド pBR322などを基に作成された。

(2) 性質に関する事項

175 導入用プラスミド PV-ZMIR522223 の塩基数は 21,637 bp である。また、プ
ラスミド PV-ZMIR522223 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。

- 180 (3) 薬剤耐性に関する事項
 導入用プラスミド PV-ZMIR522223 の外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
 185 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、MON95379 系統のゲノム DNA 中に *aadA* 遺伝子を含む外骨格領域が挿
 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。
- 190 (4) 伝達性に関する事項
 導入用プラスミド PV-ZMIR522223 には伝達を可能とする配列は含まれていな
 い。
- 195 (5) 宿主依存性に関する事項
 導入用プラスミド PV-ZMIR522223 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-ZMIR522223 が、植物や家畜等で複製されることはない。
 さらに導入遺伝子の解析の結果、MON95379 系統中には、これらの領域を含む外
 200 骨格領域は導入されていないことが確認されている。
- 205 (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-ZMIR522223 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などを
 基に作成された。
- (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-ZMIR522223 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

210 (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
T-DNA 領域		
B-Left Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。

T- <i>TubA</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Jeon et al., 2000)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
CS- <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</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 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis 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 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
P- <i>TubA</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター、5'末端非翻訳領域及びイントロンの配列 (Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
T- <i>Ltp</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	脂質輸送たん白質様 (<i>Lipid Transfer Protein-like, LTP</i>) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931404)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)
CS- <i>cry1B.868</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cry1Be たん白質のドメイン I 及び II、Cry1Ca たん白質のドメイン III、Cry1Ab たん白質の C 末端ドメインから構成されるキメラたん白質 Cry1B.868 をコードする配列で、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Wang et al., 2019)。
P- <i>Zm.Ubq</i>	テオシント (<i>Zea mays</i> subsp. <i>Mexicana</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配列 (GenBank Accession: MH931399)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Cornejo et al., 1993)。
P- <i>Tip</i>	アワ (<i>Setaria italica</i>)	液胞膜内在性たん白質 (<i>tonoplast membrane integral protein, Tip</i>) 遺伝子のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931400)。植物細胞における転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
I- <i>Act15</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	アクチン 15 (<i>Act15</i>) 遺伝子のイントロン及び隣接する非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: MH931405)。目的遺伝子の発現制御に関わる

		(Rose, 2008)。
CS-改変 <i>cry1Da</i>	<i>B. thuringiensis</i>	改変 <i>Cry1Da</i> たん白質をコードする配列で、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Wang et al., 2019)。
T- <i>GOS2</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	転写開始因子をコードする <i>GOS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931403)、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。

215 ② 安全性に関する事項

cry1B.868 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は、土壌中に遍在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等への病原性は報告されていないことから、この供与体は家畜等の健康に悪影響を与えるものではないとされた。

220

(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-ZMIR522223 を含む *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) と共置培養することにより、グリホサート存在下で形質転換を行った。

225

その後、選抜マーカーカセット (*cp4 epsps*) を含む形質転換個体を選抜し、*Cre* リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統 (LH244*Cre* 系統) と交配させ、選抜マーカーカセットをもたない個体を選抜し、その後の世代で *Cre* リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した。

230

(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 *cry1B.868* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセットには、それぞれテオシント及びアワ由来のプロモーターが使用されている

235

② ターミネーターに関する事項

導入された *cry1B.868* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Da* 遺伝子発現カセットには、イネ由来のターミネーターが使用されている。

240

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-ZMIR522223 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

245 以下に各遺伝子の機能を示す。

cry1B.868 遺伝子及び改変 *cry1Da* 遺伝子

250 それぞれ Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da を発現し、どちらも Cry たん白質に属する。この Cry たん白質の働きにより昆虫消化管の生理条件下で、結晶封入体からプロトキシン（毒前駆体）として可溶化する。プロトキシンは、消化管のたん白質分解酵素により部分的に分解され、殺虫活性をもつたん白質分解酵素耐性のコアたん白質へ変換される。コアたん白質は、昆虫の消化管の細胞膜で特異的受容体へ結合し、小孔を形成することで細胞溶解を引き起こし、その結果として消化管組織に損傷を与え殺虫活性を示す(Deist et al., 2014)。これまで Cry たん白質に対する特異的受容体は昆虫及び線虫以外からは同定されていない(OECD, 2007)。

255 Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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_2020 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、Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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。

260

(5) 純度に関する事項

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ている。

265

(6) コピー数に関する事項

270 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、MON95379 系統のゲノム中には、導入用プラスミド PV-ZMIR522223 の T-DNA 領域が 1 ヶ所に 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-ZMIR522223 に由来する非意図的な配列が存在しないこと、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統 (LH244Cre 系統) 中の導入用プラスミド PV-ZMOO513462 に由来する配列が存在しないこと、導入用プラスミド PV-ZMIR522223 の T-DNA 領域の塩基配列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確認された。

275

(7) 安定性に関する事項

280 MON95379 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。

また、複数世代にわたる Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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

285 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、MON95379 系統 5 世代では
発現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

290 MON95379 系統における Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質の発
現量を、葉、根、花粉、地上部及び穀粒を用いて、ELISA 法により測定した。そ
の結果、Cry1B.868 たん白質は全てにおいて発現しており、特に葉において、最
も高い発現量が確認された。一方、改変 Cry1Da たん白質は、葉、根、地上部及
び穀粒で発現しており、特に葉において、最も高い発現量が確認された。

295 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR522223 には、*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外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
300 ている。

なお、MON95379 系統中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、次世代シ
ークエンス解析により確認されている。

305 (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

MON95379 系統に挿入された DNA 配列及びその境界領域で、6 つの読み枠に
おいて ORF を検索した。その結果 12 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。

310 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

MON95379 系統に導入された *cry1B.868* 遺伝子は及び改変 *cry1Da* 遺伝子はそ
れぞれ Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質を発現し、チョウ目害虫抵
抗性を付与する。この点を除けば、MON95379 系統は既存種とその形態及び生育
315 特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

MON95379 系統の Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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_2020 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、
320 Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質において相同性を示す配列は確認
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

- 325 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。
- 330 Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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、*B. thuringiensis* で発現させた Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da 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℃、15 分以上で免疫反応性を失うことが確認された。なお、*B. thuringiensis* で発現させた Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質は、MON95379 系統中で発現する Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質と同等であることを確認済みである。
- 335
- （4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項
- Cry1B.868 たん白質及び改変 Cry1Da たん白質が、何らかの酵素活性をもつという報告はない。したがって、MON95379 系統がこれらのたん白質の発現により、
- 340 新しい代謝経路及び代謝産物を作ることは考えにくい。
- （5）宿主との差異に関する事項
- MON95379 系統及び対照の非組換えトウモロコシの穀粒及び地上部について、粗たん白質、アミノ酸、粗脂肪、脂肪酸、炭水化物、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、MON95379 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。
- 345
- 350
- （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ほ場試験において、MON95379 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。
- 355
- （7）生存及び増殖能力の制限に関する事項
- MON95379 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
- 360 MON95379 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
- 365 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 申請中 (2020 年 2 月)	HC 申請中 (2020 年 2 月)	CFIA 申請中 (2020 年 2 月)
米国	FDA 申請中 (2020 年 8 月)	FDA 申請中 (2020 年 8 月)	USDA 申請中 (2020 年 7 月)
欧州	EFSA 申請中 (2020 年 11 月)	EFSA 申請中 (2020 年 11 月)	EFSA 申請中 (2020 年 11 月)
ブラジル	CTNBio 承認 (2020 年 12 月)	CTNBio 承認 (2020 年 12 月)	—
オーストラリア・ ニュージーランド	—	FSANZ 申請中 (2021 年 4 月)	—

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
従来のトウモロコシと相違ない。

370 (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
375 該当しない。

IV 審議結果

380 チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 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。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 385 1 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.
- 390 2 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.
- 3 3 Betz, F.S., B.G. Hammond and R.L. Fuchs. 2000. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regulatory Toxicology and Pharmacology 32: 156-173.
- 395 4 Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo and M.

- Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnology 6: 17-26.
- 5 Bravo, A., S. Likitvivatanavong, S.S. Gill and M. Soberón. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A story
400 of a successful bioinsecticide. Insect Biochemistry and Molecular Biology 41: 423-431.
- 6 CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- 405 7 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.
- 8 de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics 17: 193-199.
410
- 9 Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. Toxins (Basel) 6: 3005-3027.
- 10 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase:
415 Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.
- 11 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.
420
- 12 Gao, Y., K.J. Fencil, X. Xu, D.A. Schwedler, J.R. Gilbert and R.A. Herman. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F δ -endotoxin expressed in transgenic cotton plants. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 829-835.
- 425 13 Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology 37: 615-636.
- 14 Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. Nature Biotechnology 20: 575-580.
430
- 15 Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. Plant Science 217-218: 109-119.
- 435 16 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7: 907-919.

- 17 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
- 440 18 ILSI. 2019. Crop composition database, version 7. International life sciences institute.
<http://www.cropcomposition.org/> [Accessed January 25, 2019].
- 19 Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential
 445 expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiology* 123:
 1005-1014.
- 20 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.
- 450 21 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
 455 characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-
 163.
- 22 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature*
Methods 9: 357-359.
- 460 23 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.
 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.
- 465 24 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.
- 25 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing
 470 *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on
 Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for Economic
 Co-operation and Development, Paris, France.
- 26 OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of
 475 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.

- 27 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and
480 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.
- 485 28 Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA
(caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
- 29 Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office,
Washington, D.C.
- 490 30 Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in
Microbiology and Immunology* 326: 277-290.
- 31 Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant
495 genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.
- 32 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.
- 500 33 Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H.
Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and
Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
- 34 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the
505 origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181:
8-12.
- 35 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.
Pages 77-90 in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Cold Spring Harbor,
510 New York.
- 36 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of
Bacillus thuringiensis insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate
Pathology* 111: 1-12.
- 515 37 Wang, C., W. Li, C.R. Kessenich, J.S. Petrick, T.J. Rydel, E.J. Sturman, T.C. Lee, K.C. Glenn
and T.C. Edrington. 2018. Safety of the *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1A.105 protein:
Evidence that domain exchange preserves mode of action and safety. *Regul Toxicol Pharmacol*

99: 50-60.

520

525

530

535

540

545

550

555

38 Wang, Y., J. Wang, X. Fu, J.R. Nageotte, J. Silverman, E.C. Bretsnyder, D. Chen, T.J. Rydel, G.J. Bean, K.S. Li, E. Kraft, A. Gowda, A. Nance, R.G. Moore, M.J. Pleau, J.S. Milligan, H.M. Anderson, P. Asiimwe, A. Evans, W.J. Moar, S. Martinelli, G.P. Head, J.A. Haas, J.A. Baum, F. Yang, D.L. Kerns and A. Jerga. 2019. *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 Protein Interactions with Novel Receptors Allow Control of Resistant Fall Armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Applied and Environmental Microbiology 85: e00579-00519.

39 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.

40 Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant Genome 8: 1-15.

41 Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. Theoretical and Applied Genetics 107: 1157-1168.

42 財務省 2020 財務省貿易統計 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>) [Accessed November 17, 2020]

43 食品安全委員会 2016 遺伝子組換え食品等評価書 チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統 評価結果通知日 2016 年 8 月 30 日 <http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20160419015&fileId=201>

44 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）

1 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR522223

2 Characterizing the Activity Spectrum of Cry1B.868 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000610)

3 Characterizing the Activity Spectrum of Cry1Da_7 Against a Range of Invertebrate Taxa (TRR0000609)

- 4 Updated Bioinformatics Evaluation of Cry1Da_7 and Cry1B.868 in MON 95379
560 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (TRR0000118)
- 5 Amended from MSL0030839: Molecular Characterization of Insect Protected Maize
MON 95379 (TRR0000070)
- 565 6 Amended From TRR0000121: Updated Bioinformatics Evaluation of MON 95379
Utilizing the EST_2020, NT_2020, and NR_2020 Databases (TRR0000598)
- 7 Demonstration of the Presence of Cry1Da_7 and Cry1B.868 Proteins in Maize Seed
Samples across Multiple Generations of MON 95379 (MSL0030807)
570
- 8 Assessment of Cry1B.868 and Cry1Da_7 Protein Levels in Leaf, Root, Pollen,
Forage and Grain Tissues Collected from MON 95379 Produced in United States
Field Trials During 2018 (TRR0000556)
- 575 9 Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in
MON 95379 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases
(TRR0000119)
- 10 Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in MON 95379 Utilizing the
580 AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (TRR0000120)
- 11 Amended Report for MSL0030779: Characterization of the Cry1B.868 Protein
Purified from the Maize Grain of MON 95379 and Comparison of the
Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Bacillus*
585 *thuringiensis* (*Bt*)-Produced Cry1B.868 Proteins (TRR0000416)
- 12 Characterization of the Cry1Da_7 Protein Purified from the Maize Grain of
MON 95379 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of
the Plant-Produced and *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)-Produced Cry1Da_7 Proteins
590 (MSL0030547)
- 13 Amended Report for MSL0030730: Assessment of the *in vitro* Digestibility of
Cry1B.868 Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0000667)

- 595 14 Assessment of the *in vitro* Digestibility of Cry1Da_7 Protein by Pepsin and
Pancreatin (MSL0030568)
- 15 The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-
produced Cry1B.868 Protein (MSL0031013)
- 600 16 Amended Report for MSL0031014: The Effect of Heat Treatment on the
Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1Da_7 Protein
(TRR0000145)
- 605 17 Amended Report for MSL0029995: Compositional Analyses of Maize Grain and
Forage Harvested from MON 95379 Grown in the United States During the 2018
Season (MSL0030947)
- 18 プラスミド PV-ZMOO513642 の構成要素