

**組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認
(案)**

**コウチュウ目害虫抵抗性及び
除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP23211)**

**令和 3 年 7 月 26 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	9
（３）構造に関する事項	9
（４）性質に関する事項	9
（５）純度に関する事項	10
（６）コピー数に関する事項	10
（７）安定性に関する事項	11
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	11
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	11
（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	11
6 組換え体に関する事項	11
（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	11
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	12
（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	12
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	13
（５）宿主との差異に関する事項	13
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	13
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	13
（８）不活化法に関する事項	13
（９）外国における認可等に関する事項	14
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項	14
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項	14
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	14
IV 審議結果	14
V 参考文献及び参考資料	14

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)」
に係る安全性確認

I はじめに

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)
(以下「DP23211 トウモロコシ」という。) について、令和 3 年 1 月 29 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：コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP23211)

性質：コウチュウ目害虫及び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・ハイブレット・インターナショナル社

DP23211 トウモロコシは、トウモロコシのデント種 PHR03 系統に、*DvSSJ1* 遺伝子断片、*ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子を導入し作成された。*DvSSJ1* 遺伝子断片は、*Diabrotica virgifera virgifera* (ウェスタンコーンルートワーム) 由来の *DvSSJ1* 遺伝子の部分配列であり、*DvSSJ1dsRNA* を発現させることで、標的害虫の中腸上皮において RNAi を誘導し内在の *DvSSJ1* たん白質の産生を抑制する。また、*ipd072Aa* 遺伝子により発現する IPD072Aa たん白質は、標的害虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。さらに、*pat* 遺伝子により発現する PAT たん白質により、除草剤グルホシネートの阻害を受けず正常に生育することが出来る。

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 PHR03 系統である。

DP23211 トウモロコシには、コウチュウ目害虫への耐性を付与するため、*D. virgifera virgifera* (ウェスタンコーンルートワーム) 由来の *DvSSJ1* 遺伝子の部分配列及び *Pseudomonas chlororaphis* 由来の *ipd072Aa* 遺伝子が導入されている。また、除草剤グルホシネートへの耐性を付与するため *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。さらに選抜マーカーとして *Escherichia coli* 由来の *pmi* 遺伝子を導入している。

- 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。
- (3) 飼料の構成成分等に関する事項
- 45 DP23211 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 DP23211 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。
- (1) ～ (4) より、DP23211 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。
- 55
- 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項
- DP23211 トウモロコシは、コウチュウ目害虫耐性及び、除草剤グルホシネート耐性を付与し効率的に害虫及び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* ssp. *mays* (L.) Iltis)の非組換え品種 PHR03 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
- (4) 寄生性及び定着性に関する事項
- 80 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。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

110 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℃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, 115 2001)。

(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 DP23211 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP74643 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。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。

(2) 性質に関する事項

130 導入用プラスミド PHP74643 の塩基数は 71,116bp である。プラスミド PHP74643 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、既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

135 導入用プラスミド PHP74643 の外骨格領域には、微生物を用いて当該プラスミドを増殖させる際に用いた抗生物質スペクチノマイシン耐性 (*spc*) 遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*) が含まれている。これらの遺伝子を含む外骨格領域は DP23211 トウモロコシ中に導入されていないことが確認されている。

(4) 伝達性に関する事項

140 導入用プラスミド PHP74643 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。

(5) 宿主依存性に関する事項

145 導入用プラスミド PHP74643 の外骨格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、植物、家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。さらに DP23211 トウモロコシ中には、これらの領域を含む外骨格領域は導入されていないことが確認されている。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

150 導入用プラスミド PHP74643 は、それぞれアグロバクテリウム(*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*))由来のプラスミド pTi 及び pSB1 を基に作製された。

(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

155 導入用プラスミド PHP74643 の宿主への導入は、ボンバードメント法及びアグロバクテリウム法により行った。詳細は 5 (2) に記載した。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

160 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>DvSSJ1dsRNA</i> 発現カセット		
<i>ubiZM1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Zea. mays</i>)	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>)	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>)	ユビキチン遺伝子のイントロン領域
<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片	ウェスタンコーン ルートワーム (<i>D. virgifera virgifera</i>)	Smooth Septate Junction 1 遺伝子の部分配列。本発現カセットにおいては、逆位に反復した 2 つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片がコネクター配列によって接続され、1 分子の RNA として転写される。
<i>zm-Adh1</i> Intron Connector	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	アルコール脱水素酵素遺伝子のイントロン 1 領域の部分配列。ループ配列として 2 つの <i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片を接続する。
<i>DvSSJ1</i> 遺伝子断片 (相補鎖)	<i>D. virgifera virgifera</i> 由来	<i>DvSSJ1</i> 遺伝子の部分配列の相補鎖。
Z27G ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) W64 系統	27-kDa ガンマゼイン遺伝子のターミネーター領域
<i>ipd072Aa</i> 遺伝子発現カセット		
BSV (AY) プロモーター	Banana streak virus (Acuminata Yunnan strain)	プロモーター領域
<i>zm-HPLV9</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	推定カルモジュリン 5 遺伝子のイントロン領域
<i>ipd072Aa</i>	<i>P. chlororaphis</i>	IPD072Aa たん白質をコードする遺伝子
<i>atT9</i> ターミネーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	マンノース結合たん白質スーパーファミリーに属する推定たん白質遺伝子のターミネーター領域
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>os-actin</i> プロモーター	イネ (<i>O. sativa</i>)	アクチン遺伝子のプロモーター領域
<i>os-actin</i> イントロン	イネ (<i>O. sativa</i>)	アクチン遺伝子のイントロン領域

構成要素	由来	機能
<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。
CaMV 35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルス	35S ターミネーター領域
<i>pmi</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>Zea. mays</i>)	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>)	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>)	ユビキチン遺伝子のイントロン領域
FRT1	出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)	由来の Flp リコンビナーゼ標的部位
<i>pmi</i>	大腸菌 (<i>E. coli</i>)	マンノースリン酸イソメラーゼ(PMI たん白質)をコードする遺伝子。
<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

165

② 安全性に関する事項

・ *DvSSJ1* 遺伝子断片の供与体である *D. virgifera virgifera* は、コウチュウ目ハムシ科に属する昆虫であり (Hu *et al.*, 2016)、動物に対する病原性は報告されていない。

170

・ *ipd072Aa* 遺伝子の供与体である *P. chlororaphis* は米国及び欧州で生物農薬として安全に使用されており、ヒト及び動物への病原性は認められていない (Anderson *et al.*, 2018)。

175

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

・ *pmi* 遺伝子の供与体である *E.coli* は哺乳類の腸に広く存在する。K-12 株は研究及び産業用途で安全に使用されており、ヒト及び動物への病原性は認められていない (US EPA, 1997)。

180

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

DP23211 トウモロコシは、プラスミド PHP56614 及び PHP74643 を用いて 2 段階で宿主へ目的遺伝子を導入している。DP23211 トウモロコシに導入した遺伝子は、*pmi* 遺伝子発現カセットの *ubiZM1* プロモーター及び *ubiZM1* 5'UTR、*ubiZM1* イントロンのみがプラスミド PHP56614 に由来し、その他の挿入遺伝子は全てプラスミド PHP74643 に由来する。プラスミド PHP56614 には、部位特異的組換えに用いるための標的配列（以下、「LP 配列」という。）及び LP 配列をトウモロコシゲノムに導入するためのエンドヌクレアーゼを発現させる配列が含まれている。

1 段階目でパーティクルガン法によりプラスミド PHP56614 を宿主へ導入した後、エンドヌクレアーゼの働きにより LP 配列を挿入した。その後、次世代シーケンサー解析を行い、意図したとおり LP 配列のみが導入された個体を中間系統として選抜した。

2 段階目でアグロバクテリウム法によりプラスミド PHP74643 を中間系統へ導入し、部位特異的組換えを利用して先に導入しておいた LP 配列の一部とプラスミド PHP74643 上の目的遺伝子を置き換えた。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

DvSSJ1dsRNA 発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ(*Z. mays*)由来の *ubiZM1* プロモーターが使用されている。また、*ipd072Aa* 遺伝子発現カセットには Banana Streak Virus の Acuminata Yunnan 株由来の BSV(AY) プロモーター、*pat* 遺伝子発現カセットにはイネ由来の *os-actin* 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

DvSSJ1dsRNA 発現カセットにはトウモロコシ(*Z. mays*)由来の Z27G ターミネーター、*ipd072Aa* 遺伝子発現カセットにはシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)由来の *at-T9* ターミネーター、*pat* 遺伝子発現カセットにはカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S ターミネーター、*pmi* 遺伝子発現カセットにはジャガイモ(*S. tuberosum*)由来の *pin II* 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

導入用プラスミド PHP74643 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。

・ *DvSSJ1* 遺伝子断片

DvSSJ1 遺伝子は *DvSSJ1* たん白質を発現する。当該たん白質は中腸上皮細胞の形態維持及び細胞間隙における水溶性物質の受動拡散を調節する機能を担

225 う。導入した *DvSSJ1* 遺伝子断片により DP23211 トウモロコシ中に *DvSSJ1dsRNA* を発現させることで、DP23211 トウモロコシを摂食した標的害虫の中腸上皮において RNAi を誘導し内在の *DvSSJ1* たん白質の産生を抑制する。これにより、標的害虫において *DvSSJ1* たん白質の機能が損なわれ生存不能となる。

・ *ipd072Aa* 遺伝子

230 IPD072Aa たん白質を発現する。当該たん白質は、標的害虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。なお、当該たん白質が標的としないチョウ目昆虫である *Ostrinia nubilalis* (ヨーロッパアワノメイガ) の中腸上皮細胞の受容体には結合しないことを確認した。また、ウェスタンコーンルートワームに殺虫活性を示す Bt たん白質 (*Cry34Ab1/Cry35Ab1* たん白質及び *Cry3Bb1* たん白質) に抵抗性を発達させたウェスタンコーンルートワームに対しても IPD072Aa たん白質が殺虫活性を示すことが確認された。

・ *pat* 遺伝子

240 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, 1999)。

・ *pmi* 遺伝子

245 PMI たん白質を発現させる。当該たん白質はマンノース-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。トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、PMI たん白質を産生する植物は炭素源としてマンノースを含む培地において生長することが可能なため、組換え植物の選抜マーカーとして用いられる (Negrotto *et al.*, 2000)。

250

(5) 純度に関する事項

255 導入用プラスミド PHP74643 の挿入 DNA 領域の塩基数は 13,876 bp であり、その塩基配列並びに構成要素の大きさ及び由来は明らかである。挿入しようとする全ての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

260 次世代シーケンサー及び Sanger 法による分析の結果、DP23211 トウモロコシのゲノム中には完全長の *DvSSJ1dsRNA* 発現カセット、*ipd072Aa* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 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。

また、導入用プラスミド PHP74643 に由来する非意図的な配列が存在しないこと、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

ことも確認された。

265

(7) 安定性に関する事項

DP23211 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。

270

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DP23211 トウモロコシにおける *DvSSJ1dsRNA* の産生量を、根、葉、花粉、植物体地上部及び種子を用いて QuantiGene Plex 2.0 法により測定した。また、IPD072Aa たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質の産生量を ELISA 法により測定した。その結果、PAT たん白質が完熟期の葉において定量下限値未満であった以外、いずれの RNA 及びたん白質も分析を行った全ての組織において産生が確認された。

275

280

(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 PHP74643 の外骨格領域には、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。これらのマーカー遺伝子については、次世代シーケンス分析により、DP23211 トウモロコシ中に組み込まれていないことが確認されている。

285

(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

DP23211 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 289 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。

290

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

DP23211 トウモロコシ中には、挿入された遺伝子により *DvSSJ1dsRNA*、IPD072Aa たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質が産生される。

DvSSJ1dsRNA は標的害虫の中腸上皮において RNAi を誘導し内在の *DvSSJ1* たん白質の産生を抑制する。また、IPD072Aa たん白質は、標的害虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。これらの働きによりコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す。

300

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て無毒化するため、DP23211 は除草剤グルホシネートの除草作用に対する耐性を示す。

PMI たん白質は選抜マーカーであり、マンノース-6-リン酸をフルクトース-6-リ

305 ン酸に変換するため、DP23211 はマンノースを炭素源とする選抜培地において生長することが可能である。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

310 IPD072Aa たん白質及び PAT たん白質と、既知毒性たん白質との相同性を検討するため、DuPont Pioneer 毒性たん白質データベースを用いて、BLASTP (version 2.2.26) によるアミノ酸配列検索を行った。また、PMI たん白質と既知毒性たん白質との相同性を検討するため、Entrez®たん白質データベース及び Syngenta 毒性たん白質データベースを用いて、BLASTP (version 2.2.26) によるアミノ酸配列検索を行った。

315 その結果、いずれのたん白質についても既知毒性たん白質との間に相同性は認められなかった。

 なお、*DvSSJ1* 遺伝子断片については、5'側及び 3'側に終止コドンが配置されていること及び *DvSSJ1* 遺伝子断片中に開始コドンが含まれていないことから、たん白質を産生する可能性は低いと考えられる。

320 *DvSSJ1*dsRNA の標的害虫に対する毒性については、ウェスタンコーンルートワーム及びコウチュウ目ハムシ科の近縁種 *Diabrotica undecim punctata* (サザンコーンルートワーム；ジュウイチホシウリハムシ) に対して殺虫活性が認められた。その他の主なコウチュウ目害虫及びチョウ目害虫については生存率に影響は認められなかった。

325 IPD072Aa たん白質の標的害虫に対する毒性については、ウェスタンコーンルートワームに対して殺虫活性が認められた。その他の主なコウチュウ目昆虫 10 種及びチョウ目昆虫 4 種については、生存率への影響は認められなかった。また、ハチ目、トビムシ目及びアミメカゲロウ目に属する非標的昆虫についても毒性試験を実施したが、いずれの昆虫についても生存率に影響は認められなかった。さらに、
330 マウスを用いた急性経口毒性試験においても、マウスの生存率、肉眼的病変及び体重への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

335 IPD072Aa たん白質について、消化性試験（人口胃液及び腸液）、加熱処理感受性試験を行った。その結果、消化性試験については 37℃の条件下でそれぞれ 30 秒後、20 分後には完全に消化されることが確認された。また、121℃の熱処理で非加熱対照の 5%に免疫反応性が低下することが確認された。なお、本試験には *E.coli* で生産した IPD072Aa たん白質を用いており、当該たん白質が DP23211 トウモロコシ由来のたん白質と同等であることは確認済みである。

340 PMI たん白質及び 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（PMI たん白質：トウモロコシ Event5307 系統、PAT たん白質：トウモロコシ DP-004114-3）、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。

345 *DvSSJ1* 遺伝子断片は *DvSSJ1*dsRNA を発現するが、新たなたん白質が産生されることは考えにくい。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

DvSSJ1dsRNA は、RNAi によりコウチュウ目害虫において中腸上皮細胞の形態維持及び細胞間隙における水溶性物質の受動拡散を調節する機能を破壊するが、トウモロコシにはそれらの機能が存在しないことから、トウモロコシの代謝系に影響を及ぼすことは考えにくい。

IPD072Aa たん白質のアミノ酸配列について、酵素たん白質を含めた既知のたん白質との相同性は認められなかった (Schellenberger *et al.*, 2016)。このことから、IPD072Aa たん白質が酵素活性を有する可能性は低く、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低い。

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。

PMI たん白質はマンノース 6 リン酸からフルクトース 6 リン酸への異性化反応を可逆的に触媒するが、マンノース 6 リン酸を炭素源として利用可能にすることを除き、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

DP23211 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つたが、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つた。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。

(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、DP23211 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。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

DP23211 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。

(8) 不活化法に関する事項

DP23211 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。

(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	FDA 申請中	FDA 申請中	USDA 申請中
カナダ	CFIA 承認 (2021 年 9 月)	HC 承認 (2021 年 9 月)	CFIA 承認 (2021 年 9 月)
オーストラリア・ ニュージーランド	—	FSANZ 承認 (2021 年 4 月)	—
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

DP23211 トウモロコシでは、発芽から生育期の栽培管理において、標的とする
コウチュウ目害虫の防除のための薬剤使用が軽減されうること及び除草剤グルホ
シネートによる雑草防除が可能なことを除き、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

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 PHR03
系統の種子及び試験に使用した DP23211 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。

IV 審議結果

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP23211)
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

- 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 Anderson, J.A., Staley, J., Challender, M. and Heuton, J. (2018). Safety of

Pseudomonas chlororaphis as a gene source for genetically modified crops. Transgenic Research. 27: 103-113.

420

3 Baum, J.A. and Roberts, J.K. (2014). Progress towards RNAi-mediated insect pest management. Advances in Insect Physiology. 47: 249-295.

425

4 Baxevanis, A.D. (2005). "Assessing pairwise sequence similarity: BLAST and FASTA". Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins, 3rd edition. Baxevanis, A.D. and Ouellette, B.F.F. eds. John Wiley & Sons, Inc. pp.295-324.

430

5 Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327-336.

435

6 Boeckman, C.J., Huang, E., Sturtz, K., Walker, C., Woods, R. and Zhang, J. (2019). Characterization of the Spectrum of Insecticidal Activity for IPD072Aa: A Protein Derived from *Psuedomonas chlororaphis* with Activity Against *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology. 112: 1190-1196.

440

7 Callis, J., Carpenter, T., Sun, C-W. and Vierstra, R.D. (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. Genetics. 139: 921-939.

445

8 Carlson, A.B., Mathesius, C.A., Ballou, S., Boeckman, C.J., Gunderson, T.A., Mirsky, H.P., Mukerji, P., Roe, J.C., Schmidt, J.M., Zhang, J. and Delaney, B. (2019). Safety assessment of coleopteran active IPD072Aa protein from *Psuedomonas chlororaphis*. Food and Chemical Toxicology. 129: 376-381.

450

9 CFIA. (1994). The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l/eng/1330985739405/1330985818367>) Accessed on January 29th, 2020.

455

10 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 site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression clones. Genome Research. 14: 2111-2120.

11 Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin genes:

- structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter
460 activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology.
18: 675-689.
- 12 CODEX. (2013). Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius
Commission. CODEX-STAN 210-1999.
- 465 13 Cong B, Maxwell C, Luck S, Vespestad D, Richard K, Mickelson J, 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 and Food Chemistry 63: 5321-5334.
- 470 14 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.
- 475 15 Das, O.P., Ward, K., Ray, S. and Messing, J. (1991). Sequence variation between
alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa Zein locus of maize.
Genomics. 11: 849-856.
- 16 de Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P. and Leite, A. (1994).
480 Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene from
sorghum. Molecular and General Genetics. 245: 177-186.
- 17 Dennis, E.S., Gerlach, W.L., Pryor, A.J., Bennetzen, J.L., Inglis, A., Llewellyn, D.,
Sachs, M.M., Ferl, R.J. and Peacock, W.J. (1984). Molecular analysis of the alcohol
485 dehydrogenase (*Adh1*) gene of maize. Nucleic Acids Research. 12(9): 3983-4000.
- 18 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982).
Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and
Applied Genetics 1: 561-573.
- 490 19 Dymecki, S.M. (1996). A modular set of FLP, FRT and lacZ fusion vectors for
manipulating genes by site-specific recombination. Gene. 171: 197-201.
- 20 Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Isolation and
495 characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of
its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. Molecular
and General Genetics. 205: 14-22.
- 21 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon

- 500 Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-
nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research. 13: 7095-7106.
- 22 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide
sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell. 21: 285-294.
- 505 23 Freeze, H. H. (2002). Phosphomannose isomerase. Handbook of glycosyltransferases
and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds.
Springer-Verlag, Tokyo and New York: pp. 595-599.
- 510 24 Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982).
Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and
characterization of transcripts. Cell. 30: 763-773.
- 25 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-
515 specific recombination. Genome Research. 10: 1788-1795.
- 26 Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K,
van der Klis R-J, Rouan D (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin
acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance
520 to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and
Pharmacology 41: 134-149.
- 27 Hershey, H.P. and Stoner, T.D. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones
for RNA species induced by substituted benzenesulfonamides in corn. Plant
525 Molecular Biology. 17: 679-690.
- 28 Hu, X., Richtman, N.M., Zhao, J.-Z., Duncan, K.E., Niu, X., Procyk, L.A., Oneal, M.A.,
Kernodle, B.M., Steimel, J.P., Crane, V.C., Sandahl, G., Ritland, J.L., Howard, R.J.,
Presnail, J.K., Lu, A.L. and Wu, G. (2016). Discovery of midgut genes for the RNA
530 interference control of corn rootworm. Scientific Reports. 6: 30542.
- 29 Hu, X., Steimel, J.P., Kapka-Kitzman, D.M., Davis-Vogel, C., Richtman, N.M.,
Mathis, J.P., Nelson, M.E., Lu, A.L. and Wu, G.S. (2019). Molecular characterization
of the insecticidal activity of double-stranded RNA targeting the smooth septate
535 junction of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). PLoS One. 14:
e0210491.
- 30 ILSI. (2019). International Life Sciences Institute Crop Composition Database
(Version 7.0).
540 (<https://www.cropcomposition.org/query/index.html>).

Accessed on October 17th, 2019.

- 31 Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C. and Olsen, O.-A.
(1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa
545 lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *The
Plant Journal*. 6: 849-860.
- 32 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system.
Expert Opinion on Drug Discovery. 2: 571-589.
- 550 33 Kay, R., Chan, A., Daly, M. and McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S
promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*. 236: 1299-
1302.
- 555 34 Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure
of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids
Research*. 14: 5641-5650.
- 560 35 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
markers. *The Plant Journal*. 10: 165-174.
- 565 36 Liu, H., Shi, J., Sun, C., Gong, H., Fan, X., Qiu, F., Huang, X., Feng, Q., Zheng, X.,
Yuan, N., Li, C., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, J., Pan, G., Han, B., Lai, J. and Wu, Y.
(2016). Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa γ -zein for endosperm
modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of
Sciences*. 113: 4964-4969.
- 570 37 Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M.-J., Scelonge, C.,
Lenderts, B., Chamberlin, M., Cushatt, J., Wang, L., Ryan, L., Khan, T., Chow-Yiu,
J., Hua, W., Yu, M., Banh, J., Bao, Z., Brink, K., Igo, E., Rudrappa, B., Shamseer, P.,
Bruce, W., Newman, L., Shen, B., Zheng, P., Bidney, D., Falco, C., Register, J., Zhao,
Z.-Y., Xu, D., Jones, T. and Gordan-Kamm, W. (2016). Morphogenic regulators *Baby*
575 *boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *The Plant Cell*. 28: 1998-2015.
- 580 38 Lundry DR, Burns JA, Nemeth MA, Riordan SG (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 Conventional Corn
(*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 1991-1998.

- 39 Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. *Cell*. 95: 805-815.
- 585
- 40 Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. and Hansen, G. (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.
- 590
- 41 農林水産省. (2013). コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統. (<https://search.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000097601>) Accessed on January 29th, 2020.
- 595
- 42 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. (<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
- 600
- Accessed on September 5th, 2019.
- 43 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. 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>).
- 605
- Accessed on September 5th, 2019.
- 44 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>).
- 610
- Accessed on September 5th, 2019.
- 615
- 45 Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of yeast *in vitro*. *Nucleic Acids Research*. 14: 4787-4802.
- 620
- 46 Schellenberger, U., Oral, J., Rosen, B.A., Wei, J.-Z., Zhu, G., Xie, W., McDonald, M.J., Cerf, D.C., Diehn, S.H., Crane, V.C., Sandahl, G.A., Zhao, J.-Z., Nowatzki, T.M., Sethi, A., Liu, L., Pan, Z., Wang, Y., Lu, A.L., Wu, G. and Liu, L. (2016). A selective insecticidal protein from *Pseudomonas* for controlling corn rootworms. *Science*. 354:

634-637.

- 625 47 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.
- 48 Timmons, L. and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*.
630 395: 854.
- 49 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.
- 635 50 戸澤英男. (2005). トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—. 農文協.
pp.56-59, p.99, p.122, p.257, pp.324-327.
- 51 US EPA (1997) *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. United
States Environmental Protection Agency,
640 (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra004.pdf>).
Accessed on February 12th, 2020.
- 52 Wasson-Blader, T. (2001). Living Colors™ DsRed2: Improved red fluorescent protein
for use in living cells. *Clontechiques*. 16: 2-3.
- 645 53 Watson, S.A. (1982). “Corn: amazing maize. general properties” . CRC handbook
of processing and utilization in agriculture. Volume II. Wolff, I.A. eds. CRC Press Inc.,
Boca Raton. pp.3-29.
- 650 54 Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A.
(1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyl transferase gene from
Streptomyces viridochromogenes Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*.
Gene. 70: 25-37.
- 655 55 Yanagihashi, Y., Usui, T., Izumi, Y., Yonemura, S., Sumida, M., Tsukita, S., Uemura,
T. and Furuse, M. (2012). Snakeskin, a membrane protein associated with smooth
septate junctions, is required for intestinal barrier function in *Drosophila*. *Journal of*
Cell Science. 125:1980-1990.
- 660 56 財務省. (2020). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on February 12th, 2020.

57 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes,
665 K.R., Richmond, T.A., Jeddeloh, 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.

58 Zhuang, J., Wang, J.-H., Zhang, X. and Liu, Z.-X. (2011). Molecular characterization
670 of banana streak virus isolate from *Musa Acuminata* in China. *Virologica Sinica*.
26(6): 393-402.

参考資料（申請者提出 社外秘）

675 1 Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing the Event DP-
Ø23211-2: U.S. and Canada Test Sites ().

2 トウモロコシ茎葉及び子実中の構成成分文献値一覧

680

3 Description and Sequence of the T-DNA Region from Plasmid PHP74643 ().

4 Description of Transformation Method and Familiarity of PAT and PMI Proteins for
685 Maize Event DP-Ø23211-2 ().

5 DP23211 の形質転換の概要.

6 IPD072AA PROTEIN BINDING SITES ().

690

7 Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-Ø23211-2 Maize
().

8 Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-Ø23211-2
695 Maize ().

9 Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-Ø23211-2
().

700 10 Characterization of DP-Ø23211-2 Maize for Insertion Stability in Five Generations
Using Southern Blot Analysis ().

11 DvSSJ1 double-stranded RNA Concentration of a Maize Line Containing Event DP-
Ø23211-2 US and Canada Test Sites ().

705

12 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-Ø23211-2: US and Canada Test Sites ().

710

13 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-Ø23211-2 ().

14 Comparison of the IPD072Aa Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database ().

715

15 Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the DuPont Pioneer Toxin Database ().

16 Phosphomannose Isomerase Assessment - Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins ().

720

17 DvSSJ1 LC₅₀ AND SPECTRUM ANALYSIS.

18 Comparison of the DvSSJ1 Fragment to a Variety of Farm and Companion Animal Transcriptome ().

725

19 Non-Target Organism Assessment of DP23211 Maize.

20 Characterization of IPD072Aa Protein Derived from a Microbial Expression System ().

730

21 Characterization of IPD072Aa Protein Derived from DP-Ø23211-2 Maize ().

735

22 Characterization of PAT Protein Derived from DP-Ø23211-2 Maize ().

23 Characterization of PMI Protein Derived from DP-Ø23211-2 Maize ().

740

24 Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of IPD072Aa Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis ().

745

25 Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of IPD072Aa Protein Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis ().

- 26 Characterization of the Effect of Heat Treatment on IPD072Aa Protein Using Enzyme Linked Immunosorbent (ELISA) Analysis ([REDACTED]).
- 750 27 *In Vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions ([REDACTED]).
- 755 28 *In Vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions ([REDACTED]).
- 760 29 Effect of Temperature on Phosphomannose Isomerase as Contained in Test Substance PMI-0105 as Assessed by Immunoreactivity ([REDACTED]).