

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 (DP51291)

**令和 5 年 10 月 25 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	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	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	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	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	8
（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	10
（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	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	11
（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	12
（５）宿主との差異に関する事項	12
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	12
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	12
（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	13
（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項	13
（11）種子の製法及び管理方法に関する事項	13
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	13
IV 審議結果	13
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（DP51291）」
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（DP51291）
（以下「DP51291 トウモロコシ」という。）について、令和5年6月21日付けで遺伝
5 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

10 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
（DP51291）

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・ハイブレッッド・インターナショナル社

15 DP51291トウモロコシは、トウモロコシのデント種PHR03系統に、*ipd072Aa*遺伝子、
*pat*遺伝子及び*pmi*遺伝子を導入し作成された。*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
20 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

25 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。

DP51291 トウモロコシには、*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
30 ている。さらに選抜マーカーとして *Escherichia coli* (K-12 株) 由来の *pmi* 遺伝
子を導入している。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

35 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

DP51291 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。

40

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

DP51291 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。

45

(1) ～ (4) より、DP51291 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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

50

DP51291 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。

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

55

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)のデント種の非組換え品種 PHR03 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

60

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)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

65

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)。

70

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

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。

75

(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

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。また、植物病原体の *Fusarium* spp.や、植物体を汚染する糸状菌の *Aspergillus flavus* 等

80

により生産されるカビ毒が家畜等へ悪影響を及ぼすことが知られているが、組換え体の作出には、このような汚染がされた宿主を用いることはない。

85 なお、組換え体の作出においては、培養過程での汚染防止策が確立されており、再生中の植物や幼植物体は無菌的に維持されている

(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

トウモロコシは栽培作物であり、雑草性は極めて低い。

90 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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、わが国においては、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。

110 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

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, 2001)。

115 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

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。

120

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 DP51291 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP74638 は、アグロバクテリウム(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*))等由来のプラスミド pSB1 を基に作製された。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 PHP74638 の塩基数は 66,641bp である。プラスミド PHP74638 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 PHP74638 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遺伝子 (*spc*) 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 DP51291 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 PHP74638 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 PHP74638 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 DP51291 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 PHP74638 は、アグロバクテリウム(*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*))等由来のプラスミド 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 PHP74638 の宿主への導入は、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>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</i> -HPLV9 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>at</i> -T9 ターミネータ ー	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis</i> <i>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</i> -actin プロモーター	イネ (<i>Oryza</i> <i>sativa</i>)	アクチン遺伝子のプロモーター領域
<i>os</i> -actin 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
<i>pat</i>	土壤中のグラム陽性 放線菌 (<i>Streptomyces</i> <i>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>ubi</i> ZM1 プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子のプロモーター領域
<i>ubi</i> ZM1 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>ubi</i> ZM1 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>Saccharomyces</i> <i>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>pin</i> II ターミネータ ー	ジャガイモ (<i>Solanum</i> <i>tuberosum</i>)	プロテアーゼインヒビターII 遺伝子(<i>pin</i> II) のターミネーター領域

② 安全性に関する事項

・ *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)。

・ *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)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

DP51291 トウモロコシは、1 段階目でプラスミド PHP50742、2 段階目で PHP46438、PHP5096、PHP16072、PHP21139 及び PHP31729 の 5 つのプラスミド、3 段階目で導入用プラスミド PHP74638 を用いて 3 段階で宿主へ目的遺伝子を導入している。PHP50742 は、部位特異的組換えの挿入標的配列 (以下、LP 配列という。) 含む DNA 配列を有する。PHP46438 は、*nptII* 遺伝子発現カセット及び *AmCyan1* 遺伝子発現カセットを含み、2 段階目の形質転換の選抜マーカーとして *nptII* 遺伝子の利用が可能となるとともに、3 段階目の形質転換の選抜マーカーとして *pmi* 遺伝子を再度利用することが可能となる。PHP5096 は FLP たん白質を産生する。FLP たん白質の働きにより、相同組換えが誘起されて LP 配列と挿入 DNA 領域が置換される。PHP16072 はリコンビナーゼである Cre たん白質を産生する。中間系統のゲノム DNA に挿入されている LP 配列中に 2 か所存在する標的配列 *loxP* の間で部位特異的組換えを誘導する。PHP21139 は WUS2 たん白質、PHP31729 は ODP2 たん白質を産生する。それぞれ形質転換における植物体の再生率向上を目的とする。PHP74638 は挿入 DNA 領域を含む。

1 段階目でアグロバクテリウム法により、プラスミド PHP50742 を宿主に導入することで、LP 配列を挿入した。次世代シーケンサー (Southern by Sequencing (以下「SbS」という)) による分析を行い、意図したとおり LP 配列のみが導入された個体を CTVA2023-1 系統 (以下「中間系統 1」という) とした。

2 段階目でパーティクルガン法によりプラスミド PHP46438、PHP5096、PHP16072、PHP21139 及び PHP31729 を中間系統 1 の細胞に導入した。このうち PHP46438 由来の DNA が、中間系統 1 の LP 配列中に部位特異的組換えにより挿入された。また PHP5096 は *Flp* 遺伝子発現カセットを含んでいるため、導入に伴い FLP たん白質が産生される。その結果、PHP46438 中の FRT1 及び FRT87 と、既に中間系統 1 のゲノムに挿入されている LP 配列中の FRT1 及び FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され、その結果、LP 配列中の *pmi* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットを含む領域が、プラスミド PHP46438 由来の *nptII* 遺伝子発現カセット及び *AmCyan1* 遺伝子発現カセット

205 を含む領域に置換される。なお、LP 配列に挿入した PHP46438 由来の DNA は全
て 3 回目の形質転換において LP 配列から除去されるため、DP51291 には残存し
ない。さらに、中間系統 1 に導入された PHP16072 から産生されるリコンビナー
ゼである Cre たん白質は、中間系統 1 のゲノム DNA に挿入されている LP 配列中
210 に 2 か所存在する標的配列 *loxP* の間で部位特異的組換えを誘導する。その結果、
2 か所の *loxP* の間に位置する *ip3-h5* 遺伝子発現カセットを含む領域が LP 配列か
ら除去される。また、PHP21139 及び PHP31729 から産生されるたん白質は形質
転換における植物体の再生率を向上させる。得られた形質転換体のうち、LP 配列
が意図したとおり改変され、かつ用いたプラスミド由来の意図しない DNA 断片が
含まれていない 1 個体を選抜し、CTVA2023-2 系統（以下「中間系統 2」とい
215 う）とした。なお、SbS 分析を行い、導入した 5 つのプラスミド由来の意図しな
い DNA 断片がゲノム DNA 中に挿入されていないことを確認している。

3 段階目でアグロバクテリウム法により、導入用プラスミド PHP74638 を中間
系統 2 に導入した。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。PHP74638 の T-DNA
領域は *Flp* 遺伝子発現カセットを含んでいるため、細胞への導入に伴い FLP たん
220 白質が産生される。その結果、PHP74638 の T-DNA 領域中の FRT1 及び FRT87
と、既に中間系統 2 のゲノム DNA に挿入されている LP 配列中の FRT1 及び
FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され、PHP74638 のうち挿入 DNA 領域
だけがゲノム DNA 上の LP 配列中に挿入された

225 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

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
(*O. sativa*) 由来の *os-actin* プロモーターが使用されている。*pmi* 遺伝子発現
230 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。

② ターミネーターに関する事項

ipd072Aa 遺伝子発現カセットにはシロイヌナズナ(*A. 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
235 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

240 導入用プラスミド PHP74638 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。

245

・ *ipd072Aa* 遺伝子

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。

250

・ *pat* 遺伝子

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)。

255

・ *pmi* 遺伝子

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成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)。

260

(5) 純度に関する事項

265

導入用プラスミド PHP74638 の挿入 DNA 領域の塩基数は 9,401 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。

270

(6) コピー数に関する事項

SbS 分析の結果、DP51291 トウモロコシのゲノム DNA 中には PHP74638 由来の配列として挿入 DNA 領域だけが 1 コピー挿入されていることが確認された。

また、他のプラスミドについても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。

275

(7) 安定性に関する事項

DP51291 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。

280

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DP51291 トウモロコシにおける、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、いずれのたん白質も分

285

析を行った全ての組織において産生が認められた。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

290 導入用プラスミド PHP74638 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、SbS 分析により、DP51291 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。

295 (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

300 DP51291 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)を調べるため終止コドンから終止コドンまで8アミノ酸以上のペプチドをコードする ORF を検索した。その結果 771 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。

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

305 DP51291 トウモロコシ中には、挿入された遺伝子により IPD072Aa たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質が産生される。

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。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。

310 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、DP51291 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-リン酸に変換するため、DP51291 はマンノースを炭素源とする選抜培地において成長することが可能である。

315 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

IPD072Aa たん白質、PAT たん白質及び 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、DuPont Pioneer 毒性たん白質データベースを用いて、BLASTP (version 2.10.0+) によるアミノ酸配列検索を行った。

320 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。

325 なお、コウチュウ目昆虫 10 種及びチョウ目昆虫 4 種に本たん白質を混餌投与した結果、WCR 以外のコウチュウ目昆虫については 100 ppm においては生存率への影響は認められなかったが、100 ppm を超えた場合には種によって生存率への影響が認められた。チョウ目昆虫については試験に用いた本たん白質の最大濃度である 1,000 ppm においても生存率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

IPD072Aa たん白質については既に我が国において飼料としての安全性審査を経ている「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」¹⁾ (以下「DP23211」という。) において消化性試験 (人工胃液及び腸液)、加熱処理感受性試験が行われている。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済みである。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済みである。

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 DP51291 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。

PMI たん白質及び PAT たん白質については、DP23211 等、同一のたん白質を発現する作物が既に承認されており、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。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

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。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

DP51291 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、DP51291 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

DP51291 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

¹⁾ 官報掲載日：2023 年 3 月 30 日。導入遺伝子は、*Dvssj1* 遺伝子断片、*ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子である。

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

370

DP51291 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

375

表 2 諸外国における認可状況

申請国	目的	申請/承認年月			申請先
■	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
EU	食品・飼料としての利用	2023 年	1 月	申請	欧州食品安全機関（EFSA）
■	■	■	■	■	■

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

380

DP51291 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

385

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 DP51291 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

390

該当しない。

IV 審議結果

395

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（DP51291）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」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 Abbitt, S.E. (2017). SB-UBI terminator sequence for gene expression in plants. US Patent. Patent No. US 9725731 B2.
- 2 Abbitt, S.E. and Shen, B. (2016). Maize and sorghum s-adenosyl-homocysteine hydrolase promoters. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2016109157 A1.
- 3 AFSL. (2022). Agriculture and Food Systems Institute Crop Composition Database (Version 9.0). (<https://www.cropcomposition.org/>). Accessed on December 23rd, 2022.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B., Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327-336.
- 8 Bermudez, E., Cong, R., Hou, J. and Yamamoto, T. (2015). Synthetic Insecticidal Proteins Active Against Corn Rootworm. United States Patent, Patent No. US 9,109,231 B2.
- 9 Bhyri, P., Krishnamurthy. N., Narayanan, E., Nott, A. and Sarangi, R.R. (2018). Plant terminator sequences. United States Patent, Patent No. US 10,059,953 B2.
- 10 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 11 Brink, K., Anitha, S., Beatty, M., Anderson, J.A., Lyon, M., Weaver, J., and Dietrich, N. (2019). Comparison of Southern-by-Sequencing (SbS™) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. Journal of Regulatory Science. 7: 1-14.
- 445 12 Brunner, S., Fengler, K., Morgante, M., Tingey, S. and Rafalski, A. (2005). Evolution of DNA sequence nonhomologies among maize inbreds. Plant Cell. 17(2): 343-360.
- 13 CFIA. (1994). The biology of *Zea mays* (L.) (Maize).
450 (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l-/eng/1330985739405/1330985818367>)
Accessed on March 4th, 2023.
- 14 Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A.
455 (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.
- 14 Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (1992). Maize polyubiquitin
460 genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Molecular Biology. 18: 675-689.
- 15 Clontech. (2001). Living Colors™ DsRed2: Improved red fluorescent protein for use
465 in living cells. Clontechniques 16: 2-3.
- 16 CODEX. (2019). Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius Commission. CODEX-STAN 210-1999.
- 470 17 Cong, B., Maxwell, C., Luck, S., Vespestad, D., Richard, K., Mickelson, J. and 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.
- 475 18 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.

- 19 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.
- 20 Delaney, B., Astwood, J.D., Cunny, H., Conn, R.E., Herouet-Guicheney, C.,
MacIntosh, S., Meyer, L.S., Privalle, L., Gao, Y., Mattsson, J. and Levine, M. (2008).
485 Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and
Chemical Toxicology* 46: S71-S97.
- 21 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
490 dehydrogenase (*Adh1*) gene of maize. *Nucleic Acids Research*. 12(9): 3983-4000.
- 22 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.
- 495 23 Diehn, S., Lu, A.L. and Simmons, C.R. (2012). Viral promoter, truncations thereof,
and methods of use. United States Patent, Patent No. US 8,338,662 B2
- 24 Diehn, S., Lu, A.L. and Simmons, C.R. (2013). Viral promoter, truncations thereof,
500 and methods of use. United States Patent, Patent No. US 8,344,206.
- 25 Dong, J., Feng, Y., Kumar, D., Zhang, W., Zhu, T., Luo, M-C. and Messing, J. (2016).
Analysis of tandem gene copies in maize chromosomal regions reconstructed from
long sequence reads. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113: 7949-7956.
- 505 26 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.
- 27 Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Isolation and
510 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.
- 28 Falco, S.C. and Li, Z. (2010). Site-specific integration and stacking of transgenes in
515 soybean via dna recombinase mediated cassette exchange. World Intellectual
Property Organization, Patent No. WO2010080430.
- 29 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the

- transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-
520 nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.
- 30 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide
sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.
- 525 31 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.
- 32 Gordon-Kamm, W.J., Helentjaris, T.G., Lowe, K.S., Shen, B., Tarczynski, M.C. and
530 Zheng, P. (2013). AP2 domain transcription factor ODP2 (ovule development protein
2) and methods of use. United States Patent, Patent No. US 8420893.
- 33 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
535 characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.
- 34 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro
site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.
- 540 35 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 to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory
Toxicology and Pharmacology* 41: 134-149.
- 545 36 ISAAA. (2023a). GM Approval Database, Gene: pmi. International Service for the
Acquisition of Agribiotech Applications.
(<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gene/default.asp?GeneID=37&Gene=pmi>)
550 Accessed on March 27th, 2023.
- 37 ISAAA. (2023b). GM Approval Database, Gene: pat. International Service for the
Acquisition of Agribiotech Applications.
(<https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase/gene/default.asp?GeneID=38&Gene=pat>)
555 Accessed on March 27th, 2023.
- 38 Jiménez-Juárez, N., Oral, J., Nelson, M.E. and Lu, A.L. (2023). IPD072Aa from
Pseudomonas chlororaphis Targets Midgut Epithelial Cells in Killing Western Corn
Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Applied and Environmental Microbiology*.

- 560 Ahead of Print.
(<https://doi.org/10.1128/aem.01622-22>).
Accessed on March 4th, 2023.
- 39 Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C. and Olsen, O.-A.
565 (1994). The promoter of the barley aleurone-specific gene encoding a putative 7 kDa
lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice. *The
Plant Journal*. 6: 849-860.
- 40 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating
570 system. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2: 571-589.
- 41 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.
- 575 42 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.
- 580 43 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.
- 585 44 Lowe, K.S., Cahoon, R.E., Scelonge, C.J., Tao, Y., Gordon-Kamm, W.J., Bruce, W.B.
and Newman, L.J. (2007). *Wuschel* (WUS) Gene Homologs. United States Patent,
Patent No. US 7256322.
- 590 45 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 Gordon-Kamm, W. (2016). Morphogenic regulators *Baby
boom* and *Wuschel* improve monocot transformation. *The Plant Cell*. 28: 1998-2015.
- 595 46 Lundry, D.R., Burns, J.A., Nemeth, M.A. and Riordan, S.G. (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:
600 1991-1998.

- 47 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-
605 803.
- 48 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
610 economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(99)13.
(<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
Accessed on December 23rd, 2022.
- 49 OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new
615 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>).
Accessed on December 23rd, 2022.
- 620 50 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>).
625 Accessed on December 23rd, 2022.
- 51 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.
- 630 52 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:
635 634-637.
- 53 Sutcliffe, J.G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of
Escherichia coli plasmid pBR322. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
of the United States of America. 75 (8): 3737-3741.
- 640 54 Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT

recombination sites and methods of use. World Intellectual Property Organization.
Patent No. WO 2007011733.

- 645 55 戸澤英男. (2005). トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用－.
農山漁村文化協会. pp.2-4, pp.56-59, p.127.
- 56 US EPA. (1997). Escherichia coli K-12 Derivatives Final Risk Assessment. United
States Environmental Protection Agency,
650 <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-09/documents/fra004.pdf>
Accessed on February 23rd, 2022.
- 57 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.,
655 Boca Raton. pp.3-29.
- 58 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*.
660 Gene. 70: 25-37.
- 59 Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning
vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
Gene. 33(1):103-19.
- 665 60 財務省. (2023). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on March 4th, 2023.
- 670 61 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes,
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.

675 参考資料 (申請者提出 社外秘)

680

