

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認 (案)

**チョ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
EH913 系統**

**令和 6 年12月24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.....	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
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.....	5
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.....	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
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.....	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
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.....	7

	(1) 供与体に関する事項	7
	(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	10
35	(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	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
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	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
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	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	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
50	(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
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	14
	IV 審議結果	14
	V 参考文献及び参考資料	14

「チョ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 EH913 系統」
に係る安全性確認

I はじめに

チョ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 EH913 系統（以下「EH913 系統」という。）について、令和 6 年 5 月 9 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：チョ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 EH913 系統

性質：チョウ目害虫への抵抗性及び除草剤グルホシネートへの耐性を持つ。

申請者：ヘリックス・シード&バイオテクノロジー社

開発者：ヘリックス・シード&バイオテクノロジー社

EH913 系統は、トウモロコシのデント種 Hi-II 系統に、特定のチョウ目昆虫に対する殺虫活性、及び除草剤グルホシネート耐性を付与するために C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子を導入し作成された。

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* subsp. *mays* (L.) Ittis) のデント種 Hi-II 系統である。

Hi-II 系統は、アグロバクテリウム法による未熟胚への形質転換に適したハイブリッド系統であり、遺伝子組換えトウモロコシの開発に広く利用されている (Vega *et al.*, 2008)。

EH913 系統は、トウモロコシのデント種 Hi-II 系統に、*Bacillus thuringiensis* 1132C 株由来の C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子、及び *Streptomyces hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子を導入し作成された。

EH913 系統に挿入された C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子は、それぞれ、特定のチョウ目昆虫に対する殺虫活性、及び除草剤グルホシネート耐性を付与している。

(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。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

EH913 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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

EH913 系統は、導入された C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子により、特定のチョウ目昆虫に対する殺虫活性及び除草剤グルホシネート耐性を持つ。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。

(1) ～ (4) により、EH913 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

EH913 系統で発現する C 末端領域欠失型 *Cry1Da* たん白質及び改変 *PAT (bar)* たん白質は、特定のチョウ目昆虫に対する殺虫活性及び除草剤グルホシネート耐性を付与する。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

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 Hi-II 系統のデント種である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

トウモロコシは、同属のテオシントから直接派生したものである (Galinat, 1988)。メキシコ、中米、南米を原産地とするテオシントからトウモロコシが栽培化されたのは、交配や人為選抜によるものであったと考えられるが、自然の有益な突然変異の蓄積も関与していた。トウモロコシの栽培化と品種改良の結果、穂が皮にしっかりと包まれるようになり、トウモロコシは高度に栽培化され、種子を広め、生育するために人間に完全に依存するようになった (Grobman *et al.*, 2012、Blake, 2015、Ranum *et al.*, 2014)。

(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、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。これらの抗栄養素の含有量は、フィチン酸が乾物重ベースで 0.5～1.26 %、ラフィノースが 0.09～0.41 %である (AFSI, 2023)。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)。

(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。

140

(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。

145

(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、雑草性はないと考えられる。なお、我が国においても自生するとの報告はない。

150

(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 (*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ないと考えられる。

155

(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、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。

160

(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。

165

(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化学的な方法により防除することができる(OECD, 2003)。

170

175

(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 (*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。

180

185

190

195

200

205

210

215

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

EH913 系統の作出に用いたプラスミド pEH001 は、*S. hygroscopicus* 由来の改変 PAT たん白質のコード配列（改変 *bar* 遺伝子）を含む既に報告されている大腸菌シャトルベクターから作製した。外側骨格領域の調節要素及びコーディング要素は、細菌クローニングプラスミドである、Hajdukiewicz *et al.* (1994) に記載されているシャトルベクターのプラスミド pPZP200 から作製した。

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド pEH001 の塩基数は 12,800 bp である。また、プラスミド pEH001 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。

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pEH001 は、*E. coli* 由来の *aadA* 遺伝子を含んでおり、これはスペクチノマイシン及びストレプトマイシン抗生物質に耐性を付与するアミノグリコシド 3'アデニル転移酵素をコードしている。この配列はプラスミドの外側骨格領域に含まれており、宿主植物に導入された T-DNA 領域には含ま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

導入用プラスミド pEH001 には、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

導入用プラスミド pEH001 の外側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、EH913 系統中には、これらの領域を含む外側骨格領域は含まれていない。

(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 pEH001 は、プラスミド pPZP200 (Paz *et al.*, 2004) をベースとし、pPZP200 の T-DNA 領域にグルホシネート除草剤耐性遺伝子発現カセットを挿入したプラスミド pTF101 に、C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子発現カセットをクローニングして作成された。

(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 pEH001 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 Hi-II 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

(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 EH913 系統の作出に用いたプラスミド pEH001 の各構成要素の由来と機能

構成要素	由来	機能
プラスミド外側骨格領域（本組換えトウモロコシには存在しない。）		
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
pVS1 <i>staA</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	pVS1 プラスミドの安定化に必要なたん白質 (StaA) のコード配列 (Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
pVS1 <i>repA</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	pVS1 プラスミドの複製に必要なたん白質 (RepA) のコード配列 (Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
pVS1 <i>ori V</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	pVS1 プラスミド複製起点 (Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
<i>bom</i>	<i>Escherichia coli</i>	細菌の接合の際のプラスミドの移動に関与 (Finnegan and Sherratt, 1982)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
<i>Ori</i>	<i>E. coli</i>	DNA 複製開始シグナル (Norranders <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。

構成要素	由来	機能
<i>aadA</i>	<i>E. coli</i>	スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性 (SmR) を有するアミノグリコシド 3' アデニルトランスフェラーゼのコード配列 (Murphy, 1985)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
T-DNA 領域		
LB	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む DNA 領域 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
<i>Tvsp</i>	<i>Glycine max</i>	ダイズ貯蔵たん白質転写ターミネーター配列 (Paz <i>et al.</i> , 2004)。
改変 <i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	除草剤グルホシネート耐性を付与するホスフィントリシン-N-アセチルトランスフェラーゼのコード配列 (Paz <i>et al.</i> , 2004)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
2X <i>35S</i>	Cauliflower mosaic virus	切断型 CaMV <i>35S</i> プロモーター配列を用いた二重転写プロモーター (Paz <i>et al.</i> , 2004)。
MCS	Bacteriophage restriction sites from vector pPZP200	T-DNA セグメント内に目的の遺伝子を挿入するためのマルチクローニングサイト (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
<i>Ubi-1</i>	<i>Zea mays</i>	トウモロコシのユビキチン遺伝子の転写プロモーターとイントロン (Christensen and Quail, 1996)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
C 末端領域 欠失型 <i>cry1Da</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>B. thuringiensis</i> 1132C 株由来 C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質のコード配列。

構成要素	由来	機能
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
<i>Nos</i>	<i>A. tumefaciens</i>	ノパリン合成酵素遺伝子の翻訳終結及びポリ阿德ニル化部位 (Christensen and Quail, 1996)。
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。
RB	<i>A. tumefaciens</i>	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む DNA 領域 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
プラスミド外側骨格領域 (本組換えトウモロコシには存在しない。)		
Intervening plasmid sequence		DNA クローニングの際に用いられた配列。当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。

225 1: 3bp ストップコドンを含む *cry1Da* 遺伝子のサイズ

230 ② 安全性に関する事項

EH913 系統に挿入されたコード配列の供与体は環境中に存在しており、ヒトや動物に対する病原性やアレルギー性は知られていない。

230

(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、プラスミド pEH001 の T-DNA 領域を非組換えトウモロコシ Hi-II の未熟胚に導入した。

235

その後、グルホシネートのアナログであるビアラホスを含む培地でカルスを生育させ、植物体再生後、グルホシネートを散布し形質転換個体を選抜した。

選抜後、植物体を再生、非遺伝子組換えトウモロコシ近交系 L3 と交配し、得られた種子を F₁ とした。既存の優良品種との戻し交配、自殖及びきょうだい交配等により後代を維持しながら、各種分析及び評価を行い、最終的な商品化系統を選抜した。

240

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子発現カセットは、トウモロコシ (*Z. mays*) 由来の Ubi プロモーターが使用されている。Ubi プロモーターはトウモロコシのユビキチン遺伝子のプロモーターであり、転写開始に関与する。また、遺伝子発現のための強力なプロモーターであり、植物バイオテクノロジー分野で広く用い

245

られている。改変 *bar* 遺伝子発現カセットでは、カリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV 35S プロモーターが使用されている。

250

② ターミネーターに関する事項

C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子発現カセットは、*Agrobacterium spp.*由来の *nos* 転写末端ポリアデニル化部位をターミネーターとして、また、改変 *bar* 遺伝子発現カセットは、ダイズ貯蔵たん白質由来の *Tvsp* 転写末端ポリアデニル化部位をターミネーターとして使用されている。

255

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 pEH001 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。

260

(4) 性質に関する事項

以下に各遺伝子の機能を示す。

C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子

C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子から発現される C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質は、標的害虫である特定のチョウ目昆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。当該たん白質は、遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* 1132C 株において、野生型 Cry1Da たん白質の C 末端が短くなったものであり、野生型の全長 Cry1Da たん白質と C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質との違いは、野生型 Cry1Da たん白質の C 末端領域の 540 アミノ酸が C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質では欠失していることである。なお、C 末端領域の主な機能は、*B. thuringiensis* の孢子形成期に Cry1 たん白質の結晶形成を促進することである。

265

270

改変 *bar* 遺伝子

改変 *bar* 遺伝子から発現される改変 PAT (*bar*) たん白質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるホスフィノトリシンをアセチル化することにより化学的に不活化し、植物に除草剤耐性を付与する。

275

(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。

280

(6) コピー数に関する事項

次世代シーケンス解析及び塩基配列解析の結果、単一の遺伝子座に T-DNA 領域が 1 コピー挿入されていること及びすべての構成要素が意図した順番で存在し、形質転換プラスミド pEH001 からの外側骨格領域は存在しないことが確認された。また、T-DNA 領域を挟む 5'及び 3'領域の DNA 配列 1,000 bp について BLASTN 及び BLASTX 解析を行った結果、両近傍配列がトウモロコシゲノムと高い相同性

285

を示し、これらがトウモロコシ由来であることが確認された。

290 (7) 安定性に関する事項

T-DNA 領域の遺伝的安定性を、4 世代から得たゲノム DNA を用いて次世代シーケンス解析によって評価した。この結果、挿入された配列は少なくとも 7 世代にわたって安定していたことが確認された。

295 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質及び改変 PAT (*bar*) たん白質の発現量を ELISA 法又はウエスタンブロット解析により測定した。その結果、C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質は、根、絹糸、花粉では検出限界未満となっており、発現が見られた葉、植物体、茎葉、子実のうち、葉において最も高い発現量が確認された。改変 PAT (*bar*) たん白質は、絹糸、子実、花粉では検出限界未満となっており、発現が見られた葉、植物体、根、茎葉のうち、根において最も高い発現量が確認された。

305 (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 pEH001 は、外骨格領域に *E. coli* 由来の *aadA* 遺伝子を含んでおり、これは、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン抗生物質に耐性を付与するアミノグリコシド 3'アデニル転移酵素をコードしている。

なお、*aadA* 遺伝子は EH913 系統には導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されている。

(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

EH913 系統に挿入された DNA 配列及びその境界領域で ORF を検索した。その結果、挿入された DNA 配列内に 10 個、境界領域で 11 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。

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

C 末端領域欠失型 *cry1Da* 遺伝子は、C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質を発現することにより、チョウ目害虫抵抗性を付与する。また、改変 *bar* 遺伝子は、改変 PAT (*bar*) たん白質を発現することにより除草剤グルホシネート耐性を付与する。

この点を除けば、EH913 系統は既存種とその形態及び生育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

C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質及び改変 PAT (*bar*) たん白質配列が既知の毒性たん白質と相同性がないことを確認するために、それらのアミノ酸配列を、

330 NCBI データベースの BLASTP デフォルトパラメーターを用いて非冗長 NCBI の
たん白質データベースと比較した。その結果、Cry1Da たん白質以外のアノテー
ションされた毒素配列との相同性 ($E\text{-score} < 1 \times 10^{-6}$) は見つからなかった。

(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 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（pH1.2））処理、人工腸液（パンクレアチン（pH7.5））処理及び加熱処
理を行った。

C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質

340 C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質は、人工胃液処理では、88 %が 10 分以内に
分解され、30 分ですべてが分解されていた。一方、人工腸液処理においては、トリ
プシン耐性コアたん白質に速やかに分解されたが、24 時間以内に完全に分解される
ことはなかった。また、加熱処理においては、高温で分解されることをウエスタン
ブロット解析によって確認した。

345 消化においては、腸液単独での消化が起こることは考えにくく、人工胃液及び人
工腸液の試験結果を総合すると、C 末端領域欠失型 Cry1Da たん白質は、生体内で
迅速に消化されると考えられた。

改変 PAT (*bar*) たん白質

350 人工胃液中あるいは人工腸液中での PAT たん白質の消化試験に関する文献及び
公開情報は、PAT (*bar*) たん白質が、速やかに分解されることを示している
(Hérouet *et al.*, 2005; EFSA, 2007; EFSA, 2017a; EFSA, 2017b)。加熱処理にお
いては、PAT (*bar*) たん白質は、熱によって容易に分解されないが、熱処理後に
酵素活性が喪失することが報告されている (Hérouet *et al.*, 2005; EFSA, 2007;
355 EFSA, 2017a; EFSA, 2017b)。

改変 PAT (*bar*) たん白質の C 末端に付加された 4 アミノ酸は、改変 PAT たん
白質の機能、及び免疫学的特性に野生型 PAT (*bar*) たん白質と差異を生じさせな
いことが、グルホシネート耐性の程度、改変 PAT (*bar*) たん白質の発現レベルを
定量した結果によって示されており、人工胃液処理、人工腸液処理あるいは加熱処
理における改変 PAT (*bar*) たん白質の安定性は野生型 PAT (*bar*) たん白質と同
360 等と考えられた。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

365 C 末端領域欠失型 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、EH913 系統がこれらのたん白質の発現により、新しい代謝経路
及び代謝産物を作ることは考えにくい。

改変 PAT (*bar*) たん白質は、野生型の PAT (*bar*) たん白質同様、グルホシネ
ートの除草剤成分である PPT 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とは考えにくい。

370

(5) 宿主との差異に関する事項

EH913 系統及び対照の非組換えトウモロコシの子実及茎葉について、粗たん白
質及びアミノ酸、粗脂肪及び脂肪酸、炭水化物及び繊維質、灰分及び無機質、ビタ
ミン、抗栄養素、二次代謝産物の分析を行ったところ、子実の栄養素の項目には統
計学的有意差が認められたものがあったが、EH913 系統と対照トウモロコシの平
均値の差が小さく、EH913 系統の値は複数の市販のトウモロコシ品種の平均値の
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。

(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、EH913 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。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

EH913 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

EH913 系統も従来の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）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

国名	関連省庁	申請	承認
ブラジル	CTNBio (食品・飼料・栽培)	2022 年 2 月	2022 年 7 月
米国	FDA (食品・飼料)	2022 年 9 月	—
	USDA (輸入)	2022 年 7 月	—
カナダ	Health Canada (食品)	2022 年 9 月	—
	CFIA (飼料・栽培)	2022 年 9 月	—
中国	農業農村部 (MARA) (輸入・食品・飼料)	2023 年 11 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。

(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。

400 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

405 チョ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 EH913 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

410 参考文献

AFSI. 2023. Corn – Field – Maize – Zea mays – Grain. Crop Composition Database: Version
9.1. Agriculture Food Systems Institute. Updated February 2019. Accessed May 2023.
<https://www.cropcomposition.org/>.

415

Blake, M. 2015. Maize for the Gods: Unearthing the 9,000 - Year History of Corn.
University of California Press, p. 1-280.

420 Blezinger, S. B. 2005. Grain processing has positive effects on production - part II. *Cattle
Today*. Accessed on December 6th, 2020.

CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.). Canadian Food Inspection Agency.
(<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.pdf>). Accessed on May 2023.

425 Christensen, A. H. and Quail, H. P. 1996. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level
expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants.
Transgenic Res., v. 5, p. 213-218.

430 Codex. 2008. Guidelines for the conduct of food safety assessment of foods derived from
recombinant-DNA plants. Codex Alimentarius, p. 1-18.

EFSA. 2007. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an
application (reference EFSA-GMO-UK-2004-04) for the placing on the market of glufosinate
tolerant genetically modified rice LLRICE62 for food and feed uses, import and processing,
435 under Regulation (EC) No 1829/2003 from Bayer CropScience GmbH1(No EFSA-Q-2004-
145). European Food Safety Assessment Journal. v. 588, p. 1-25.

EFSA. 2017a. Scientific opinion on an application by Dow AgroSciences LLC (EFSA GMO-
NL-2012-106) for the placing on the market of genetically modified herbicide-tolerant
440 soybean DAS-44406-6 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC)

No 1829/2003. European Food Safety Assessment Journal, v. 15, n. 3, p. 1-31.

EFSA. 2017b. Scientific opinion on an application by Monsanto (EFSA-GMO-NL-2013-114) for the placing on the market of a herbicide-tolerant genetically modified cotton MON 88701 for food and feed uses, import and processing under Regulation (EC) No 1829/2003. European Food Safety Assessment Journal, v. 15, n. 3, p. 1-20.

Finnegan, J. and Sherratt, D. 1982. Plasmid ColE1 Conjugal Mobility: The nature of *bom*, a region required in *cis* for transfer. Molecular and General Genetics, v. 185, n. 2, p. 344-351.

FSANZ. 2005. Final assessment report application A543 food derived from insect-protected, glufosinate ammonium-tolerant corn line 59122-7. Food Standards Australia New Zealand, October 2005. p. 1-6.

Galinat, W. C. 1988. The origin of maize. In: Sprague, G. F.; Dudley, J. W (eds.). Maize and Maize Improvement. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, Madison, WI. 3rd ed., p 1-31.

Gill, S. S., Cowles, E. A., and Pietrantonio, P. V. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual review of entomology, 37(1), p. 615-634.

Grobman, A., Bonavia, D., Dillehay, T., Piperno, D., Iriarte, J., and Holst, I. 2012. Pre-ceramic maize from Paredones and Huaca Prieta, Peru. Proceedings, National Academy of Sciences, USA, v. 109, n. 5, p. 1755-1759.

Hajdukiewicz, P., Svab, Z., and Maglia, P. 1994. The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. Plant Mol. Biol., v. 25, p. 989-994.

Han, X. and ILSI. 2016. A Review of the Food and Feed Safety of the PAT Protein. ILSI Research Foundation. (PDF) A Review of the Food and Feed Safety of the PAT Protein (researchgate.net)

Heeb, S. I., Itoh, Y.; Nishijyo, T. U., Schnider, C., Keel, J., Wade, U., and Haas, D. 2000. Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. Mol. Plant Microbe Interact., v. 13, n. 2, p. 232-237.

Hérouet, C., Esdaile, D. J., Mallyon, B. A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., and 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, v. 41, n. 2, p.134-149.

Horikoshi, J. R., Vertuan, H., de Castro, A. A., Morrell, K., Griffith, K., Evans, A., and Head, G. 2021. A new generation of Bt maize for control of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*).
485 Pest Management Science, v. 77, n. 8, p. 3727-3736.

Kovalic, D., Garnaat, C., Guo, L., Yan, Y., Groat, J., Silvanovich, A., and Bannon, G. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. The
490 Plant Genome, v. 5, p. 149-163.

Lima, M. S., Silva, P. S. L., Oliveira, O. F., Silva, K. M B., and Freitas, F. C. L. 2010. Corn yield response to weed and Fall Armyworm controls. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 28, n. 1, p. 103-111.

495 Murphy, E. 1985. Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD (9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD (3'')(9). Mol. Gen. Genet., v. 200, n. 1, p. 33-39.

500 Norrander, J., T. Kempe, J., and Messing, J. 1983. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. Gene, v. 26, n. 1, p. 101-106.

OECD. 2002. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant
505 Metabolites. ENV/JM/MONO (2002)25, p. 1-42.

OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). 465 ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
510

OECD. 2007. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No. 42. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO (2007)14. p. 1-107
515

OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, anti-nutrients, toxicants and 475 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.
520

Pardo-Lopez, L., Soberon, M., and Bravo, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiology reviews, v. 37, p. 3-22.

- 525 Paz, M. M., Shou, H., Guo Z., Zhang, Z., Banerjee, A. K., and Wang, K. 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica*, v. 136, p.167-179.
- Ranum, P., Peña-rosas, J., and Garcia-casal, M. 2014. Global maize production, utilization, 530 and consumption. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 1312, p. 105–112.
- Rodriguez, S, I. F. C., Stringhini, J. H., Ribeiro, A. M. L., Pontalti, G. C., McManus, and C. M. 2014. Quality Assessment of Corn Batches Received at a Feed Mill in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v. 16, n. 3, p. 1-240. 535 <https://doi.org/10.1590/1516-635x1603233-240>
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Zeigler, D. R., and Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology Molecular Biology Rev.*, v. 62, n. 3, p. 775-806.
- 540 USDA–GAIN. 2020. Grain and Feed Annual Report. [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Grain%20and%20Feed%20Annual](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Grain%20and%20Feed%20Annual%20Report%20Brazil%2004-01-2020) Brasilia Brazil 04-01-2020
Verified on April 10th, 2021.
- 545 USDA –GAIN. 2023. Grain and Feed Annual – Brazil - Report number JA2023-0021. [https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Grain%20and%20Feed%20Annual](https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Grain%20and%20Feed%20Annual%20Report%20Japan%20JA2023-0021.pdf) Tokyo Japan JA2023-0021.pdf
- 550 Vachon, V., Laprade, R., and Schwartz, J. L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal Invertebrate Pathology*, 111: p. 1-12.
- Vega, M. J., Yu, W., and Kennon, R. A. 2008. Improvement of *Agrobacterium*-mediated 555 transformation in Hi-II maize (*zea mays*) using standard binary vectors. *Plant Cell Rep.*, v. 27, p. 297-305.
- Wang, Y., Wang, J., Fu, X., Nageotte, J.R., Silverman, J., Bretsnyder, E. C., and Jerga, A. 2019. *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 Protein Interactions with Novel 560 Receptors Allow Control of Resistant Fall Armyworms. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 85, n. 16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6677855/>
- Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., and Schulz, A. 1996. The 565 similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.*, v. 14, n. 10, p. 1274–1278.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 570 1. HLR-2022-036-A, Molecular Characterization of Insect-Protected Maize Event EH913（社外秘）
2. HLR-2021-008-A, Creation of Insect Resistant Maize Event EH913（社外秘）
3. Alignment of AA Seq Cry（社外秘）
- 575 4. HLR-2022-025, Expression Analysis of Cry1Da and PAT/BAR From EH913 Transgenic Maize（社外秘）
5. HLR-2022-030, qWestern Blot Method Development/Validation for Cry1Da（社外秘）
6. HLR-2023-063, *In Vitro* Digestive Fate and Heat Stability of Cry1Da Protein Product in *E. Coli* and Leaf Extract from Maize Event EH913（社外秘）
- 580 7. HLR-2022-053, Final Report of the Compositional Evaluation of Grain and Forage of Maize Event EH913, its Conventional Counterpart and Conventional Commercial References（社外秘）