

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」に係る安全性確認（第2版）

I はじめに

農業資材審議会は、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604（以下「MIR604」という。）について「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行い、平成 19 年 6 月に、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断した。

平成 20 年 4 月、申請者より導入遺伝子の近傍配列について、以前提出した資料の塩基配列との相違が認められたとの報告があったため、再度審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼 料 名：コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604

性 質：害虫抵抗性

申 請 者：シンジェンタシート株式会社

開 発 者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

MIR604 は、コウチュウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry3A たん白質（以下「mCry3A たん白質」という。）を発現する改変 *cry3A* 遺伝子（以下「*mcry3A* 遺伝子」という。）を導入したものであり、コウチュウ目害虫に抵抗性をもつ性質を付与されている。

III 審議内容

第1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

1 遺伝的素材に関する事項

宿主に用いた植物は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ（*Zea mays* L.）でデント種に属する。MIR604 に導入された *mcry3A* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する（参考文献 1）。また、形質転換体の選抜マーカーとして導入されたマンノースリン酸イソメラーゼ（phosphomannose isomerase）遺伝子（以下「*pmi* 遺伝子」という。）は大腸菌に由来する。

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持つ。

3 飼料の構成成分等に関する事項

MIR604 の穀粒の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 10.44%~11.80%、脂質 2.65%~3.88%、ADF5.2%~5.5%、NDF12.9%~13.4%、灰分 1.50%~1.59%、炭水化物 82.8%~84.0%であり、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 7.27%~9.03%、脂質 1.37%~2.15%、ADF20.84%~28.1%、NDF37.41%~44.3%、灰分 3.46%~4.43%、炭水化物 84.4%~85.9%であった。

トウモロコシの穀粒の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 6%~15%、脂質 3%~6%、ADF2%~11%、NDF6%~23%、灰分 0.6%~6%、炭水化物 74%~90%であり（文献値、参考文献 2~6）、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）は、たん白質 3%~12%、脂質 0.3%~5%、ADF16%~42%、NDF20%~64%、灰分 2%~10%、炭水化物 76%~92%であった（文献値、参考文献 2、3）。

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MIR604 と既存のトウモロコシとの相違は、MIR604 が mCry3A たん白質の発現によりコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示す点のみである。これらの点を除けば、MIR604 は既存のトウモロコシと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について相違はない。

以上 1.1~1.4 により、MIR604 の飼料としての安全性を評価するために、既存のトウモロコシを比較対象として用いる方法が適用できると判断された。

第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MIR604 は、mCry3A たん白質の発現によりコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示し、トウモロコシに被害を及ぼすウエスタンコーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に対し効果的な防除を行うことが可能となる。

第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に属するトウモロコシ(*Zea mays* L.)で、MIR604 の作出には交雑種を用いた。

2 遺伝的先祖に関する事項

トウモロコシは、一般に、紀元前 5,000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられ、その植物学的起源は、育種過程でブタモロコシから派生したとする説が有力とされている。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシが有害生理活性物質を生産することは知られていない。

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

トウモロコシに感染する病原体は知られているが、家畜等に対する病原性は知られていない。

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

トウモロコシは栽培作物であり、我が国において自生したという報告はない。

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作物である。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される。トウモロコシの近縁種にはトリプサカム属及びブタモロコシがあるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはブタモロコシのみである。なお、我が国においてブタモロコシの自生は知られていない。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

子実を直接飼料として利用するほかサイレージ用としても利用されている。また、食品や工業製品の副産物も飼料として利用されている。

9 飼料の安全な利用に関する事項

上記8のとおり、トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

現在のトウモロコシは、栽培作物として適するように人為的に高度に改良された作物であり、人の助けなしに生存、繁殖することはできない。

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である他のトリプサカム属種において有害生理活性物質の産生は報告されていない。

第4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

MIR604 の作出には発現ベクターpZM26 が用いられた。pZM26 は pVictor を用いて作成された。

2 性質に関する事項

pZM26 の塩基数は 13,811bp であり、制限酵素による切断地図は明らかになっている。また、pZM26 に存在する全ての遺伝子の由来及び機能は明らかになっており、既知の有害塩基配列を含まない。

3 薬剤耐性に関する事項

pZM26 には、細菌中での選抜・維持のため、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が存在しているが、この遺伝子は MIR604 に存在しないことが、サザンブロット分析によって確認された。

4 伝達性に関する事項

pZM26 には伝達性に関与する、*Pseudomonas* 菌由来の *VS1ori* (参考文献 7)、*E. coli* 由来の *ColEIori* (参考文献 8) 及び *Agrobacterium tumefaciens* 由来の *virG*

(参考文献 9) が含まれるが、いずれも伝達域が明らかであり、宿主植物以外に伝達することはない。

5 宿主依存性に関する事項

pZM26 の宿主域は限られており、家畜等が宿主となることはない。

6 発現ベクターの作成方法に関する事項

pZM26 は、pVictor を基に、挿入遺伝子である *mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子とこれらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子を組み込み作成された。

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

pZM26 の T-DNA 領域がアグロバクテリウム法により宿主に導入された。

第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

mcry3A 遺伝子は、*B. t. t* に由来する *cry3A* 遺伝子をもとに、トウモロコシでの発現に最適な塩基配列 (参考文献 10) に置換・人工合成 (参考文献 11) され、さらに、標的コウチュウ目害虫に対する抵抗性を高めるために改変した遺伝子である。

pmi 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされたマンノースリン酸イソメラーゼを産出する *manA* 遺伝子で、形質転換体の選抜マーカーとして用いられた (参考文献 12)。

(2) 安全性に関する事項

B. t. t については微生物農薬の有効成分として安全に利用されており、*E. coli* は自然界に広く存在することが知られている。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

pZM26 は、pVictor を基に、挿入遺伝子である *mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子とこれらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子を組み込み作成された。宿主への導入はアグロバクテリウム法により行い、導入後は、マンノースを添加した培地を用いて形質転換体を選抜した。

3 構造に関する事項

mcry3A 遺伝子のプロモーターはトウモロコシ由来の MTL プロモーター (参考文献 13) で、*pmi* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシ由来の ZmUbiInt プロモーターである (参考文献 14)。*mcry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子のターミネーターは *A. tumefaciens* 由来の NOS である (参考文献 15)。なお、これらのプロモーター及びターミネーターの塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まない。

4 性質に関する事項

MIR604 に導入された *mcry3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットの各

構成要素、由来及び機能を表 1 にまとめた。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
MTL	プロモーター領域。トウモロコシ由来で、トウモロコシの根での発現に適したプロモーターとして用いられた（参考文献 13）。
<i>mcry3A</i>	<i>B. t. t.</i> 由来の <i>cry3A</i> 遺伝子（参考文献 1）。トウモロコシでの発現を最適化し、標的コウチュウ目害虫への抵抗性を高めるために改変されている。
NOS	ターミネーター領域。 <i>A. tumefaciens</i> 由来の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化配列（参考文献 15）。
ZmUbiInt	プロモーター領域。トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来で第一イントロン領域を含む単子葉植物用プロモーターである（参考文献 14）。
<i>pmi</i>	マンノースリン酸イソメラーゼを産出する <i>E. coli</i> K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子（参考文献 16）で、遺伝子導入された形質転換体の選抜マーカーとして用いられた（参考文献 12）。
NOS	ターミネーター領域。 <i>A. tumefaciens</i> 由来の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化配列（参考文献 14）。

【*mcry3A* 遺伝子の機能】

mcry3A 遺伝子は、コウチュウ目害虫であるウエスタンコーンルートワーム及びノーザンコーンルートワームに抵抗性を付与する 597 のアミノ酸から成る mCry3A たん白質を産出する。

土壌細菌である *B. t. t.* から単離された Bt たん白質は、特定の昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種が Bt たん白質を摂取して消化すると、特異なたん白質消化によって活性ポリペプチド（コアたん白質）となり、昆虫の中腸表面の特異的な受容体に結合し、イオンチャネルが形成されて消化器官が損傷を受け、死に至ることが知られている（参考文献 17～21）。この作用機作は *B. t. t.* 由来の Cry3A たん白質も同様である（参考文献 22～29）。なお、Cry3A たん白質は家畜等に対して健康を害するような影響の懸念がないことが報告されている（参考文献 30～31）。

【*pmi* 遺伝子の機能】

pmi 遺伝子は、391 のアミノ酸から成る PMI たん白質を産出する。

PMI タンパク質は、*E. coli* のマンノースリン酸イソメラーゼであり、MIR604 の作出過程において、形質転換体の選抜マーカーとして用いられた（参考文献 12）。トウモロコシを含む多くの植物細胞はマンノースを炭素源として生育に利用できないが、*pmi* 遺伝子の導入により PMI たん白質を発現する細胞では、マンノースを利用可能なフルクトース 6-リン酸に変換して生長することができるので、マンノースを組織培養培地に添加することにより、形質転換体の選抜が可能となる。

5 純度に関する事項

挿入遺伝子を含む pZM26 は、細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

6 安定性に関する事項

MIR604 の各世代での挿入遺伝子の安定性を確認するため、*mcry3A* 遺伝子をプローブに用いたサザンブロット分析を行ったところ、各世代において *mcry3A* 遺伝子が安定していることが確認された。また、MIR604 における挿入遺伝子の分離様式を確認するため、mCry3A たん白質の ELISA 分析、*pmi* 遺伝子と *mcry3A* 遺伝子に対する TaqMan®PCR 分析を行ったところ、挿入遺伝子の分離比の実測値は期待値 (3:1) と一致し、MIR604 の挿入遺伝子はメンデルの分離法則に基づいて遺伝することが確認された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、*mcry3A* 遺伝子、*pmi* 遺伝子及びこれらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子が、トウモロコシゲノムに 1 コピー挿入されたことが確認された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MIR604 における mCry3A たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、生育初期から収穫期（穀粒のみ成熟期から収穫期）までの mCry3A たん白質発現量の平均値 ($n=3\sim4$) の範囲は、葉 $3.31\mu\text{g/g fwt}\sim23.27\mu\text{g/g fwt}$ 、根 $1.97\mu\text{g/g fwt}\sim13.79\mu\text{g/g fwt}$ 、全植物体 $0.91\sim11.13\mu\text{g/g fwt}$ 、穀粒 $0.63\mu\text{g/g fwt}\sim1.37\mu\text{g/g fwt}$ であった。また、PMI たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、生育初期から収穫期（穀粒のみ成熟期から収穫期）までの PMI たん白質の発現量の平均値 ($n=3\sim4$) は、葉 LOQ $\sim0.44\mu\text{g/g fwt}$ 、根 LOQ $\sim0.18\mu\text{g/g fwt}$ 、全植物体 LOQ $\sim0.26\mu\text{g/g fwt}$ 、穀粒 LOQ $\sim0.35\mu\text{g/g fwt}$ であった (LOQ : $0.06\mu\text{g/g fwt}$)。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

pZM26 の T-DNA 領域外には、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が存在しているが、この遺伝子は MIR604 には存在せず、このことはサザンブロット分析により確認された。

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

VNTi (version 9.0、InforMax 社) を用いた解析の結果から、MIR604 に挿入された T-DNA とトウモロコシゲノムの接合部分に、258 塩基からなる 1 つのオープンリーディングフレームが確認された。(参考文献 34) しかし、その上流には、転写に必要なプロモーター配列が存在しないことから、このオープンリーディングフレームが転写される可能性は極めて低いと考えられた。

念のため、このオープンリーディングフレームの翻訳アミノ酸配列について、既知毒素及び既知アレルゲンとの相同性検索を行い、有意な相同性がないことを確認した。

(参考文献 35、36)

第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

MIR604 は、mCry3A たん白質が発現することによりコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示す。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

mCry3A たん白質及び PMI たん白質について既知毒素との構造相同性を確認するため、データベースの National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (NCBI, 2004) 及び検索プログラムの BLASTP search program (version 2.2.6) (参考文献 32) を用いて検索を行った。その結果、いずれも既知毒素との間に構造相同性は認められなかった。

mCry3A たん白質及び PMI たん白質のマウスの単回投与毒性試験を行った結果、mCry3A たん白質では最大投与量 2,377mg/kg、PMI たん白質では最大投与量 3,030mg/kg でもマウスに有害な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

(1) 人工胃液に対する感受性

MIR604 由来の mCry3A たん白質及び *E. coli* 過剰発現系で発現させた mCry3A たん白質を人工胃液で処理し、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行ったところ、いずれも試験開始後 2 分以内に検出限界以下に消失することが確認された。また、*E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質を人工胃液で処理し、SDS-PAGE 及び酵素活性分析を行ったところ、試験開始後 2 分以内に検出限界以下に消失することが確認され、酵素活性は反応開始後 10 分以内に消失することが確認された。なお、酵素活性分析は、マンノース 6-リン酸を加えた PMI 活性検定反応液中で生じる NADPH の産出量を 340nm の吸光度で測定した。

(2) 人工腸液に対する感受性

mCry3A たん白質は、トリプシン又はキモトリプシン処理によって 55kDa のコアたん白質に消化されるが、このコアたん白質はほとんど消化されないことが明らかであることから、人工腸液を用いた消化試験は行わなかった。また、*E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質を人工腸液で処理し、SDS-PAGE 分析を行ったところ、試験開始後 2 分で検出限界以下に消失することが確認された。

(3) 加熱処理に対する感受性

4、25、37、65、95℃で 30 分間の加熱条件により処理した *E. coli* 過剰発現系で発現させた mCry3A たん白質 (4.0mg/mL) について、ウエスタンコーンルートワームの 1 齢幼虫を用いた生物検定を行ったところ、95℃、30 分間の加熱処理でほぼ殺虫活性が失われ、変性することが確認された。また、25、37、55、65、95℃で 30 分間の加熱条件により処理した *E. coli* 過剰発現系で発現させた PMI たん白質

(0.44mg/mL) について、酵素活性検定を行ったところ、65℃、30 分間の加熱処理でほぼ酵素活性が失われ、変性することが確認された。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

mCry3A たん白質は酵素活性を待たず、宿主の代謝系と独立して機能していることから、植物の代謝系に影響を及ぼさないと考えられた。また、PMI 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触媒酵素たん白質であり、その反応は両物質に対して特異的で、PMI たん白質に対する他の天然基質は知られていない（参考文献 33）。

5 宿主との差異に関する事項

MIR604、対照の非組換えトウモロコシを用いて、穀粒中の主要構成成分（水分、たん白質、脂質、灰分及び炭水化物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、総食物繊維（TDF）、粗繊維、ミネラル（リン、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、クロム、セレン）、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン類、フィチン酸、トリプシンインヒビター、イノシトール、ラフィノース、フルフラール、p-クマル酸、フェルラ酸、フィトステロール（コレステロール、カンペステロール、スチグマステロール、 β -シトステロール）の分析を行った。また、茎葉中の主要構成成分（水分、たん白質、脂質、灰分及び炭水化物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、総食物繊維（TDF）、粗繊維及びミネラル（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛、クロム、セレン）の分析を行った。

その結果、穀粒中の水分、たん白質、炭水化物、酸性デタージェント繊維（ADF）、総食物繊維（TDF）、亜鉛、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、アミノ酸（メチオニン、チロシン、アスパラギン、トレオニン、セリン、グルタミン、アラニン、システイン、バリン、イソロイシン、ロイシン、フェニルアラニン）、脂肪酸（ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸）、ビタミン類（ β -カロテン、クリプトキサンチン、ビタミン B1、ビタミン B3、B6、 α -トコフェロール、 γ -トコフェロール）、フェルラ酸、p-クマル酸、カンペステロール、スチグマステロールにおいて、MIR604 と非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められたが、それらの分析値は文献値の範囲内に収まっていた。また、茎葉中の銅、カリウム、マグネシウムにおいて、MIR604 と非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められたが、比較に用いる文献値は見当たらなかった。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国で行われた MIR604 のほ場試験において、その生存・増殖能力は非組換え品種と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

上記 6 のとおり、MIR604 の生存・増殖能力は非組換えトウモロコシと差異は認められなかったことから、制限要因についても両者の間に変化はないと考えられた。

8 不活化法に関する事項

物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の散布）など、トウモロコシを枯死させる従来の方法によって MIR604 は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局(FDA)に、平成 17 年 2 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、平成 19 年 1 月に安全性が確認されている。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MIR604 と既存のトウモロコシとの相違は、MIR604 がコウチュウ目害虫抵抗性の性質を有する点のみであり、栽培方法は既存のトウモロコシと同様である。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

MIR604 の種子の製法及び管理方法は、既存のトウモロコシと同じである。組換え体の各世代の種子は、シンジェンタシード社（米国）において保存されている。

第 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、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トウモロコシ MIR604 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、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

1. Sekar, V., D. V. Thompson, M. J. Maroney, R. G. Bookland and M. J. Adang (1987) Molecular cloning and characterization of insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. tenebrionis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7036-7040.
2. OECD (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Publication No.6, 2002. ENV/JM/MONO(2002)25.
3. ILSI (2004) International Life Science Institute Crop Composition Database Version 2.0. <http://www.cropcomposition.org>.
4. USDA (2004) National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18. <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=9673>.
5. Watson, S. A. (1987) Structure and Composition. In Corn: Chemistry and Technology. S. A. Watson and P. E. Ranstead (eds). American Association of

Cereal Chemists, Minnesota.

6. Souci, S. W., W. Fachmann and H. Kraut. (1994) Food Composition and Nutrition Tables, 5th edition. CRC Press. Scientific Publishers Stuttgart.
7. Itoh, Y., J. M. Watson, D. Haas and T. Lesinger (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid*, 11: 206-220.
8. Itoh, T. and J. Tomizawa (1978) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, 43: 409-418.
9. Hansen, G., A. Das and M. D. Chilton (1994) Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7603-7607.
10. Murray, E. E., J. Lotzer and M. Eberle (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acid Research*, 17: 477-498.
11. Chen, E. and C. Stacy (2003) Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefore. WO Patent No. 03/018810.
12. Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen (2000) The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803.
13. De Framond, A. J. (1991) A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*). Cloning and characterization. *FEBS*, 290: 103-106.
14. Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689.
15. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman (1982) Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Molecular Applied Genetics*, 1: 561-573.
16. Miles, J. S. and J. R. Guest (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.
17. Hofmann, C., H. Vanderbruggen, *et al.* (1988) Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7844-7848.
18. Van Rie, J., S. Jansens, *et al.* (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *Eur. J. Biochem.*, 186: 239-247.
19. Ogiwara, K., L. Indrasith, *et al.* (1992) Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invert. Pathol.*, 60: 121-126.

20. Knowles, B. H. and J. A. T. Dow (1993) The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action in the insect gut. *BioEssays*, 15: 469-476.
21. Knowles, B. (1994) Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology*, 24: 275-308.
22. Ge, A., D. Rivers, et al. (1991) Functional domains of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. Refinement of *Heliothis virescens* and *Trichoplusia ni* specificity domains on Cry I A(c). *J. Biol. Chem.*, 266: 17954-17958.
23. Li, J., J. Carroll and D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353: 815-821.
24. Koller, C. N., L. S. Bauer and R. M. Hollingsworth (1992) Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin crystal. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 184: 692-699.
25. Slaney, A. C., H. L. Robbins and L. English (1992) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry IIIA: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* and *Diabrotica undecimpunctata howardi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22: 9-18.
26. Chen, X., M. Lee, et al. (1993) Site-directed mutations in a highly conserved region of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin affect inhibition of short circuit current across *Bombyx mori* midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 9041-9045.
27. Gazit, E. and Y. Shai (1993) Structural Characterization, Membrane Interaction, and Specific Assembly within Phospholipid Membranes of Hydrophobic Segments from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* Cytolytic Toxin. *Biochemistry*, 32: 12363-12371.
28. Carroll, J., J. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie and D. J. Ellar (1997). Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A δ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invert. Pathol.*, 70: 41-49.
29. 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. *Micro. Mol. Bio. Rev.*, 62: 775-806.
30. US EPA (1998) Reregistration eligibility decision; *Bacillus thuringiensis*
31. Mendelsohn, M., J. Kough, Z. Vaituzis and K. Matthews (2003) Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology*. 21: 9. 1003-1009.
32. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

33. Freeze, H. H. (2002) Phosphomannose isomerase. *In*: 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.
34. Event MIR604 Flanking Sequences BLAST and ORF Analysis Amended Report No.2
35. Putative Open Reading Frame in the Maize Genomic Sequence Flanking the Transgenic Insert in Event MIR604 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins.
36. Putative Open Reading Frame in the Maize Genomic Sequence Flanking the Transgenic Insert in Event MIR 604 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens.