

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統」に係る安全性確認

I はじめに

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統（以下「MON89034 系統」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）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統
性質 : 害虫抵抗性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

MON89034 系統は、Cry1A.105 たん白質を発現する *cry1A.105* 遺伝子と改変 Cry2Ab2 たん白質を発現する改変 *cry2Ab2* 遺伝子を導入したものであり、主要チョウ目害虫であるヨーロッパシロガナ、サウスウエスタンシロガナ、そしてサザンコーンストークシロガナなどに対する抵抗性が付与されている。

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。MON89034 系統に導入された *cry1A.105* 遺伝子は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*、及び *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に由来し、改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *Kurstaki* 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

MON89034 系統の穀粒の主要構成成分（乾物重%）の平均値は、たん白質 8.54~11.98%、脂質 3.05~3.89%、ADF3.82~7.24%、NDF8.59~12.08%、灰分 1.25~1.56%、炭水化物 83.29~86.52%であり、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）の平均値は、たん白質 6.34~8.98%、脂質 0.63~3.17%、ADF22.60~35.85%、NDF33.99~46.82%、灰分 2.51~4.67%、炭水化物 84.93~89.13%であった。

とうもろこし（乾物重%）の平均値は、たん白質 9.22~11.52%、脂質 3.05~3.75%、ADF4.17~7.00%、NDF8.48~11.75%、灰分 1.28~1.51%、炭水化物 83.58~86.22%であり、茎葉部の主要構成成分（乾物重%）の平均値は、たん白質 6.06~8.87%、脂質 0.77~2.91%、ADF19.93~35.59%、NDF31.44~43.96%、灰分 2.59~5.10%、炭水化物 84.36~89.57%であった。

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON89034 系統と既存のトウモロコシとの相違は、MON89034 系統が Cry1A. 105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の発現によりチョウ目害虫に対して抵抗性を持つ点のみである。これらの点を除けば、MON89034 系統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、MON89034 系統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

MON89034 系統は、Cry1A. 105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の発現によりチョ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主要チョウ目害虫であるヨーロッパコナーラー、サウスウエスタンコナーラー、そしてサザンコーンストークボーラー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、MON89034 系統の作出には LH172 系統を用いた。

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

MON89034 系統の作出には PV-ZMIR245 が用いられた。PV-ZMIR245 は、4 種の間置プラスミドを用いて作出された。

2 性質に関する事項

PV-ZMIR245 の全長は 17,600bp 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、PV-ZMIR245 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

PV-ZMIR245 には、微生物における選抜マーカーとして、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を付与する *aadA* 遺伝子及び形質転換体の選抜マーカーとして、カナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれている。しかし、MON89034 系統中には *aadA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子は含まれていないことが挿入遺伝子の解析の結果確認された。

4 伝達性に関する事項

PV-ZMIR245 は伝達を可能とする配列を含まない。

5 宿主依存性に関する事項

PV-ZMIR245 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

PV-ZMIR245 は、*cryIA. 105* 遺伝子発現カセットと改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットから成る T-DNA I 領域と、*nptII* 遺伝子発現カセットから成る T-DNA II 領域から構築されている。

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

PV-ZMIR245 の中の二つの 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

cryIA. 105 遺伝子は、土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*、及び *B. thuringiensis* var. *aizawai* に由来する。

改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry2Ab2* 遺伝子をもとに、クローニングの際に制限酵素切断部位を付加する為に、N 末端から 2 番目のアミノ酸の後にアスパラギン酸が 1 つ挿入した改変遺伝子である。

(2) 安全性に関する事項

B. thuringiensis subsp. *Kurstaki* 及び *B. thuringiensis* var. *aizawai* は、土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜等に対し病原性等の問題は報告されていない。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

cryIA. 105 遺伝子発現カセットと改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットから成る T-DNA I 領域と、*nptII* 遺伝子発現カセットから成る T-DNA II 領域をもつ PV-ZMIR245 を、アグロバクテリウム法により宿主へ導入した。導入後は、パロモマイシンを含む培地上で再生個体を得た。再生個体を従来品種と交配させ、PCR 法により T-DNA II 領域が分離し T-DNA I 領域のみを持つ個体を選抜した。

3 構造に関する事項

cryIA. 105 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、共にカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の P-*e35S* と P-*35S* で (参考文献 1) で、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットのプロモーターは Figwort mosaic virus 由来の P-*FMV* である (参考文献 2)。

cryIA. 105 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ由来の熱ショックたん白質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域である T-*Hsp17* であり、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*A. tumefaciens* 由来のノバリン合成遺伝子の 3' 末端非翻訳領域である NOS 3' である。

4 性質に関する事項

MON89034 系統に導入された改変 *cryIA. 105* 遺伝子発現カセット、*cry2Ab2* 遺伝子発現カセット及び *nptII* 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
T-DNA I 領域	
B ¹ -Right Border (右側境界領域)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(参考文献 3)。
P ² - <i>e35S</i>	二重エンハンサー領域(参考文献 4)を持つ、カリフラワー35SRNA(参考文献 1)のプロモーターと 9bp リーダー配列。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
L ³ - <i>Cab</i>	コムギ葉緑素 a/b 結合たん白質の 5' 末端非翻訳リーダ領域。目的遺伝子の発現を活性化させる(参考文献 5)。
I ⁴ - <i>Ract1</i>	イネ・アクチン遺伝子のイントロン(参考文献 6)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
CS ⁵ - <i>cryIA. 105</i>	Cry1A. 105 たん白質をコードする遺伝子。
T ⁶ - <i>Hsp17</i>	コムギ熱ショックたん白質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域。転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(参考文献 7)
P- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus 由来の 35S プロモーター(参考文献 2)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
I- <i>Hsp70</i>	トウモロコシ熱ショックたん白質 70 遺伝子の第 1 イントロン(参考文献 8)。目的遺伝子の発現を最適化する。
TS ⁷ - <i>SSU-CTP</i>	トウモロコシのリブコース 1, 5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットの輸送ペプチドで、第 1 イントロン配列を含む(参考文献 9)。下流に連結したたん白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>cry2Ab2</i>	<i>B. thuringiensis</i> に由来する改変 Cry2Ab2 たん白質をコードする遺伝子(参考文献 10)。
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>) 遺伝子の 3' 非転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(参考文献 11)。
B ¹ -Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(参考文献 12)。
T-DNA II 領域	
B-Right Border (右側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列(24bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される(参考文献 3)。
T- <i>nos</i>	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(<i>nos</i>) 遺伝子の 3' 転写領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(参考文献 11)。
CS- <i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(参考文献 13)。ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(参考文献 14)。
P-35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域(参考文献 1)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。

B-Left Border (左側境界領域)	<i>A. tumefaciens</i> に由来する左側境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である(参考文献 12)。
外骨格領域	
OR ¹ - <i>ori V</i>	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(参考文献 15)。
CS- <i>rop</i>	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマーたん白質を抑制するコーディング配列(参考文献 16)
OR ¹ - <i>ori-PBR322</i>	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(参考文献 17)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3' (9)-O-nucleotidyltransferase の細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する(参考文献 18)。

5 純度に関する事項

挿入した遺伝子の塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

6 安定性に関する事項

MON89034 系統の各世代での T-DNA I 領域の安定性を確認するために、MON89034 系の 7 世代のゲノム DNA を PV-ZMIR245 の T-DNA 領域を 1 カ所で切断する制限酵素 *SspI* で切断し、T-DNA I 領域をカバーする 6 つの混合プローブを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、T-DNA I 領域が安定していることが確認された。

MON89034 系統の各世代で T-DNA II 領域が挿入されていないことを確認するために、MON89034 系統の 7 世代のゲノム DNA を制限酵素 *SspI* で切断し、T-DNA II 領域をカバーする 3 つの混合プローブを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、7 世代からは、T-DNA II 領域由来の断片は検出されず、T-DNA II 領域は分離したと結論された。

MON89034 系統の各世代で発現ベクター PV-ZMIR245 の外側骨格領域が挿入されていないことを確認するために、MON89034 系統の 7 世代の各世代のゲノム DNA を制限酵素 *SspI* で切断し、外側骨格領域をカバーする 3 つの混合プローブを用いてサザンブロット分析を行った。発現ベクター PV-ZMIR245 の外側骨格領域は MON89034 系統中に挿入されていないことが確認された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果、*cry1A. 105* 遺伝子発現カセットと改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA I 領域がゲノミック DNA 中の 1 ヶ所に 1 コピー挿入されたことが確認された。また、外側骨格領域と T-DNA II 領域を含めたその他の非意図的な断片が MON89034 系統中に挿入されていないことも確認された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON89034 系統における *Cry1A. 105* たん白質及び改変 *Cry2Ab2* たん白質の発現量を ELISA 法により測定した。*Cry1A. 105* たん白質の発現量の平均値は、若葉で 85 µg/gfw、花粉で

6.4 $\mu\text{g/gfw}$ 、絹糸で 3.0 $\mu\text{g/gfw}$ 、茎葉で 14 $\mu\text{g/gfw}$ 、根部で 2.2 $\mu\text{g/gfw}$ 、穀粒で 5.1 $\mu\text{g/gfw}$ であった。改変 Cry2Ab2 たん白質の発現量の平均値は、若葉で 29 $\mu\text{g/gfw}$ 、花粉で 0.34 $\mu\text{g/gfw}$ 、絹糸で 8.2 $\mu\text{g/gfw}$ 、茎葉で 12 $\mu\text{g/gfw}$ 、根部で 4.1 $\mu\text{g/gfw}$ 、穀粒で 1.1 $\mu\text{g/gfw}$ であった。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

nptII 遺伝子発現カセットは、MON89034 系統には導入されなかったことがサザンブロット及び、ELISA 分析によって確認された。

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

サザンブロット分析及び PCR 分析の結果、MON89034 系統中には *cryIA.105* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットを含む発現ベクターPV-ZMIR245 の T-DNA 領域 1 コピーのみが導入されており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認された。また、挿入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*cryIA.105* 遺伝子の発現を制御する P-*e35S* の 5' 末端領域とそれに隣接する右側境界領域が、相同組換えにより T-DNA II 領域内の左側境界領域と *nptII* 遺伝子の発現を制御する P-*35S* の 5' 末端領域と置き換わっていることが明らかとなった。しかしながら、この相同組換えはたん白質をコードする領域中では起こっておらず、最も近いオープンリーディングフレームである Cry1A.105 たん白のコード領域についても、Cry1A.105 たん白質が各組織で正常に発現していることが確認されていることから、この相同組換えにより新たなオープンリーディングフレームは形成されていないと結論された。

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

MON89034 系統は、Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の発現によりチョウ目害虫に対して抵抗性を持つ。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質と既知毒素との構造相同性を確認するため、GeneBank/EMBL Swissprot に「毒素」として登録されている既知の毒素から成るデータベース TOXIN5 を構築し、FASTA 型アルゴリズムを用いて Cry1A.105 たん白質のアミノ酸配列と比較した。その結果、Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質は、既知毒素との間に構造相同性は認められなかった。

Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質を用いたマウスの単回強制経口投与試験を行った結果、Cry1A.105 たん白質では最大投与量 2,072mg/kg、改変 Cry2Ab2 たん白質では最大投与量 2,198mg/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

E. coli で発現させた Cry1A.105 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、試験開始後 30 秒以内で検出限界 (0.005 μg) 以下に消失する

ことが確認された。*E. coli* で発現させた改変 Cry2Ab2 たん白質についても同様の結果であった。

(2) 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた Cry1A. 105 たん白質を人工腸液で処理し、ウエスタンブロット分析を行ったところ、試験開始 5 分以内で免疫反応が検出限界 (0.1ng) 以下に消失していたが、その分解産物 (約 60、32、30kDa) のバンドは、24 時間後も分解されなかった。なお、トリプシン処理に対して耐性を示すたん白質断片が検出されることは Bt たん白質の特性として知られている。

E. coli で発現させた改変 Cry2Ab2 たん白質を人工腸液で処理し、ウエスタンブロット分析を行ったところ、試験開始 15 分以内で免疫反応が検出限界 (0.5ng) 以下に消失していた。その分解産物 (約 60、55、50、40、12、10kDa) のバンドは、24 時間後も分解されなかったが、トリプシン処理に対して耐性を示すたん白質断片が検出させることは Bt たん白質の特性として知られている。

(3) 加熱処理に対する感受性

穀粒の加工処理段階で用いられる温度条件 (参考文献 19) を考慮して設定した 204°C、20 分間の加熱条件により処理した MON89034 系統中の Cry1A. 105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の免疫反応性は、ウエスタンブロット分析により検出限界以下に消失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

Cry1A. 105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質は、酵素活性を待たないため、代謝経路へ影響を及ぼすことは考えられない。

5 宿主との差異に関する事項

MON89034 系統、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アミノ酸、脂肪酸、無機物(カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛)、主要構成成分(灰分、炭水化物、総脂質、水分、たん白質)、繊維質(酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)、総食物繊維質(TDF))、ビタミン、抗栄養素、そして二次代謝産物の分析を行った。また、茎葉中の、主要構成成分(灰分、炭水化物、総脂質、水分、たん白質)、繊維質(酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF))、無機物(カルシウム、リン)の分析を行った。

その結果、穀粒では脂肪酸のステアリン酸及びアラキジン酸において、茎葉ではリンにおいて MON89034 系統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、その分析値は同時に栽培した 15 品種の従来商業トウモロコシ品種の許容区間(99%T. I)におさまっており、国際生命科学協会(ILSI: International Life Science Institute)が作成したトウモロコシにおける構成成分のデータベース(ILSI-CCD, 2006)の範囲内であった。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国及びカナダで行われた MON89034 系統のほ場試験において、その生存・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。

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、MON89034 系統の生存・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 MON89034 系統は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国環境保護庁には 2006 年 9 月に Cry1A. 105 たん白質の残留基準値設定免除の申請を行った。米国食品医薬品局 (FDA) には、2006 年 10 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。米国農務省 (USDA) には、2006 年 10 月に無規制栽培 (商業栽培) のための申請を行った。

カナダ保健省 (Health Canada) には、2006 年 11 月 24 日に食品としての安全性審査の申請を行った。カナダ農務省 (CFIA) には、2006 年 11 月 24 日に飼料・環境の安全性審査の申請を行った。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ) には、2006 年 12 月 14 日に食品としての安全性審査の申請を行った。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON89034 系統と既存のトウモロコシとの相違は、MON89034 系統がチョウ目害虫抵抗性の性質を有する点のみであり、栽培方法等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

MON89034 系統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。本申請のため各分析に用いた世代の種子は、モンサント・カンパニー Chesterfield 研究所 (St. Louis, MO) において、その発芽能力が長期間 (5~10 年) 維持されるような条件下で管理されている。

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、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

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 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、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. Rogers, S.G. Promoter for transgenic plants. 2000. United States Patent No. 6,018,100.
2. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski, and H.M. Goodman. 1982. Nopaline Synthase: Transcript Mapping and DNA Sequence. J. Molec. Appl. Genet. 1: 561-573.
3. Kay, R., A. Chan, M. Daly, and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences created a strong enhancer for plant genes. Science. 236: 1299-1302.
4. Odell, J. T., Mag, F. and Chua, H. H. 1985. Identification of DNA sequences required for

activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-12.

5. Lippa G., G. Morelli and N. Chua. 1985. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. Mol. Cell. Biol. 5:1370-1378.
6. McElroy, D., A.D. Blowers, B. Jeness, and R. Wu. 1991. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. Mol. Gen. Genet. 231: 150-160.
7. McElwain, E. and S. Spiker. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. Nucl. Acids Res. 17: 1764.
8. Brown, S.M. and C.G. Santino. 1995. Enhanced expression in plants. United States Patent No. 5,424,412.
9. Matsuoka, M., Y. Kano-Murakami, Y. Tanaka, Y. Ozeki, and N. Yamamoto. 1987. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from maize. J. Biochem. 102(4): 673-676.
10. Widner, W.R. and H.R. Whitely. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. 171(2): 965-974.
11. Bevan, M., Barnes, W. M., and Chilton, M. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucl. Acids Res. 11: 369-385.
12. Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson, and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide Sequence of the T-DNA Region from the *Agrobacterium tumefaciens* Octopine Ti Plasmid pTi15955. Plant Mol. Biol. 2: 335-350.
13. Beck, E., Ludwig, G., Auerwald, 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.
14. Fraley, R. T., *et al.*, and Woo, S. C. 1983. Expression of Bacterial Genes in Plant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 4803-4807.
15. Stalker, D.M., C.M. Thomas, and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Mol. Gen. Genetics. 181: 8-12.
16. Giza, P.E. and R.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.
17. Sutcliffe, J.G. 1978. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Symposia on Quantitative Biology. 43:77-103.
18. Fling, M., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-O-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Res. 13: 7095-7106.