

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ
Event 5307 系統**

**平成 25 年 2 月 7 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	4
(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	5
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	5
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	5
(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	6
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
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	7
(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	7
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	8
(3) 構造に関する事項	8
(4) 性質に関する事項	8
(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	12
(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	12
(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	13
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	14
(5) 宿主との差異に関する事項	14
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	15
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	15
(8) 不活化法に関する事項	15
(9) 外国における認可等に関する事項	15
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	16
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	16
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	16
IV 審議結果	16
V 参考文献及び参考資料	16

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event 5307 系統」に係る安全性確認

I はじめに

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event 5307 系統（以下「5307 トウモロコシ」という。）について、平成 23 年 7 月 6 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トウモロコシ Event 5307 系統

性 質：コウチュウ目害虫抵抗性

申請者：シンジェンタジャパン株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

5307 トウモロコシは、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* の *cry3A* 遺伝子に由来する改変 *cry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製した *ecry3.1Ab* 遺伝子を導入したトウモロコシである。*ecry3.1Ab* 遺伝子によって産生される eCry3.1Ab たん白質は、トウモロコシ栽培で発生する Western corn rootworm 等のコウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示す。

また、5307 トウモロコシには、形質転換体の選択マーカーとして、*Escherichia coli* K-12 株に由来するマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pmi* 遺伝子)が導入されている。*pmi* 遺伝子によって産生される PMI たん白質により、マンノースを炭素源として利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換できるようになるため、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。

5307 トウモロコシと既存のトウモロコシを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そのため、5307 トウモロコシに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料としての安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、5307 トウモロコシについては、飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、一般に、トウモロコシは主にその穀粒が飼料に利用される他、食品分野及び工業分野から生じる副産物(コーングルテンミール、コーングルテンフィード及びトウモロコシジスチラーズグレインソリュブル(DDGS)等)も同様に飼料として利用されている。

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

宿主に用いられた植物は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Zea mays* L.)でありデント種に属する。

45 eCry3.1Ab たん白質をコードする *ecry3.1Ab* 遺伝子は、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* の *cry3A* 遺伝子に由来する改変 *cry3A* 遺伝子(以下、*mcry3A* 遺伝子という。)及び *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製されている。PMI たん白質をコードする *pmi* 遺伝子の供与体は、*E. coli* K-12 株である。

50 (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は、世界各国において飼料として長期にわたり利用されている(農学大辞典, 1991、FAO, 2011、財務省, 2011)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

55 5307 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(White and Pollak, 1995、OECD, 2002、ILSI, 2010、参考資料 21)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

60 5307 トウモロコシは、eCry3.1Ab たん白質を発現することによりコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与されている。また、*ecry3.1Ab* 遺伝子を含む植物体の選抜を容易にする目的で、マンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子である *pmi* 遺伝子が導入されている。これらの点を除けば、5307 トウモロコシ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(可食)部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について既存のトウモロコシと相違はない。

以上(1)～(4)により、5307 トウモロコシの飼料としての安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

70 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

5307 トウモロコシは、eCry3.1Ab たん白質を発現することにより、トウモロコシに被害を及ぼす Western corn rootworm、Northern corn rootworm 及び Mexican corn rootworm 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。

飼料としての利用目的や利用方法は、従来 of トウモロコシと相違はない。

75

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(*Zea*)属のトウモロコシ(*Zea mays* L.)でありデント種に属する。

80

(2) 遺伝的先祖に関する事項

一般には、紀元前 5000 年のメキシコ又はグアテマラが原産地と考えられ、育種過程において近縁野生種である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(Galinat, 1988)。

(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、栄養学的に有害と考えられる量の有害生理活性物質の生産は知られていない(White and Pollak, 1995)。

(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、それを食する家畜等に寄生または定着することはない。

(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

トウモロコシにはウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られているが(OECD, 2003)、これらの外来因子を摂取することによるヒトや家畜への病原性は知られていない(Martelli, 2001)。

(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、自然環境で生存又は繁殖したという報告は知られていない。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

一般に、トウモロコシは春に播種されて秋に収穫される夏作の一年生作物である。また、受粉は風媒によって行われ、稔実種子のほとんどは他家受粉による(農学大辞典, 1991)。

トウモロコシの近縁種はブタモロコシとトリプサカム属であるが、自然環境下でトウモロコシと交雑可能なのはブタモロコシのみで、トリプサカム属との交雑は困難である(OECD, 2003)。なお、ブタモロコシが我が国で自生しているという報告はない。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

トウモロコシの栽培は、一般的には紀元前 5000 年の中南米から始まったと考えられ、現在、北緯 55 度から南緯 40 度に至る範囲で世界的に栽培されている(農学大辞典, 1991)。

我が国へは、初めに 1579 年にポルトガル人により長崎又は四国に導入され、明治時代に近代的な品種が米国から輸入されるようになって以来、全国的に栽培されるようになったとされている(菊池, 1987)。

このような栽培の歴史を通じ、トウモロコシは世界的に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

(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。

125

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

トウモロコシの種子は包葉で覆われた雌穂中に形成されるために自然に脱粒することはない(OECD, 2003)。また、トウモロコシは人為的に高度に改良された作物種であり、自然条件下で独自に自生し、増殖する能力は失われている(OECD, 2003)。また、物理的防除法(耕耘)や化学的防除法(感受性を示す除草剤の使用)によって、トウモロコシは容易に枯死・不活化される。

130

(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はブタモロコシとトリプサカム属であるが、いずれも有害生理活性物質の生産は報告されていない(Watson, 1987, Galinat, 1988)。

135

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

5307 トウモロコシの作出に用いた導入用プラスミド pSYN12274 は、Danisco Biotechnology 社のバイナリー・ベクター pVictor 由来の pNOV2114 を用いて構築された。

140

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 の全塩基数は 11,769 bp であり、その塩基配列は明らかにされている。既知の有害塩基配列を含まない(参考資料 1)。

145

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 には、抗生物質耐性マーカーとして *E. coli* Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が含まれている。*aadA* 遺伝子にコードされるストレプトマイシンアデニリルトランスフェラーゼによって、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性が付与される(Fling *et al.*, 1985)。なお、*aadA* 遺伝子は導入用プラスミドの導入遺伝子領域以外の領域(外側骨格領域)に存在するが、この領域は 5307 トウモロコシには含まれていないことが確認されている(5 (6) 「コピー数に関する事項」参照)。

150

155

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

160

(5) 宿主依存性に関する事項

上記(4)に記載の通り、家畜等が導入用プラスミド pSYN12274 の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

165 5307 トウモロコシの作出に用いた導入用プラスミド pSYN12274 は基本ベクター-pVictor を基に作成した。導入用プラスミド pSYN12274 には、*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットが挿入されている。

(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

170 導入用プラスミド pSYN12274 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入している。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

175 ①名称、由来及び分類に関する事項

a. *ecry3.1Ab* 遺伝子

ecry3.1Ab 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* の *cry3A* 遺伝子を改変した *mcry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製された遺伝子で、トウモロコシのコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す eCry3.1Ab たん白質をコードしている。

180 *ecry3.1Ab* 遺伝子の基となった *mcry3A* 遺伝子は、標的コウチュウ目害虫に対する殺虫活性を高めるため、Cry3A たん白質のアミノ酸残基のうち、155 番目のバリリン、156 番目と 157 番目のセリンを、カテプシン G プロテアーゼ (キモトリプシン様セリンプロテアーゼ) の認識配列である、アラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニン(AAPF)の 4 アミノ酸に改変し、宿主であるトウモロコシでの発現に最適な塩基配列(Murray *et al.*, 1989)に置換・人工合成した遺伝子である(Chen and Stacy, 2007)。なお、*mcry3A* 遺伝子は、安全性確認済みの MIR604 トウモロコシへ導入されており、既に導入遺伝子としての安全性が確認されている。

190 *cry1Ab* 遺伝子は、チョウ目害虫に殺虫活性を示す Cry1Ab たん白質をコードしており、宿主であるトウモロコシでの発現に最適な塩基配列(Murray *et al.*, 1989)に置換・人工合成された遺伝子である(Kozziel *et al.*, 1997)。なお、*cry1Ab* 遺伝子は、安全性確認済みの Bt11 トウモロコシへ導入されており、既に導入遺伝子としての安全性が確認されている。

b. *pmi* 遺伝子

195 *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コードする *manA* 遺伝子である(Miles and Guest, 1984、Entrez Accession Number M15380)。

②安全性に関する事項

200 *ecry3.1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* に対するヒトの食経験はないが、微生物農薬の有

効成分として安全に利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されていない。

pmi 遺伝子の供与体である *E. coli* は自然界や動物の消化器官に広く存在していることが知られており、これまで家畜等は飼料を通じて間接的に摂取している。また、*pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株について、動物に対する毒性は否定されている (Smith, 1975、Levy *et al.*, 1980、Muhldorfer and Hacker, 1994、US EPA, 1997)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

宿主への導入方法にはアグロバクテリウム法を用いている。まず、導入用プラスミド pSYN12274 を含む *Agrobacterium* をトウモロコシの未熟胚に接種した。その後、マンノースを添加した組織培養培地で形質転換体を選抜し、再生個体を得た。なお、トウモロコシ細胞に残存する *Agrobacterium* の除菌のため、用いた培地には抗生物質 cefotaxime を添加した。得られた再生個体について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の存在を確認した。遺伝子の導入が確認された個体を用い、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従い、既存の優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配あるいは自殖を行うことで後代を維持しながら、各種分析及び評価を行い、5307 トウモロコシを最終的な商品化系統として選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

5307 トウモロコシへ導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子は、Cestrum yellow leaf curling virus 由来の CMP プロモーターによりその発現を制御されている (Hohn *et al.*, 2007)。

また、5307 トウモロコシへ導入された *pmi* 遺伝子は、トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域を含む ZmUbiInt プロモーターによりその発現が制御されている (Christensen *et al.*, 1992)。

② ターミネーターに関する事項

ecry3.1Ab 遺伝子及び *pmi* 遺伝子のターミネーターに用いられた NOS ターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) の nopaline synthase 遺伝子由来のポリアデニル化配列 (Depicker *et al.*, 1982) であり、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子からの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

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 pSYN12274 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。各構成要素の機能は次項のとおり。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 導入用プラスミド pSYN12274 の各構成 DNA の由来及び機能

構成 DNA	由来及び機能
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子発現カセット	
CMP プロモーター	Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター領域。目的遺伝子を恒常的に発現させる(Hohn <i>et al.</i> , 2007)。
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子	<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子は、トウモロコシのコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す eCry3.1Ab たん白質をコードする遺伝子である。詳細は表外に記載した。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) の nopaline synthase 遺伝子由来の転写終結を指令するポリアデニル化シグナルを含む配列(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域を含む単子葉植物用プロモーター配列 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>pmi</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子(Miles and Guest, 1984、Entrez Accession Number M15380)。形質転換体の選抜マーカーであるマンノースリン酸イソメラーゼ(phosphomannose isomerase)をコードする(Negrotto <i>et al.</i> , 2000)。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) の nopaline synthase 遺伝子由来の転写終結を指令するポリアデニル化配列(Depicker <i>et al.</i> , 1982)。

① *ecry3.1Ab* 遺伝子の機能

250 *ecry3.1Ab* 遺伝子は、グラム陽性土壌細菌である *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* 由来の *cry3A* 遺伝子を改変した *mcry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry1Ab* 遺伝子を基に作製された遺伝子で、*mcry3A* 遺伝子のドメイン I 領域、ドメイン II 領域及び一部のドメイン III 領域、並びに *cry1Ab* 遺伝子のドメイン III 領域及びそれ以降の領域で構成されている。Cry1 や Cry3 たん白質を含む大部分の Cry たん白質には、

255 Conserved Block(CB)と呼ばれる、高いアミノ酸配列の相同性を示す領域と、Variable Region(VR)と呼ばれる多様性に富んだ配列の領域とが存在する。CB 構造の保持が Cry の基本的特性の維持には重要と考えられることから、これらの構造を保持したまま、mCry3A たん白質及び Cry1Ab たん白質を置換してキメラたん白質を作成し、コウチュウ目害虫への殺虫活性を持つ

260 eCry3.1Ab たん白質を選抜した。eCry3.1Ab たん白質は、CB1 から CB3 が mCry3A たん白質に、CB3 以降が Cry1Ab たん白質に由来する。

これまでの研究から、既知の Cry たん白質は一部の例外を除き 3 つのドメインからなる類似した立体構造を有することが知られている(Li *et al.*, 1991、Grochulski *et al.*, 1995、de Maagd *et al.*, 2001、Pigott and Ellar, 2007)。

265 eCry3.1Ab たん白質においては、ドメイン I、II 及びドメイン III の一部(CB3 まで)がコウチュウ目害虫に殺虫活性を持つ mCry3A たん白質に由来し、ドメイン III の一部以降(CB3 から)がチョウ目害虫に殺虫活性を持つ Cry1Ab たん

白質に由来しており、これらのドメイン構造も保持されていることから、CB
と VR の位置関係に変わりはなく、従来の Cry たん白質と同様の立体構造及
び基本的特性を持つと考えられる。

一般に Cry たん白質は、特定の昆虫種に対して殺虫活性を示すことが知ら
れている。感受性昆虫種が Cry たん白質を摂取すると、特定の大きさの活性
ポリペプチド(コアたん白質)を生じ、中腸上皮細胞の特異的受容体に結合して
イオンチャネルを形成し、消化器官が損傷を受けて摂食障害を起こし、死に
至ることが知られている(Sacchi *et al.*, 1986、Wolfersberger *et al.*, 1986、
Hofmann *et al.*, 1988a and 1988b、Van Rie *et al.*, 1989 and 1990、English
and Slatin, 1992、Schnepf *et al.*, 1998、Broderick *et al.*, 2006)。

なお、eCry3.1Ab たん白質の N 末端のアミノ酸配列は、mCry3A たん白質
の N 末端のアミノ酸配列とは異なる。これは、*ecry3.1Ab* 遺伝子構築の際に
5'末端に付加した 40bp のポリリンカー配列に由来する開始コドンからたん
白質の翻訳が始まるためである。*mcry3A* 遺伝子の最初の 27bp にコードされる
アミノ酸以降は、mCry3A たん白質と一致している。

eCry3.1Ab たん白質の上流側には、22 個のアミノ酸残基があり、続く 459
残基は mCry3A たん白質のアミノ酸配列と同一であり、その後ろに Cry1Ab
たん白質と同一の 172 アミノ酸が続いている。eCry3.1Ab たん白質の大き
さは 653 アミノ酸残基から成り、約 73.7 kDa である。

② *pmi* 遺伝子の機能

pmi 遺伝子によって産生される 391 のアミノ酸から成る PMI たん白質は、
E. coli のマンノースリン酸イソメラーゼ(phosphomannose isomerase)であり、
5307 トウモロコシ作出において形質転換体の選抜マーカーとして用いられた
(Negrotto *et al.*, 2000)。トウモロコシを含む多くの植物細胞は、生育する上
でマンノースを炭素源として利用することはできないが、*pmi* 遺伝子が導入
されて PMI たん白質を産生する細胞では、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って、形質転換体の選抜が可能となる。

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 は、その T-DNA の外骨格領域に細菌選抜マ
ーカー遺伝子として *aadA* 遺伝子を有しており、細菌によるベクターの選抜及び増
殖を通じて純化されている。

(6) コピー数に関する事項

5307トウモロコシにおける導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、導入遺伝子発
現カセットの完全性及び導入遺伝子領域以外の領域(外側骨格領域)の有無を確認す
るため、サザンブロット分析を実施した。その結果、5307トウモロコシ中のゲノ
ムDNAの1ヶ所に、*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び*pmi* 遺伝子発現カセット
を持つT-DNA領域が1コピー導入されていることが確認された。また、
pSYN12274の外側骨格領域由来の遺伝子断片が導入されていないことが確認され

た(参考資料4)。なお、導入遺伝子の塩基配列解析を行った結果、導入用プラスミドpSYN12274のT-DNA領域の各構成要素の塩基配列と一致していることが確認された。なお、CMPプロモーターの49 bp上流の非翻訳領域に1ヶ所の塩基の置換が認められたが、非翻訳領域であるため、この塩基置換による挿入遺伝子への影響はないと考えられた(参考資料5)。

次に、導入遺伝子挿入部位の5'及び3'末端近傍配列解析(各1,000bp)を行った結果、遺伝子の挿入に伴いトウモロコシ内在性配列に33 bpの欠損があったが、近傍配列はトウモロコシのゲノム配列と一致しており、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Non-redundant (nr) protein databaseを対象に実施したBLASTx解析により挿入部位における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が確認された(参考資料6, 7, 8)。

(7) 安定性に関する事項

導入遺伝子が複数世代に安定して遺伝しているか確認するため、2世代の5307トウモロコシから得られたゲノムDNAを用いて、サザンブロット分析を実施したところ、*ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットを持つT-DNA領域のみ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(参考資料3)。

また、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3世代の5307トウモロコシを用いてPCR分析によりT-DNA領域の分離比を算出し、カイ二乗検定により期待値との比較を実施したところ、5307トウモロコシ中の導入遺伝子がメンデルの法則に従って後代に遺伝していることが確認された(参考資料2)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

米国の計4ヶ所の試験圃場で栽培した5307トウモロコシから、異なる生育時期に葉、根、子実(穀粒)及び全植物体の分析サンプルを調製し、ELISA法によってeCry3.1Abたん白質及びPMIたん白質の発現量を分析した(参考資料9)。

その結果、いずれの生育時期においてもeCry3.1Abたん白質及びPMIたん白質が発現していることが確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミドpSYN12274のT-DNA領域の外骨格領域には、本ベクターの細菌中での選抜・維持のために抗生物質耐性マーカー遺伝子(*aadA*)が組み込まれているが、5の(6)「コピー数に関する事項」に記載したとおり、作出された5307トウモロコシにはこの外骨格領域は存在しないことが確認されている。

(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

挿入遺伝子及び両近傍配列(近傍配列各1,000bp及び挿入配列)の接合部において意図しないオープンリーディングフレーム(ORF)が形成されるかどうかについて分析した。ORFは30以上の連続するアミノ酸を持ち、終止コドンから終止コ

350 ドンまでの領域と定義し、挿入遺伝子と両近傍配列の接合部に対して、センス方
向、アンチセンス方向のそれぞれ読み枠をずらした 3 フレームについて Vector
NTI Advance™ (version 10.3.0)を用い検索した。その結果、計 6 個の ORF が検
出されたが、公的に利用できるデータベース(NCBI Entrez® Protein Database)
355 を対象に、BLASTp により既知のたん白質との相同性を検索したところ、既知の
毒素たん白質との相同性は認められなかった(参考資料 10)。

さらに、両近傍配列(1,000 bp)に既知のたん白質と相同性を持つ領域が存在す
るか、NCBI Non-redundant (nr) protein sequence を対象に、BLASTx により検
索を行ったところ、既知の毒素たん白質等との相同性は見いだされなかった(参考
資料 8)。

360 以上のことから 5307 トウモロコシにおいて、遺伝子導入により毒素たん白質
等が発現している可能性は極めて低いと考えられる。

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

365 5307 トウモロコシでは、導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子と *pmi* 遺伝子によって、
それぞれ eCry3.1Ab たん白質と PMI たん白質が発現している。eCry3.1Ab たん
白質の発現によりコウチュウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。この点を
除けば、5307 トウモロコシは従来のトウモロコシ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。

370

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

①eCry3.1Ab たん白質

eCry3.1Abたん白質と既知の毒素たん白質との構造相同性を確認するため、
NCBI Entrez Protein Database (NCBI, 2010)を対象にblastp search program
375 (version 2.2.8) (Altschul *et al.*, 1997)を用いて検索を行った。その結果、他の*B.*
*thuringiensis*由来の δ -エンドトキシン¹を除き、eCry3.1Abたん白質と有意な構
造相同性を持つ既知の毒素たん白質は見いだされなかった(参考資料 11)。

また、コウチュウ目昆虫のレセプターに対する結合性試験(Walters *et al.*,
2010)、コウチュウ目、チョウ目、カメムシ目昆虫に対する殺虫スペクトラムの
380 調査(参考資料 22)、その他の非標的生物に対する影響評価試験(参考資料 22)及
びは乳動物細胞を用いた細胞毒性試験(参考資料 23)により、eCry3.1Ab たん白
質が特定のコウチュウ目昆虫のみに特異的に作用し、ほ乳動物等の非標的生物
に対して毒性影響を示す可能性は低いことが確認されている。

②PMI たん白質

385 PMI たん白質と既知の毒素たん白質との構造相同性について、eCry3.1Ab た
ん白質と同様の手法を用いて評価した。その結果、PMI たん白質と有意な構造
相同性を持つ既知の毒素は存在しないことが確認された(参考資料 12)。

¹ δ -エンドトキシン：Cry たん白質あるいは殺虫性結晶たん白質としても知られている。

390 (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

以下の物理化学的処理に対する感受性評価試験には、*E. coli* 過剰発現系によって産生・純化した eCry3.1Ab たん白質及び PMI たん白質を用いた(参考資料 13, 17)。なお、試験に用いたたん白質と 5307 トウモロコシによって産生されたたん白質との同等性は、eCry3.1Ab たん白質については、見かけの分子量、免疫学的反応、殺虫活性、グリコシル化反応、部分アミノ酸配列及び N 末端アミノ酸配列を評価することにより確認し(参考資料 13)、PMI たん白質については、見かけの分子量、免疫学的反応及び酵素活性を評価することで確認している(参考資料 14)。

① 人工胃液に対する感受性

a. eCry3.1Ab たん白質

eCry3.1Ab たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、反応開始 30 秒後には完全な eCry3.1Ab たん白質のバンドは検出されなくなった(参考資料 15)。これらの結果から、eCry3.1Ab たん白質は人工胃液中で速やかに分解されることが示された。

b. PMI たん白質

PMI たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、反応開始 1 分後には完全な PMI たん白質のバンドは検出されなくなった(参考資料 16)。これらの結果から、PMI たん白質は人工胃液中で速やかに分解されることが示された。

② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

a. eCry3.1Ab たん白質

eCry3.1Ab たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、約 74.8 kDa の完全長 eCry3.1Ab たん白質は、反応開始 1 分後に約 62 kDa、56 kDa 及び 6 kDa のポリペプチド断片に速やかに分解され、それ以降、約 62 kDa のポリペプチド断片は反応開始 30 分後に、6 kDa ポリペプチド断片は反応開始 60 分後に検出されなくなった。また、約 40 kDa のポリペプチド断片が反応開始 60 分後に、5 kDa のポリペプチド断片が反応開始 5 分後に生じた。56 kDa、40kDa 及び 5kDa のポリペプチド断片は反応開始 48 時間後でも検出され、人工腸液中では消化が進まないことが確認された(参考資料 17)。

b. PMI たん白質

PMI たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を SDS-PAGE 分析とウエスタンブロット分析で評価した。その結果、反応開始 15 分後には完全な PMI たん白質及びバンドは検出されなくなった(参考資料 18)。これらの結果から、PMI たん白質は人工腸液中で速やかに分解されることが示された。

③ 加熱処理

a. eCry3.1Ab たん白質

加熱処理に対する感受性を ELISA 分析により評価した結果、eCry3.1Ab たん白質は、65℃、30 分間の処理で免疫反応活性が検出限界値以下になり、加熱処理に対して安定でないことが示された(参考資料 19)。

b. PMI たん白質

加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、PMI たん白質は 95℃、30 分間の処理で免疫反応活性が定量限界値以下になり、加熱処理に対して安定でないことが示された(参考資料 20)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① eCry3.1Ab たん白質

eCry3.1Ab たん白質が酵素活性を持つとは考えられておらず、宿主の代謝系と独立して機能していることから、植物の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

② PMI たん白質

pmi 遺伝子によって発現する 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、その反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、PMI たん白質に対する他の天然基質は知られていない(Freeze, 2002)。

以上のことから、eCry3.1Ab たん白質及び PMI たん白質の発現が、宿主植物の代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

2008 年に 6 ヶ所のほ場において 5307 トウモロコシと非組換えトウモロコシの栽培試験を実施し、収穫された茎葉及び穀粒を用いて各種構成成分の分析を行った(参考資料 21)。

① 主要構成成分

茎葉及び穀粒の主要構成成分(水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維、並びに総食物繊維及びデンプン(穀粒のみ))について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等であった。

② 脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸組成について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等又は文献に記載された分析値(ILSI, 2010)の範囲内で

あった。

③ アミノ酸組成

475

穀粒のアミノ酸組成について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等であった。

④ ミネラル類

480

茎葉及び穀粒のミネラル類(茎葉：カルシウム及びリン、穀粒：カルシウム、リン、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、カリウム、セレン、ナトリウム及び亜鉛)について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等であった。

⑤ ビタミン類

485

穀粒のビタミン類について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等又は文献に記載された分析値(ILSI, 2010)の範囲内であった。

⑥ 有害生理活性物質

490

穀粒の有害生理活性物質(フィチン酸、イノシトール、トリプシンインヒビター及びラフィノース)及びその他の成分(フェルラ酸、*p*-クマル酸及びフルフラール)について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えトウモロコシと同等であった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

495

これまでに米国で行われた野外ほ場試験を通じて、5307 トウモロコシの生存・増殖能力(種子休眠性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性及び種子の生産量・脱粒性)は、対照の非組換えトウモロコシと同程度であることが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

500

5307 トウモロコシの生殖・増殖能力について、対照の非組換えトウモロコシとの間で差異は観察されていないことから、生殖・増殖能力の制限要因は従来の非組換えトウモロコシと同様であると考えられる。

(8) 不活化法に関する事項

505

5307 トウモロコシも既存の非組換え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)等、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

510

2011 年 4 月にカナダ保健省(Health Canada)へ食品としての、またカナダ食品検査庁(CFIA)へ環境・飼料としての安全性審査のための申請を行った。

2012 年 2 月に米国食品医薬品庁(FDA)で食品・飼料としての安全性審査が終了した。

515

2012 年 4 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)で食品としての安全性審査が終了した。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

520

5307 トウモロコシと既存のトウモロコシとの相違は、5307 トウモロコシにコウチュウ目害虫に対する抵抗性が付与されている点のみであり、栽培方法に関して既存のトウモロコシとの相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

525

5307 トウモロコシにおける種子の製法及び管理方法については、既存のトウモロコシと相違はない。

- 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。

530

IV 審議結果

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event 5307 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。

535

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, 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.
- 2 Broderick, N.A., Raffa, K.F. and Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 15196-15199.
- 3 Chen E and C. Stacy. 2007. Modified Cry3A toxins and nucleic acid sequences coding therefor. U.S. Patent No. 7,276,583. Washington, DC: U.S. Patent Office.
- 4 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.
- 5 de Maagd, R. A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genet. 17: 193-199.
- 6 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.

- 7 English, L. and Slatin, S.L. 1992. Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22: 1-7.
- 8 FAO. 2011. Food and Agriculture Organization (of the United Nations) <http://faostat.fao.org/>.
- 9 Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 13: 7095-7106.
- 10 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.
- 11 Galinat, W. C. 1988. The origin of corn. *Corn and corn improvement*. G.F Sprague and J.W. Dudley, Eds. *Agronomy Monographs No.18*; pp. 1-31. American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin.
- 12 Grochulski, P., L. Masson, S. Borisova, M. Pusztai-Carey, J.-L. Schwartz, R. Brousseau and M. Cygler. 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA(a) Insecticidal Toxin: Crystal Structure and Channel Formation. *J. Mol. Biol.* 254: 447-464.
- 13 Hofmann, C., Luthy, P., Hütter, R. and Pliska, V. 1988a. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173: 85-91.
- 14 Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Jansens, S. and Van Mellaert, H. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-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.
- 15 Hohn T, L. Stabolone, P. De Haan, H. Ligon and M. Kononova. 2007. Cestrum yellow leaf curling virus promoters. U.S. Patent No.7,166,770. Washington DC: U.S. patent Office.
- 16 ILSI. 2010. International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 4.1. <http://www.cropcomposition.org>.
- 17 Koziel M. G., N. M. Desai, K. S. Lewis, V. C. Kramer, G. W. Warren, S. V. Evola, L. D. Crossland, M. S. Wright, E. J. Merlin, K. L. Launis, S. J. Rothstein, C. G. Bowman, J. L. Dawson, E. M. Dunder, G. M. Pace and J. L. Suttie. 1997. Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. Ciba-Geigy, assignee. U.S.Patent No. 5,625,136. Washington, DC: U.S. Patent Office.
- 18 Levy, S. B., Marshall, B., Rowse-Eagel, D. and Onderdonk, A. 1980. Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*, 209:391-394.
- 19 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.
- 20 Martelli, G. P. 2001. Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J. Plant Pathol.* 82:37-46.

- 21 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.
- 22 Muhldorfer, I. and J. Hacker. 1994. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*, 16:171-81.
- 23 Murray, E. E., J. Lotzer and M. Eberle. 1989. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 17: 477-498.
- 24 NCBI. 2010. National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- 25 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.
- 26 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. ENV/JM/MONO(2002)25. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.6. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 27 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (Maize). ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 28 Pigott, C. R. and D. J. Ellar. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Micro. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- 29 Sacchi, V.F., Parenti, P., Hanozet, G.M., Giordana, B., Luthy, P. and Wolfersberger, MG. 1986. *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *Federation of European Biological Society Letters*, 204: 213-218.
- 30 Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775-806.
- 31 Smith, H. W. 1975. Survival of orally administered *E. coli* K-12 in alimentary tract of man. *Nature*, 255:500-502.
- 32 US EPA. 1997. *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm.
- 33 Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. *European Journal of Biochemistry*, 186: 239-247.
- 34 Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1378-1385.

- 35 Walters, F. S., de Fontes, C. M., Hart, H., Warren, G. W. and Chen, J. S. 2010.
Lepidopteran-active variable-region sequence imparts coleopteran activity in eCry3.1Ab,
an engineered *Bacillus thuringiensis* hybrid insecticidal protein. Appl Environ Microbiol.
76:3082-3088.
 - 36 Watson, S.A. 1987. Structure and Composition. Corn: Chemistry and Technology. S. A.
Watson and P.E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota.
 - 37 White, P. J. and L. M. Pollak. 1995. Corn as a food source in the United States: Part II.
Processes, Products, Composition and Nutritive values. Cereal Foods World, 40: 756-
762.
 - 38 Wolfersberger, M.G., Hofmann, C. and Luthy, P. 1986. Interaction of *Bacillus*
thuringiensis delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval
midgut. pp. 237-238. Bacterial Protein Toxins. Falmagne, P., Fehrenbech, F.J.,
Jeljaszewics, J. and Thelestam, M. (eds.). Gustav Fischer, New York.
 - 39 菊池一徳. 1987. トウモロコシの生産と利用. 光琳.
 - 40 財務省貿易統計. 2011. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>.
 - 41 野口弥吉, 川田信一郎. 1991. 農学大事典. 養賢堂.
- 参考資料（申請者提出 社外秘）
- 1 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-161-10 A1.
Study Title: Plasmid pSYN12274: Plasmid Lineage Analysis and Sequence
 - 2 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-203-10 A1.
Study Title: Event 5307 Maize: Mendelian Inheritance Analysis
 - 3 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-175-11.
Study Title: Event 5307 Maize: Southern Blot Analysis of Maize
 - 4 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-189-10 A2.
Study Title: Event 5307 Maize: Copy Number Functional Element Southern Blot Analysis
 - 5 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-159-10 A1.
Study Title: Event 5307 Maize: Insert Sequence Analysis
 - 6 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-160-10.
Study Title: Event 5307 Maize: Flanking Sequence Determination
 - 7 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-202-10 A1.
Study Title: Event 5307 Maize: Genomic Insertion Site Analysis
 - 8 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-205-10.
Study Title: Event 5307 Maize: Basic Local Alignment Search Tool for Translated
Nucleotides (BLASTX) Analysis of Maize Genomic Sequences Flanking the Insert
 - 9 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-016-09 A2.
Study Title: Quantification of eCry3.1Ab and Phosphomannose Isomerase in Maize
Tissues Derived from Transformation Event 5307
 - 10 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-185-10.
Study Title: Event 5307 Maize: Genome to Insert Junction Analysis for Translated
Reading Frames with a Minimum Size of 30 Amino Acids: Assessment of Amino Acid

- Sequence Similarity to Known or Putative Toxins
- 11 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-162-10.
Study Title: eCry3.1Ab (Entrez® Database Accession Number ADC30135): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins
 - 12 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-136-10 A1.
Study Title: PMI (Entrez® Database Accession Number AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins
 - 13 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-002-09.
Study Title: Comparison of eCry3.1Ab Protein Produced in Event 5307-Derived Maize Plants and eCry3.1Ab Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli*
 - 14 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-003-09.
Study Title: Comparison of Phosphomannose Isomerase Produced in Event 5307-Derived Maize Plants and Phosphomannose Isomerase Produced in Recombinant *Escherichia coli*
 - 15 Syngenta Study No.: TK0028111.
Study Title: *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions.
 - 16 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-034-07 A1.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions
 - 17 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-015-09 A1.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1AB-0208 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions
 - 18 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-036-07.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions
 - 19 Syngenta Seeds Biotechnology Report # TK0022186.
Study Title: Effect of Temperature on the Immunoreactivity of eCry3.1Ab Protein
 - 20 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-030-07.
Study Title: Effect of Temperature on Phosphomannose Isomerase as Contained in Test Substance PMI-0105 as Assessed by Immunoreactivity
 - 21 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-170-09 A3.
Study Title: Compositional Analysis of Forage and Grain from Event 5307 Hybrid Maize Grown During 2008 in the USA
 - 22 Syngenta Seeds Biotechnology Report # SSB-235-10.
Study Title: The Environmental Fate and Effects of eCry3.1Ab in Event 5307 Maize: Estimated Environmental Concentrations, Margins of Exposure in Non-Target Organism Studies, and US Endangered Species Assessment.
 - 23 Report No. 9047-100671.
Study Title: Cytotoxicity testing of the eCry3.1Ab protein as contained in test substance ECRY3.1AB-0208.