

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並び
に除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP-004114-3)**

**平成 25 年 12 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	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
(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	5
3	宿主に関する事項	5
(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	5
(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	6
(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	6
(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	6
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項	6
(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	7
4	ベクターに関する事項	7
(1)	名称及び由来に関する事項	7
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	7
(4)	伝達性に関する事項	7
(5)	宿主依存性に関する事項	7
(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	8
(1)	供与体に関する事項	8

（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	9
（５）純度に関する事項	10
（６）コピー数に関する事項	11
（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	12
（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	12
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	15
（５）宿主との差異に関する事項	15
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	16
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	16
（８）不活化法に関する事項	16
（９）外国における認可等に関する事項	16
（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	17
IV 審議結果	17
V 参考文献及び参考資料	17

「チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP-004114-3)」に係る安全性確認

I はじめに

5 チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP-004114-3) (以下「DP-004114-3 トウモロコシ」という。) について、平成 25 年 7 月 5 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

10 飼料名：チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP-004114-3)

性 質：チョウ目害虫抵抗性、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
申請者：デュポン株式会社

開発者：パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社

15

DP-004114-3トウモロコシには、チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性を付与するために改変*cry1F*遺伝子、*cry34Ab1*遺伝子及び*cry35Ab1*遺伝子が、また、除草剤グルホシネート耐性を付与するために*pat*遺伝子が導入されている。

20 改変*cry1F*遺伝子の供与体は土壌細菌の*Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*である。改変*cry1F*遺伝子から産生される改変Cry1Fたん白質はトウモロコシ栽培で発生するヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性をトウモロコシに付与する。

25 *cry34Ab1*遺伝子及び*cry35Ab1*遺伝子の供与体は土壌細菌の*B. thuringiensis* PS149B1株である。*cry34Ab1*遺伝子及び*cry35Ab1*遺伝子から産生されるCry34Ab1たん白質及びCry35Ab1たん白質は協調して働き、トウモロコシ栽培で発生する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する抵抗性をトウモロコシに付与する。

*pat*遺伝子の供与体は、放線菌の*Streptomyces viridochromogenes*である。*pat*遺伝子から産生されるPATたん白質が除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性をトウモロコシに付与する。

これらの遺伝子が個別に導入されたトウモロコシは既に安全性が確認されている。

30 DP-004114-3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、DP-004114-3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、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、DP-004114-3トウモロコシが飼料として摂取する家畜の健康を損なうおそれはないと考えられた。

35 なお、トウモロコシは、主に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。

40 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

DP-004114-3 トウモロコシの作出に用いた宿主は、イネ科 (Gramineae) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するデント種のトウモロコシ (*Zea mays* L.) である。

DP-004114-3 トウモロコシには、土壌細菌 *B. thuringiensis* var. *aizawai* 由来の改変 *cry1F* 遺伝子、土壌細菌 *B. thuringiensis* PS149B1 株由来の *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子並びに放線菌 *S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。

改変 *cry1F* 遺伝子から産生される改変 Cry1F たん白質は、トウモロコシ栽培で発生するヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子から産生される Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は、トウモロコシ栽培で発生する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する抵抗性を付与する。なお、Cry34Ab1 たん白質と Cry35Ab1 たん白質は協調して働くため (Ellis *et al.*, 2002)、以降、これらのたん白質の機能について記述する場合には、「Cry34Ab1/Cry35Ab1 たん白質」と記載する。

pat 遺伝子から産生される PAT たん白質は、除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性をトウモロコシに付与する。

なお、改変 *cry1F* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入された「*B.t.* Cry1F 害虫抵抗性、グルホシネート耐性トウモロコシ 1507 系統」は平成 15 年に、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入された「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 *B.t.* Cry34Ab1/Cry35Ab1 Event DAS-59122-7」は平成 18 年にそれぞれ安全性が確認されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシの宿主は、デント種に分類されるトウモロコシであり、主に飼料用として利用されている。また、食品としてもコーン油や澱粉等に幅広く利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

DP-004114-3 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 (Watson, 1982、Watson, 1987、Codex, 1996、OECD, 2002、Codex, 2005、ILSI, 2006、参考資料 1、2)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシは、改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT たん白質の発現により、チョウ目害虫抵抗性、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が付与されている。これらの

80 点を除けば、DP-004114-3 トウモロコシは既存のトウモロコシと差異はなく、既存種と比較してア. 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法、イ. 家畜等の摂取(可食)部位、ウ. 家畜等の摂取量、エ. 調製及び加工方法についても変わりはない。

85 (1)～(4)より、DP-004114-3 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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシでは、改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT たん白質が発現している。

90 改変 Cry1F たん白質はチョウ目害虫に対する抵抗性を、Cry34Ab1/Cry35Ab1 たん白質はコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与し、薬剤を使用することなく標的とする害虫の防除を可能にする。

95 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、N-アセチル-L-グルホシネートに変え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。したがって、除草剤グルホシネートの散布により効果的な雑草防除が可能となる。

100 また、これまで複数の形質を持つ遺伝子組換え作物は、既に安全性が確認された遺伝子組換え作物を用い、それらを伝統的な交配育種方法により掛け合わせることで作出していた。DP-004114-3 トウモロコシは、1つの導入用プラスミドで4つの遺伝子を同時に導入しているため、掛け合わせによる多くの労力及び時間を省き、複数の形質を持つ品種の迅速な作出を可能とする。

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

105 DP-004114-3 トウモロコシの作出に用いた宿主は、イネ科 (Gramineae) トウモロコシ属 (*Zea*) に属するデント種トウモロコシ (*Zea mays* L.) の PHWWE である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

110 トウモロコシの遺伝的先祖は同じ *Zea* 属のテオシントであり、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)。

115 紀元前 5000 年頃のトウモロコシ野生種の穂軸と考えられる遺物が、メキシコのテワカン溪谷の洞窟住居跡で発見されている。その後、紀元前 3400 年頃に、栽培型化したトウモロコシが現れたと考えられている (戸澤, 2005)。

(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、ラフィノースが知られている (OECD,

120 2002)。トリプシンインヒビターも含まれているが、含有量が低く、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

125 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

130 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)、これらが家畜等に対して病原性を持つことは知られていない。

(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、雑草化する能力は極めて低い。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

135 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 (OECD, 2003)。品種や地域によって栽培時期は異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される (瀧澤, 2001)。他殖率は 95~99% であり、受粉は風媒によって行われる (千藤, 2001)。

140 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。テオシントはトウモロコシと交雑可能であるが (OECD, 2003)、我が国において、テオシントが自生することは報告されていない。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

145 トウモロコシは、1580 年頃にポルトガル人によって我が国に導入され、九州、四国や本州で栽培されるようになった。明治時代に北海道開拓使によって、デント種及びフリント種が米国より導入され、飼料用、子実用及び生食用として定着した (戸澤, 2005)。

150 トウモロコシの飼料としての利用は、子実の直接利用、サイレージ用としての利用及び青刈りとしての直接利用がある。また、ウェットミリング、ドライミリング及びアルコール発酵の際の副産物も飼料として利用されている。このうち、子実を配合飼料原料として利用することが量的に最も多い (菊池, 1987)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

トウモロコシは飼料として安全に利用されている。

155 (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、種子の休眠性は極めて低い (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)。

160

(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は報告されていない。

165

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP27118 は、アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株由来のプラスミド pSB1 (Komari *et al.*, 1996) を基に作製された。なお、プラスミド pSB1 の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

170

(2) 性質に関する事項

プラスミド pSB1 の塩基数は 36,909 bp である。また、プラスミド pSB1 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。

175

(3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pSB1 には、抗生物質テトラサイクリン耐性を付与する *tetA* 遺伝子が組み込まれている。なお、DP-004114-3 トウモロコシ中に、*tetA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている (参考資料 5、7)。

180

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pSB1 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。

185

(5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pSB1 に含まれる全ての遺伝子の性質は明らかにされており、プラスミド pSB1 には、植物、家畜等での増殖を可能とする配列は含まれていない。

190

(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 PHP27118 は、複数のプラスミドを用い、挿入遺伝子をプラスミド pSB1 に組み込むことにより作製されており、改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域を有している。

195

(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 PHP27118 の T-DNA 領域は、アグロバクテリウム法 (Zhao *et al.*, 2001) により、宿主ゲノム中へ導入されている。

200 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

改変 *cry1F* 遺伝子は、土壌細菌 *B. thuringiensis* var. *aizawai* に由来する。

205 *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、土壌細菌 *B. thuringiensis* PS149B1 株に由来する。

pat 遺伝子は、放線菌 *S. viridochromogenes* に由来する。

② 安全性に関する事項

210 改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体が属する *B. thuringiensis* は、土壌中、ほこり、昆虫及び葉に存在する。また、微生物農薬として長期に利用されており、動物に対する病原性は報告されていない (McClintock *et al.*, 1995、EPA, 1998、Schnepf *et al.*, 1998)。

pat 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壌中に広く存在し、動物に対する病原性は報告されていない (OECD, 1999)。

215

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

遺伝子の宿主への導入は、アグロバクテリウム LBA4404 株を用いてアグロバクテリウム法 (Zhao *et al.*, 2001) により行った。

220 導入用プラスミド PHP27118 を含むアグロバクテリウムを、宿主 PHWWE の未熟胚に接種し、培養した。アグロバクテリウム除去用のカルベニシリンを添加した培地と、細胞内で除草剤グルホシネートに分解される除草剤ビアラホスを添加した培地で胚を培養することにより、遺伝子が導入された宿主を選抜した後、植物体を再生し、T0 世代とした。その後、既存の優良品種との戻し交配又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、DP-004114-3 トウモロコシを最終的な商品化系統として選抜した。

225

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

各遺伝子発現カセットには、以下のプロモーターが用いられている。

- ア. 改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット : *ubiZM1* プロモーター
- イ. *cry34Ab1* 遺伝子発現カセット : *ubiZM1* プロモーター
- ウ. *cry35Ab1* 遺伝子発現カセット : TA Peroxidase プロモーター
- エ. *pat* 遺伝子発現カセット : CaMV 35S プロモーター

230

② ターミネーターに関する事項

各遺伝子発現カセットには、以下のターミネーターが用いられている。

- ア. 改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット : ORF25 ターミネーター
- イ. *cry34Ab1* 遺伝子発現カセット : *pin II* ターミネーター
- ウ. *cry35Ab1* 遺伝子発現カセット : *pin II* ターミネーター
- エ. *pat* 遺伝子発現カセット : CaMV 35S ターミネーター

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 PHP27118 の T-DNA 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、既知の有害塩基配列を含まない。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 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。改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

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
改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的な発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> 5' UTR	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>ubiZM1</i> イントロン	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
改変 <i>cry1F</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> 由来の改変 Cry1F たん白質をコードする遺伝子。
ORF25 ターミネーター	<i>A. tumefaciens</i> 由来の pTi15955 のターミネーター領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。転写を停止する。
<i>cry34Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
<i>ubiZM1</i> プロモーター	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子のプロモーター領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。植物体内での構成的な発現を誘導する。
<i>ubiZM1</i> 5' UTR	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR) (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>ubiZM1</i> イントロン	<i>Z. mays</i> 由来のポリユビキチン遺伝子のイントロン領域 (Christensen <i>et al.</i> , 1992)。
<i>cry34Ab1</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry34Ab1 たん白質をコードする遺伝子 (Moellenbeck <i>et al.</i> , 2001、Ellis <i>et al.</i> , 2002、Herman <i>et al.</i> , 2002)。
<i>pin II</i> ターミネーター	<i>Solanum tuberosum</i> 由来のプロテナーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子発現カセット	
TA Peroxidase プロモーター	<i>Triticum aestivum</i> 由来のペルオキシダーゼプロモーター領域 (Hertig <i>et al.</i> , 1991)。植物体内での構成的な発現を誘導する。
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> PS149B1 株由来の Cry35Ab1 たん白質をコードする遺伝子 (Moellenbeck <i>et al.</i> , 2001、Ellis <i>et al.</i> , 2002、Herman <i>et al.</i> , 2002)。
<i>pin II</i> ターミネーター	<i>S. tuberosum</i> 由来のプロテナーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター領域 (Keil <i>et al.</i> , 1986、An <i>et al.</i> , 1989)。転写を停止する。

<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
CaMV 35S プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980, Odell <i>et al.</i> , 1985, Pietrzak <i>et al.</i> , 1986)。植物体内での構成的な発現を誘導する。
<i>pat</i> 遺伝子	<i>S. viridochromogenes</i> 由来の 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由来の 35S ターミネーター領域 (Franck <i>et al.</i> , 1980, Pietrzak <i>et al.</i> , 1986)。転写を停止する。

【 挿入遺伝子の機能 】

① 改変 *cry1F* 遺伝子

245 改変 *cry1F* 遺伝子は、改変 Cry1F たん白質を発現する。本たん白質は、ヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対して殺虫活性を示す。チョウ目昆虫以外のコウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目及びトビムシ目等の昆虫並びに哺乳類、鳥類及び魚類等の非標的生物に対する殺虫活性は示さない (EPA, 2010a)。

② *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子

250 *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子から発現する Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は協調して働く (Ellis *et al.*, 2002)。Cry34Ab1/Cry35Ab1 たん白質は、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て殺虫活性を示す。コウチュウ目昆虫以外のチョウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目及びカメムシ目等の昆虫並びに哺乳類、鳥類及び魚類等の非標的生物に対する殺虫活性は示さない (EPA, 2010b)。

260 上述した改変 Cry1F たん白質及び Cry34Ab1/Cry35Ab1 たん白質を含む Bt たん白質は、一般に害虫の中腸細胞で特異的な受容体に結合して細胞に小孔を形成し、中腸細胞を破壊することにより殺虫活性を示す (Schnepf *et al.*, 1998)。しかしながら、哺乳類の腸細胞表面には Bt たん白質の結合部位がなく、Bt たん白質はヒト及び家畜等に毒性を示さない (Hammond *et al.*, 2002)。

③ *pat* 遺伝子

265 *pat* 遺伝子は、PAT たん白質を発現する。本たん白質は、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-グルホシネートに変え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)。

270 (5) 純度に関する事項

導入用プラスミド PHP27118 の T-DNA 領域の塩基数は 11,978 bp である。その塩基配列 (参考資料 3)、大きさ及び由来は明らかであり、全ての挿入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。

275 (6) コピー数に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシに導入された遺伝子のコピー数、導入遺伝子発現カセットの完全性及び導入用プラスミド PHP27118 由来の外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行った(参考資料 4、5、7)。その結果、DP-004114-3 トウモロコシのゲノム中に、完全長の改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット、
280 *cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることが確認された。また、導入用プラスミド PHP27118 の外側骨格配列が存在しないことが確認された。

また、導入遺伝子の構成を確認し、導入遺伝子とその近傍配列の塩基配列を決定するため、塩基配列解析を行った(参考資料 6)。その結果、導入遺伝子の右側境界領域に 29bp の欠損及び 24bp の DNA 断片(機能を有しない T-DNA 領域由来の 15bp 及び改変 *cry1F* 遺伝子領域由来の 9bp) の挿入並びに左側境界領域に 24bp の欠損が認められたことを除き、DP-004114-3 トウモロコシ中の導入遺伝子と、導入用プラスミド PHP27118 の T-DNA 領域の塩基配列は一致しており、各遺伝子発現カセットの各構成要素に欠損はないことが確認された。また、近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された。
285
290

さらに、遺伝子導入による宿主の内在性遺伝子の破壊の有無を確認するため、導入部位の近傍配列について、8 つの公開データベースから構築したデータセットを用いた BLASTn 検索及び National Center for Biotechnology Information (NCBI) たん白質データベースを用いた BLASTx 検索を行った。その結果、導入遺伝子の 5' 末端近傍配列にイネ由来の細胞内酸化還元制御に関与する推定グルタレドキシシン (GRX) たん白質と相同性を有する配列が確認された。ただし、ノーザンブロット分析により実際にこの配列の転写産物が検出されなかったことから、転写されるとしてもごく微量の発現量であること(参考資料 8)、仮に導入遺伝子の挿入によりその機能が失われても、GRX ファミリーの他の遺伝子によりその機能は補完されること (Meyer *et al.*, 2008、Riondet *et al.*, 2012) から、仮に本 5' 末端領域が GRX たん白質をコードする配列であり、導入遺伝子の挿入により失われたとしても、DP-004114-3 の植物体に影響を及ぼすとは考えにくい。
295
300

(7) 安定性に関する事項

305 DP-004114-3 トウモロコシ中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の DP-004114-3 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、T-DNA 領域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 4)。

310 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシにおける改変 *Cry1F* たん白質、*Cry34Ab1* たん白質、*Cry35Ab1* たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 9)。米国及びカナダの 5 ヶ所のほ場から異なる生育時期に採取した DP-004114-3 トウモロコシの葉、茎、根、花粉、地上部及び種子を供試した。その結果、PAT たん白質が絹糸抽出期の花粉及び成熟期の種子において定量下限値未満
315

であった以外、いずれのたん白質も分析を行った全ての組織において発現が認められた。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

320 導入用プラスミド PHP27118 の外側骨格配列には、抗生物質テトラサイクリン耐性を付与する *tetA* 遺伝子が組み込まれているが、DP-004114-3 トウモロコシ中に *tetA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている（参考資料 5、7）。

325 (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

330 DP-004114-3 トウモロコシの導入遺伝子とその 5' 及び 3' 末端近傍配列の両境界領域におけるオープンリーディングフレーム (ORF) 形成の有無を調べるため、6 つの読み枠でストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF 検索を行った結果、7 個の ORF が検出された。これら 7 個の ORF について、既知の毒素たん白質及びアレルゲンとの相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった（参考資料 10）。

6 組換え体に関する事項

335 (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

DP-004114-3 トウモロコシでは、導入された改変 *cry1F* 遺伝子、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子によって、それぞれ改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT たん白質が発現している。

340 DP-004114-3 トウモロコシは、改変 Cry1F たん白質によりヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を、Cry34Ab1/Cry35Ab1 たん白質により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する抵抗性を獲得している。また、PAT たん白質が、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-グルホシネートに変えて無毒化することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を獲得している。これらの点を除けば、
345 DP-004114-3 トウモロコシは既存種とその形態及び生育特性において差異は認められず、飼料としての利用方法も従来トウモロコシと変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

350 改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT 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 たん白質データベースを用いて、BLASTP アルゴリズムにより *E*-value 1.0 以下の相同性を示す配列の検索を行った（参考資料 11、12、13）。

その結果、改変 Cry1F たん白質、Cry35Ab1 たん白質及び PAT たん白質と相同性を示す既知の毒素たん白質は認められなかった。

355 Cry34Ab1 たん白質において、相同性 31%を示すストレプトマイセス由来のエジロリシンが認められたが、ストレプトマイセス由来のエジロリシンが毒性を示

すことは報告されておらず、溶血作用の報告のある 4 種類のエジロリシン (Berne *et al.*, 2002、Berne *et al.*, 2009) との相同性は 8~15%と低かった (参考資料 14)。その他、Cry34Ab1 たん白質と相同性を示す既知の毒素たん白質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 Bt たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質について、ペプシンを添加した人工胃液に対する感受性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。

(ア) 改変 Cry1F たん白質

SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析の結果、試験開始 1 分後には改変 Cry1F たん白質のバンドは検出されず、消化されることが確認された (参考資料 15)。

(イ) Cry34Ab1 たん白質

ウエスタンブロット分析の結果、試験開始 20 分後には Cry35Ab1 たん白質のバンドは検出されず、消化されることが確認された。SDS-PAGE 分析の結果から消化時間を算出した結果では、試験開始 6.3~6.8 分で Cry34Ab1 たん白質の 90%が消化されることが示された (Herman *et al.*, 2003)。

(ウ) Cry35Ab1 たん白質

ウエスタンブロット分析の結果、試験開始 5 分後には Cry35Ab1 たん白質のバンドは検出されず、消化されることが確認された。SDS-PAGE 分析の結果から消化時間を算出した結果では、試験開始 5 分以内に Cry35Ab1 たん白質の 97%が消化されることが示された (Herman *et al.*, 2003)。

イ 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

改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質について、パンクレアチンを添加した人工腸液に対する感受性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。

(ア) 改変 Cry1F たん白質

SDS-PAGE 分析の結果、試験開始 120 分後においても改変 Cry1F たん白質のバンドが検出され、消化されないことが確認された (参考資料 16)。

(イ) Cry34Ab1 たん白質

SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析の結果、試験開始 240 分後

においても Cry34Ab1 たん白質のバンドが検出され、消化されないことが確認された（参考資料 17）。

400

（ウ） Cry35Ab1 たん白質

SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析の結果、試験開始数秒後に全長 44kDa の Cry35Ab1 たん白質が 40kDa のコアたん白質に分解され、試験開始 80 分には消失することが確認された（参考資料 18）。

405

ウ 加熱処理

加熱による改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質の免疫反応性の変化を ELISA 分析により評価した。

410

（ア） 改変 Cry1F たん白質

ELISA 分析の結果、75℃30 分間、90℃30 分間及び 100℃15 分間の加熱により免疫反応性が消失することが確認された（参考資料 19）。

（イ） Cry34Ab1 たん白質

415

ELISA 分析の結果、50℃48 時間、54℃30 分間及び 100℃5 分間の加熱により免疫反応性がそれぞれ 88.2%、78.0%及び 82.8%減少することが確認された（参考資料 20）。

（ウ） Cry35Ab1 たん白質

420

ELISA 分析の結果、50℃48 時間、54℃30 分間及び 100℃5 分間の加熱により免疫反応性がそれぞれ 93.8%、97.9%及び 98.6%減少することが確認された（参考資料 20）。

② PAT たん白質

425

PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性についてはこれまでに、以下のア～ウのとおり報告されている。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

SDS-PAGE 分析の結果、PAT たん白質は人工胃液中で 30 秒以内に消化されることが確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

430

イ 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

ウエスタンブロット分析の結果、PAT たん白質は人工腸液中で 30 秒以内に消化されることが確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

435

ウ 加熱処理

PAT たん白質を用いた加熱処理による変性試験において、SDS-PAGE 分析の結果、分子量は 90℃、60 分の加熱処理でも変化がなかったことが報告され

ているが (Hérouet *et al.*, 2005)、酵素活性は 55℃、10 分の加熱処理により失われることが確認されている (Wehrman *et al.*, 1996)。

440

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry1F たん白質、Cry34Ab1 たん白質及び Cry35Ab1 たん白質は、いずれも Bt たん白質である。Bt たん白質の機能について数多くの研究がなされているが (OECD, 2007)、Bt たん白質が酵素活性を有することを示す報告はない。

445

また、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-グルホシネートに対して基質特異性を有し、L-グルホシネートの光学異性体である D-グルホシネートをも基質としないことが報告されている (OECD, 1999)。したがって、PAT たん白質が、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。

450

(5) 宿主との差異に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシとの構成成分の同等性を評価するため、米国及びカナダの 6 ヶ所のは場において栽培した DP-004114-3 トウモロコシ及び対照の非組換えトウモロコシの種子及び茎葉について、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ミネラル類、⑤ビタミン類及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 1)。

455

① 主要構成成分

種子及び茎葉のたん白質、脂質、灰分、炭水化物、粗繊維、酸性デタージェント繊維 (ADF) 及び中性デタージェント繊維 (NDF) について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えトウモロコシと同等、従来商業品種の分析値の範囲内又は文献に記載された分析値の範囲内 (Watson,1982、Watson,1987、Codex,1996、OECD, 2002、Codex,2005、ILSI, 2006、参考資料 2) であった。

460

② 脂肪酸組成

種子中の脂肪酸組成について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えトウモロコシと同等、従来商業品種の分析値の範囲内又は文献に記載された分析値の範囲内 (Watson,1982、Watson,1987、Codex,1996、OECD, 2002、Codex,2005、ILSI, 2006、参考資料 2) であった。

465

③ アミノ酸組成

種子中のアミノ酸組成について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。

470

④ ミネラル類

種子及び茎葉中のミネラル類について分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えトウモロコシと同等、従来商業品種の分析値の範囲内又は文献に記載された分析値の範囲内 (Watson,1982、Watson,1987、Codex,1996、

475

OECD, 2002、Codex,2005、ILSI, 2006、参考資料 2) であった。

480

⑤ ビタミン類

種子中のビタミン類について分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。

485

⑥ 有害生理活性物質

種子中の有害生理活性物質（フィチン酸、ラフィノース及びトリプシンインヒビター）及びその他の成分（フェルラ酸、*p*-クマル酸、フルフラール及びイノシトール）について分析した結果、いずれの有害生理活性物質及びその他の成分も対照の非組換えトウモロコシとの間に差異は認められなかった。

490

（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項

2010 年に米国の延べ 11 ヶ所で行われたほ場試験において、DP-004114-3 トウモロコシの生存及び増殖能力は、対照の非組換えトウモロコシと同等であることが確認されている。

495

（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシの生存及び増殖能力は非組換えトウモロコシと同等であり、生存及び増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

500

（８）不活化法に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシは、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。

505

（９）外国における認可等に関する事項

2013 年 3 月に米国食品医薬局（FDA）において食品・飼料としての安全性が確認された。

2012 年 6 月にカナダ保健省（Health Canada）において食品としての、また、2013 年 6 月にカナダ食品検査庁（CFIA）において環境・飼料としての安全性が確認された。

510

（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシの栽培方法は、トウモロコシの発芽から生育期の栽培管理において、標的とするチョウ目害虫及びコウチュウ目害虫の防除のための薬剤使用が不要となること及び除草剤グルホシネートが散布可能な点を除き、従来のトウモロコシと同様である。

515

（11）種子の製法及び管理方法に関する事項

DP-004114-3 トウモロコシの種子の製法及び管理方法は従来のトウモロコシと

同様である。また、宿主の非組換えトウモロコシ PHWWE の種子及び試験に使用した DP-004114-3 トウモロコシの各世代の種子は保管されている。

520

- 7 2 から 6 までは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。

525 IV 審議結果

チョウ目及びコウチュウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP-004114-3) 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。

530

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 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.
- 2 Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V. and Kemp, J.D. (1983). Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 2: 335-350.
- 3 Berne, S., Krizaj, I., Pohleven, F., Turk, T., Macek, P. and Sepcic, K. (2002). *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. *Biochimica et Biophysica Acta* 1570 : 153-159.
- 4 Berne, S., Lah, L. and Sepcic, K. (2009). Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. *Protein Science*. 18: 694-706.
- 5 CFIA (Canadian Food Inspection Agency). (1994). The biology of *Zea mays* (L.). (<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9411e.pdf>) Accessed on January 17th, 2013.
- 6 Christensen, A.H., Sharrock, R.A. and Quail, P.H. (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.
- 7 Codex. (1996). Food Chemicals Codex. 4th Edition. Committee on Food Chemicals Codex. Effective July 1, 1996. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academy of Science. National Academy Press., Washington D.C. pp.110-111.
- 8 Codex. (2005). Codex standard for named vegetable oils. CODEX-STAN 210-1999. pp.1-13.
- 9 Ellis, R.T., Stockhoff, B.A., Stamp, L., Schnepf, H.E., Schwab, G.E., Knuth, M., Russell, J., Cardineau, G.A. and Narva, K. E. (2002). Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte.

- Applied and Environmental Microbiology. 68(3): 1137-1145.
- 10 EPA. (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): *Bacillus thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004. pp.1-15.
(<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf>). Accessed on August 13th, 2012.
 - 11 EPA. (2010a). Biopesticides Registration Action Document: Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* (Bt) Corn plant-incorporated protectants. United States Environmental Protection Agency. p.24, pp.58-94. (www.epa.gov/opp00001/biopesticides/pips/cry1f-cry1ab-brad.pdf). Accessed on August 13th, 2012.
 - 12 EPA. (2010b). Biopesticides Registration Action Document: *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1 and Cry35Ab1 proteins and the genetic material necessary for their production (PHP17662 T-DNA) in event DAS-59122-7 corn (OECD Unique Identifier: DAS-59122-7). PC Code: 006490. United States Environmental Protection Agency. pp.70-84, pp.95-98.
(<http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/cry3435ab1-brad.pdf>). Accessed on August 13th, 2012.
 - 13 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell. 21: 285-294.
 - 14 Hammond, B., Stanisiewski, E., Fuchs, R., Astwood, J. and Hartnell G. (2002). Testing for genetic manipulation in plants. Jackson, J.F. and Linskens, H.F. eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. pp.125-126.
 - 15 Herman, R.A., Scherer, P.N., Young, D.L., Mihaliak, C.A., Meade, T., Woodsworth, A.T., Stockhoff, B.A. and Narva K.E. (2002). Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: Effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. Journal of Economic Entomology. 95(3): 635-639.
 - 16 Herman, R.A., Schafer, B.W., Korjagin, V.A. and Ernest, A.D. (2003). Rapid digestion of Cry34Ab1 and Cry35 Ab1 in simulated gastric fluid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51: 6823-6827.
 - 17 Hérouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis R-J. 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. 41: 134-149.
 - 18 Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J., Mauch, F. and Dudler, R. (1991). Sequence and tissue-specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). Plant Molecular Biology. 16: 171-174.
 - 19 ILSI. (2006). International Life Sciences Institute Crop Composition Database Search Results (Version 3.0). Maize: Forage, Grain
(<https://www.cropcomposition.org/query/index.html>). Accessed on April 27th, 2006.
 - 20 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.
 - 21 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(1): 165-174.
- 22 McClintock, J.T., Schaffer, C.R. and Sjoblad R.D. (1995). A comparative review of the mammalian toxicity of *Bacillus thuringiensis*-based pesticides. Pesticide Science. 45: 95-105.
 - 23 Moellenbeck, D.J., Peters, M.L., Bing, J.W., Rouse, J.R., Higgins, L.S., Sims, L., Nevshemal, T., Marshall, L., Ellis, R.T., Bystrak, P.G., Lang, B.A., Stewart, J.L., Kouba, K., Sondag, V., Gustafson, V., Nour, K., Xu, D., Swenson, J., Zhang, J., Czapla, T., Schwab, G., Jayne, S., Stockhoff, B.A., Narva, K., Schnepf, H.E., Stelman, S.J., Poutre, C., Koziel, M. and Duck, N. (2001). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. Nature Biotechnology. 19(7): 668-672.
 - 24 Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N-H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature. 313: 810-812.
 - 25 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 economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(99)13.
(<http://www.biosafety.gov.cn/image20010518/5198.pdf>). Accessed on January 22nd, 2013.
 - 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. 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 October 3rd, 2012.
 - 27 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>). Accessed on October 3rd, 2012.
 - 28 OECD. (2007). Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* - derived insect control proteins. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.42. Organisation for economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(2007)14.
(<http://www.oecd.org/dataoecd/36/61/46815888.pdf>). Accessed on June 26th, 2012.
 - 29 Pietrzak, M., Shillito, R.D., Hohn, T. and Potrykus, I. (1986). Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acids Research. 14: 5857-5868.
 - 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 crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 775-806.

- 31 Watson, S.A. (1982). Corn: Amazing Maize. General Properties. CRC handbook of processing and utilization in agriculture. CRC Press Inc., Florida. pp.3-29.
- 32 Watson, S.A. (1987). Structure and composition. Corn: Chemistry and Technology. Watson, S.A. and Ramstad, P.E. eds. American Association of Cereal Chemists. pp.53-82.
- 33 Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., and Schulz, A. (1996). The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology. 14(10):1274-1278.
- 34 Zhao, Z., Gu, W., Cai, T., Tagliani, L., Hondred, D., Bond, D., Schroeder, S., Rudert, M. and Pierce, D. (2001). High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize. Molecular Breeding. 8: 323-333.
- 35 菊池一徳. (1987). “第5章: 5-2 飼料としてのトウモロコシ”. トウモロコシの生産と利用. 株式会社 光琳. p.160.
- 36 千藤茂之. (2001). “トウモロコシの品種生態: IV 採種: 3. 採種栽培の実際: (2) 隔離”. 転作全書第三巻. 雑穀. 農文協. p.98.
- 37 瀧澤康孝. (2001). “子実用トウモロコシの栽培: II 栽培の実際: 4. 収穫, 乾燥, 調製: (1) 収穫期と収穫法”. 転作全書第三巻. 雑穀. 農文協. p.124.
- 38 戸澤英男. (2005). トウモロコシ—歴史・文化、特性・栽培、加工・利用—. 農文協. pp.2-4, pp.56-59, p.127.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 Nutrient Composition of a Maize Line Containing Event DP-004114-3 US and Canada Test Sites.
- 2 トウモロコシ種子及び茎葉中の構成成分文献値一覧.
- 3 Description and Sequence of T-DNA from Plasmid 27118.
- 4 Amended Final Report. Characterization of DP-004114-3 Maize: Insertion Integrity, Stability, Copy Number, and Backbone Analysis
- 5 Southern Blot Analysis of the F1*1 Generation of DP-004114-3 Maize to Verify Gene Copy Number and Integrity and Absence of Backbone DNA
- 6 Sequencing Characterization of Insert and Genomic Border Regions of Maize Event DP-004114-3
- 7 Amended Final Report. Southern Blot Analysis of DP-004114-3 Maize (T2 Generation) Verifying Absence of Backbone DNA
- 8 Summary Report: Molecular Characterization of PHP27118 T-DNA Insertion in Maize Event DP-004114-3
- 9 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Events DP-004114-3, DAS-01507-1, DAS-59122-7, and Combined Trait Product DAS-01507-1 x DAS-59122-7: US and Canada Test Sites
- 10 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-004114-3
- 11 Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the Cry1F Protein to the NCBI Protein Sequence
- 12 Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarities of the Cry34Ab1 and Cry35Ab1

Proteins to the NCBI Protein Sequence Datasets

- 13 Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the PAT Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets
- 14 CLUSTALW Analysis of the Cry34Ab1 Protein In Comparison to Known Aegerolysin Toxins
- 15 *B.t.* Cry1F 害虫抵抗性、グルホシネート耐性トウモロコシ 1507 系統の安全性評価に関する資料. II 安全性の評価. (4) 組換え体. キ 宿主との相違.(ア)有害物質の産生性. Cry1F 蛋白の人工胃液に対する感受性; pp.63-64.
- 16 *In Vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1F (tr)
- 17 *In Vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Cry34Ab1
- 18 *In Vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Cry35Ab1
- 19 Gel Electrophoresis, Western Blot, and ELISA of Truncated Cry1F Delta-endotoxin Following Heat Treatment
- 20 Heat Lability of Insecticidal Crystal Proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1