

# 「除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 系統」に係る安全性確認

## I はじめに

除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 系統(以下「MON88017 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	: 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017系統
性質	: 除草剤グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性
申請者	: 日本モンサント株式会社
開発者	: モンサント社

MON 88017 系統は、グリホサート(商品名:ラウンドアップ)存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する遺伝子(改変 *cp4 epsps* 遺伝子)及びコウチュウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry3Bb1 たん白質を発現する遺伝子(改変 *cry3Bb1* 遺伝子)を導入したものであり、グリホサートの影響を受けずに生育できる性質及びコウチュウ目害虫に対する耐性を持つ性質を付与されている。

MON 88017 系統と既存のトウモロコシとの相違は、MON 88017 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響を受けない点と、改変 Cry3Bb1 たん白質の発現によりコウチュウ目害虫に抵抗性を持つ点だけである。

一般に、トウモロコシは主にその穀粒が家畜等の飼料として使用される。

## 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

宿主に用いた植物はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays* L.)でデント種に属する。導入に用いた二つの遺伝子のうち、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は土壤微生物である *Agrobacterium* sp. CP4 株から同定・単離され(参考文献①)、植物での発現を高めるためとベクター構築のため、遺伝子に改変が加えられている。導入に用いたもうひとつの遺伝子である改変 *cry3Bb1* 遺伝子は土壤微生物である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* から同定・単離され、殺虫活性増強のためとベクター構築のため、遺伝子に改変が加えられている(参考文献②)。

### 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

穀粒の主要構成成分(乾物重%)は、たん白質 12.51%、脂質 3.64%、ADF3.77%、NDF12.44%、灰分 1.54%、炭水化物 82.32%であり、茎葉部の主要構成成分(乾物重%)は、

たん白質 8.20%、脂質 1.61%、ADF26.54%、NDF37.34%、灰分 3.99%、炭水化物 86.19%であった。また、栄養阻害物質であるフィチン酸含有量は 0.95%(乾物重中)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

MON 88017 系統と既存のトウモロコシとの相違は、MON 88017 系統がグリホサートの影響を受けずに生育できる点とコウチュウ目害虫に対して抵抗性を持つ点のみである。この点を除けば、MON 88017 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も既存のトウモロコシと相違はない。

以上 1.1~1.4 により、MON88017 系統の飼料としての安全性を評価するために、既存の飼料を比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

## 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON 88017 系統は、グリホサートの影響を受けずに生育することができ、また、コウチュウ目害虫に抵抗性をもつ。その結果として、グリホサートをその栽培期間中に 1 回~数回散布するだけでほぼ完全に雑草を防除することができるようになるため、雑草の発生に応じたより効果的で省力的な除草が行えるようになる。また、コーンルートワームの被害によって生じていた収穫量の減少を防ぐことができ、加えて、この害虫防除に殺虫剤を使用する必要がなくなる。

## 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

宿主はイネ科(*Gramineae*)トウモロコシ属(*Zea*)に属するトウモロコシ(*Zea mays* L.)である。

### 2 遺伝的先祖に関する事項

一般には、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ている。植物学の起源は、育種過程でテオシントから派生したとする説が有力とされている(参考文献③~⑤)。

### 3 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシでは、有害生理活性物質の生産は知られていない(参考文献⑥)。

### 4 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシには、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報告されていない。

### 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。98~99%が他家受粉であり、受粉は風媒によって行われる(参考文献⑦)。トウモロコシの近縁種はトリブサカム属及びテオシントであ

るが、トウモロコシと自然交雑可能なのはテオシントのみである。わが国ではトリプサカム属及びテオシントの野生種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

トウモロコシの利用の歴史は、およそ紀元前 3,000 年前まで遡ることができ、その後、ヨーロッパ、アフリカ大陸及びアジアへと伝播し、現在、飼料、食品等として広く利用されている。

飼料としては、2003 年に約 1,186 万トンのトウモロコシが配合飼料の原料として用いられている。また、子実や青刈りを直接飼料として与える場合もある。青刈りされたトウモロコシはサイレージ用としても利用されている。一方、胚芽から油を絞った後の油かすや、コーングルテン、コーンフィード、コーンスチープリカー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で述べたように、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(参考文献⑧)。

#### 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において有害生理活性物質の産生は報告されていない。

### 4 ベクターに関する事項

#### 1 名称及び由来に関する事項

MON 88017 系統の作出に用いたベクターは、*E. coli* プラスミド pBR322 に由来するプラスミド PV-ZMIR39 である。

#### 2 性質に関する事項

プラスミド PV-ZMIR39 の塩基数は 12,368bp である。プラスミド PV-ZMIR39 の制限酵素による切断地図、プラスミド PV-ZMIR39 に存在する全ての遺伝子は、その由来・機能が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

プラスミド PV-ZMIR39 はスペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aad* 遺伝子を持つ。*aad* 遺伝子は T-DNA 領域外に存在しているため MON 88017 系統中に導入されなかった。

#### 4 伝達性に関する事項

伝達性に関与する配列を持たない。

#### 5 宿主依存性に関する事項

自立増殖可能な宿主が *E. coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* といった細菌に限られて

いる。

## 6 発現ベクターの作成方法に関する事項

改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを pBR322 由来のベクターへと連結し、PV-ZMIR39 が作出された。

## 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

アグロバクテリウム法によりプラスミド PV-ZMIR39 の T-DNA 領域をトウモロコシ細胞の染色体上に導入した。

## 5 挿入遺伝子に関する事項

### 1 供与体に関する事項

#### (1)名称、由来及び分類に関する事項

##### 【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株より単離され(参考文献⑨)、植物での発現を高めるためとベクター構築のため、遺伝子に改変が加えられている。

##### 【改変 *cry3Bb1* 遺伝子】

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は土壌微生物である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* から同定・単離され、殺虫活性増強のためとベクター構築のために改変され、*Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* EG4691 株由来の野生型 Cry3Bb1 たん白質のアミノ酸配列と比較して、2番目にアラニンが挿入され、232番目のヒスチジンがアルギニンに、312番目のセリンがロイシンに、314番目のアスパラギンがトレオニンに、318番目のグルタミン酸がリジンに、349番目のグルタミンがアルギニンに改変されている(参考文献⑩)。

#### (2)安全性に関する事項

##### 【改変 CP4 EPSPS たん白質】

改変 CP4 EPSPS たん白質は植物や微生物が有する芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つである。EPSPS たん白質の酵素機能は既知のものであり、これまでに家畜は植物や微生物から様々な EPSPS たん白質を摂取してきている。

##### 【改変 Cry3Bb1 たん白質】

改変 Cry3Bb1 たん白質の安全性は、微生物農薬として安全に使用されている歴史、Cry3 たん白質に関する毒物学のデータベースの利用、改変 Cry3Bb1 たん白質に関するマウスを用いた急性毒性試験、*in vitro*における消化性試験及び既知毒素及びアレルゲンとの相同性の有無を調べることによって確認されている。

### 2 遺伝子の挿入方法に関する事項

4.6 及び 4.7 参照。

### 3 構造に関する事項

プラスミド PV-ZMIR39 に含まれる全ての遺伝子はその特性が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでいない。以下に各遺伝子発現カセットの構造について記載した。

#### 【改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット】

プロモーターとしてイネ由来のアクチン 1 遺伝子のプロモーター領域を用いた(参考文献⑪)。

ターミネーターには *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域を用いた (参考文献⑫)。

【改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセット】

プロモーターとしてカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーターを用いた(参考文献⑬)。ターミネーターにはコムギ熱ショックたん白質 17.3 の 3'末端非翻訳領域を用いた (参考文献⑭)。

4 性質に関する事項

MON88017 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry3Bb1* 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 導入遺伝子の各構成要素

構成要素	由来及び機能
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-ract1	イネ由来のアクチン1遺伝子のプロモーター領域。目的遺伝子を発現させる。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることにより目的遺伝子の発現を活性化させる。
CTP2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS たん白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列。目的たん白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
改変 <i>cry3Bb1</i> 遺伝子発現カセット	
P-e35S	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
wt CAB leader	コムギ葉緑素 a/b 結合たん白質の 5'末端非翻訳リーダー領域。目的遺伝子の発現を活性化させる。
ract1 intron	イネ・アクチン遺伝子のイントロン。スプライシングの効率を高めることにより目的遺伝子の発現を活性化させる。
改変 <i>cry3Bb1</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> の改変した改変 Cry3Bb1 たん白質をコードする遺伝子。
tahsp 17 3'	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。

【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、グリホサート存在下でも酵素活性を示す改変 CP4 EPSPS(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素)たん白質を発現する。EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つで、その

基質はホスホエノールピルビン酸とシキミ酸-3-リン酸であり、その機能は既知のものである。

【改変 *cry3Bb1* 遺伝子】

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は、コウチュウ目害虫に対する殺虫活性を持つ改変 Cry3Bb1 たん白質を発現する(参考文献⑮)。改変 Cry3Bb1 たん白質は *B.t.*たん白質の一つであり、昆虫の消化器官である中腸の上皮細胞の特異的受容体と結合し、消化プロセスを阻害することで殺虫活性を示すことが知られている(参考文献⑯、⑰)。

5 純度に関する事項

【改変 *cp4 epsps* 遺伝子】

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium sp.* CP4 株よりプラスミドにクローニングした後、改変を加えたものであり、その塩基配列は明らかにされている。

【改変 *cry3Bb1* 遺伝子】

改変 *cry3Bb1* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis subsp. kumamotoensis* よりプラスミドにクローニングした後、改変を加えたものであり、その塩基配列は明らかにされている。

6 安定性に関する事項

MON 88017 系統の各後代について、改変 Cry3Bb1 たん白質の発現を指標として分離比調査を行った結果、実測値と期待値との間に統計学的な有意差は認められなかった。また各後代について、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、挿入遺伝子の安定性が確認された。

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、T-DNA 領域の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットがゲノム DNA の 1 ヶ所に 1 コピー挿入されていることが確認された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量は、茎葉で 12~19 µg/g fwt、穀粒で 3.7~6.3 µg/g fwt であった。

改変 Cry3Bb1 たん白質の発現量は、茎葉で 22~39 µg/g fwt、穀粒で 8.7~19 µg/g fwt 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

プラスミド PV-ZMIR39 には、プラスミドの構築・選抜及び増殖に必要な選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性を付与する *aad* 遺伝子を有しているが、*aad* 遺伝子はベクターの T-DNA 領域外にある。サザンブロット分析及び PCR 分析による導入遺伝子の解析において、MON 88017 系統中に *aad* 遺伝子は導入されていないことが確認された。

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

MON 88017 系統のゲノムには、プラスミド PV-ZMIR39 の T-DNA 領域の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry3Bb1* 遺伝子発現カセットが存在し、T-DNA 領域外のベクター配列を持たないことが確認されているが、MON88017 系統の挿入遺伝子の 5'末端及び 3'末端

にPCR産物のDNA配列と一致しない配列が、それぞれ 19bp 及び 1bp 隣接していることが判明した。

このことから、フレームシフトを想定して推定上のオープンリーディングフレーム中に既知毒素と有意な相同性がある配列が存在するかを確認した結果、相同性のある配列が存在しないことを確認した。また、トウモロコシの遺伝子配列に変化が生じていないかを確認するために、5'及び 3'末端近傍配列を GenBank に登録されている配列と比較した結果、機能を持つと推測される配列と高い相同性を持つ配列は存在しないことを確認した。

## 6 組換え体に関する事項

### 1 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

MON 88017 系統は、改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響を受けない性質及び改変 Cry3Bb1 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。

### 2 遺伝子産物の毒性に関する事項

#### 【改変 CP4 EPSPS たん白質】

GenBank/EMBL 及び SwissProt からなる毒素データベース(TOXIN 5)中に「毒素」として登録されている既知毒素と改変 CP4 EPSPS たん白質との比較を行った。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質と既知毒素との間に相同性は認められなかった(参考文献⑱)。

また、改変 CP4 EPSPS たん白質を用いてマウスの急性強制経口投与試験を行った結果、改変 CP4 EPSPS たん白質の最大投与量 572 mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった(参考文献⑲)。

#### 【改変 Cry3Bb1 たん白質】

GenBank/EMBL 及び SwissProt からなる毒素データベース(TOXIN 5)中に「毒素」として登録されている既知毒素と改変 Cry3Bb1 たん白質との比較を行った。その結果、改変 Cry3Bb1 たん白質と既知毒素との間に相同性は認められなかった(参考文献⑳)。

また、改変 Cry3Bb1 たん白質を用いてマウスの急性強制経口投与試験を行った結果、改変 Cry3Bb1 たん白質の最大投与量 1,930 mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった(参考文献㉑)。

### 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

#### 【改変 CP4 EPSPS たん白質】

#### ①人工胃液に対する感受性

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、試験開始後 15 秒以内に検出限界以下に消失した。

#### ②人工腸液に対する感受性

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、試験開始 10 分後に大半が消失し、100 分後に検出限界以下に消失した。

#### ③加熱処理に対する感受性

約 100°C で 38 分間の加熱条件により改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性及び酵素活性が 99%以上失われることが ELISA 分析等により確認された。

#### 【改変 Cry3Bb1 たん白質】

①人工胃液に対する感受性

改変 Cry3Bb1 たん白質の免疫反応性は、試験開始後 15 秒以内に検出限界以下に消失した。

②人工腸液に対する感受性

改変 Cry3Bb1 たん白質は他の *B.t.*たん白質と同様にトリプシン耐性コアたん白質に分解され、それ以上は反応開始後 24 時間目でも分解されなかった。

③加熱処理に対する感受性

約 206°C で 20 分間の加熱条件により改変 Cry3Bb1 たん白質の免疫反応性及び酵素活性が 99% 以上失われることが ELISA 分析等により確認された。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

【改変 CP4 EPSPS たん白質】

EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)に反応する。PEP と S3P 以外に EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P 類似体であるシキミ酸のみである。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であることから、シキミ酸が植物体内で EPSPS たん白質と反応することはないと考察された。

【改変 Cry3Bb1 たん白質】

改変 Cry3Bb1 たん白質は酵素活性を持たず、したがって植物中の代謝経路に影響を与えらるるとは考えられない。

5 宿主との差異に関する事項

MON 88017 系統、非組換えトウモロコシ及び一般商業品種を用いて、茎葉中の主要構成成分及び穀粒中のアミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル、主要構成成分及びその他の成分の分析を行った。分析の結果、MON 88017 系統と対照の非組換えトウモロコシあるいは一般商業品種との間に生物学的に意味のある差異は認められなかった。

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 MON 88017 系統のほ場試験において、生存・増殖能力に関し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

米国で行われた MON 88017 系統のほ場試験において、生存・増殖能力に関し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同等であると考えられた。

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 MON 88017 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

米国食品医薬品局(FDA)には、2004 年 3 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2005 年 1 月に認可された。米国農務省(USDA)には、2004 年 4 月に無規制栽培(商業栽培)の

ための申請を行い、米国環境保護庁には、2004年1月に改変 Cry3Bb1 たん白質に対する残留基準値の設定免除の申請を行った。

カナダ厚生省には、2004年5月に食品としての安全性審査の申請を行い、カナダ食品検査局(CFIA)には、2004年5月に環境・飼料として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、2004年10月に食品・飼料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

MON 88017 系統と既存のトウモロコシとの栽培方法の相違は、MON 88017 系統において生育期の雑草防除にグリホサートが使用できる点、米国のトウモロコシ栽培で問題とされるコウチュウ目害虫のコーンルートワームに対して従来よりも効果的な防除が行える点である。その他の点では同じである。

#### 11 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON 88017 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。各分析に用いた世代の種子は、米国モンサント社 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。

#### 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

- 1 単回投与の毒性に関する試験
- 2 反復投与の毒性に関する試験(短期)
- 3 反復投与の毒性に関する試験(長期)
- 4 世代繁殖に関する試験
- 5 催腫瘍性に関する試験
- 6 変異原性に関する試験
- 7 催奇形性に関する試験
- 8 対象家畜等を用いた飼養試験
- 9 その他必要な試験

### IV 審議結果

グリホサート耐性及びコウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON88017 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 Padgett, S. R. *et al.* 1993. Purification, Cloning, and Characterization of a Highly Glyphosate-tolerant 5-Enolpyruvylskimate-3-phosphate Synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, Monsanto Technical Report MSL-12738. St. Louis.
- ② Kim A. Beazley, Heather M. Anderson, Philip B. Wimberley, Donald W. Mittanck, Ronald P. Lierette, 2002. Molecular Analysis of YieldGard Rootworm/Roundup Ready Corn Event MON88017. Monsanto Technical Report MSL-17609. St. Louis.

- ③ Aldrich, S. R., Scott, W. O. and Hoeft, R. G. 1986. Modern Corn Production, Third Edition. A & L Publication, Inc., Champaign, Illinois, USA.
- ④ Galinat, W. C. 1988. The Origin of Corn. pp 1-31. In Sprague, G.F. and Dudley, J.W., eds. Corn and Corn Improvement, Third Edition. #18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy. Madison, WI.
- ⑤ Jugenheimer, R. W. 1976. Corn: Improvement, Seed Production and Uses. John Wiley & Sons, New York pp.227
- ⑥ White, P. J. and Pollak, L. M. 1995. Corn as a Food Source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. Cereal Food World. 40: 756-761.
- ⑦ 畑作全書、雜穀編、農文協、1981.
- ⑧ Galinat, W. C. 1977. The origin of corn. *In* Corn and Corn Improvement, 2nd Edition. G.F. Sprague, ed. American Soc. Agronomy, Madison WI.
- ⑨ Padgett, S. R. *et al.* 1993. Purification, Cloning, and Characterization of a Highly Glyphosate-tolerant 5-Enolpyruvylskimate-3-phosphate Synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, Monsanto Technical Report MSL-12738. St. Louis.
- ⑩ Kim A. Beazley, Heather M. Anderson, Philip B. Wimberley, Donald W. Mittanck, Ronald P. Lierette, 2002. Molecular Analysis of YieldGard Rootworm/Roundup Ready Corn Event MON88017. Monsanto Technical Report MSL-17609. St. Louis.
- ⑪ McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., and Wu, R. 1990. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *Plant Cell* 2, 163-71.
- ⑫ Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann, and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4807.
- ⑬ 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.
- ⑭ McElwain, E. and Spiker, S. 1989. A wheat cDNA clone which is homologous to the 17 kd heat-shock protein gene family of soybean. *Nucleic Acids Res.* 17, 1764.
- ⑮ Von Tersch, M. A., Slatin, S. L., Kulesza, C. A. and English, L.H. 1994. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 & CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3711-3717.
- ⑯ Van Rie, J., Jansens, S., Hofte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. 1990. Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Mid-Gut as Determinants of the Specificity of B.t.  $\delta$ -Endotoxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1378-1385.
- ⑰ Slaney, A.C., Robbins, H.L. and English, L. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIIIA: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata* Howardii Barber. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 22:9-18.
- ⑱ Roderick L. McCoy, M.D., Andre Silvanovich, 2003. Bioinformatics Analysis of the CP4EPSPS Protein Utilizing the AD4, TOXIN5, and ALLPEPTIDES Databases. Monsanto Technical Report MSL-18752. St. Louis.
- ⑲ Naylor, M.W. 1993. Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS in Albino Mice. Monsanto Technical Report MSL-13077. St. Louis.

- ⑳ McCoy and Silvanovich, 2003. Bioinformatics Analysis of the Cry3Bb1 Protein as Expressed in Corn Event MON88017 Utilizing the AD4, TOXIN5, and ALLPEPTIDES Databases. Monsanto Technical Report MSL-18709. St. Louis.
- ㉑ Kimberly L. Bonnette, M.S., LATG. 2003. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with E.coli-Produced Cry3Bb1.pvzmlr39 Protein. Monsanto Technical Report. MSL-18711. St. Louis.