

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**チヨ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
(DP910521)**

**令和 5 年 3 月 6 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	3
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	3
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	3
(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	4
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	4
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	4
(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	4
(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	5
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	5
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	5
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	6
(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	6
5	挿入遺伝子に関する事項	6
(1)	供与体に関する事項	6

（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	9
（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	10
（７）安定性に関する事項	10
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	10
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	10
（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	10
6 組換え体に関する事項	11
（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	11
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	11
（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	11
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	12
（５）宿主との差異に関する事項	12
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	12
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	12
（８）不活化法に関する事項	12
（９）外国における認可等に関する事項	13
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項	13
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項	13
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	13
IV 審議結果	14
V 参考文献及び参考資料	14

「チョ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（DP910521）」
に係る安全性確認

5 I はじめに

チョ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（DP910521）（以下「DP910521 トウモロコシ」という。）について、令和4年12月13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：チョ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（DP910521）

性質：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネートへの耐性を持つ。

申請者：コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社

開発者：パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社

DP910521 トウモロコシは、トウモロコシのデント種PH184C系統に、*cry1B.34*遺伝子、*pat*遺伝子及び*pmi*遺伝子を導入し作成された。*cry1B.34*遺伝子により発現するCry1B.34たん白質は、標的害虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。さらに、*pat*遺伝子により発現するPATたん白質により、除草剤グルホシネートの阻害を受けず正常に生育することができる。

25 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

宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Zea mays* ssp. *mays* (L.) Iltis)のデント種 PH184C 系統である。

DP910521 トウモロコシには、チョウ目害虫への耐性を付与するため、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1B.34* 遺伝子が導入されている。また、除草剤グルホシネートへの耐性を付与するため *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。さらに選抜マーカーとして *Escherichia coli* (K-12 株) 由来の *pmi* 遺伝子を導入している。

(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）の主な利用は飼料用であり、様々な家畜等に広く利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

DP910521 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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

45 DP910521 トウモロコシは、導入された *pat* 遺伝子により除草剤グルホシネート耐性を持つため、除草剤グルホシネートが使用可能である。このことを除いては従来のトウモロコシと使用方法に相違はない。

50 (1) ~ (4) より、DP910521 トウモロコシの飼料としての安全性評価においては、非組換え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

55 DP910521 トウモロコシは、チョウ目害虫抵抗性及び、除草剤グルホシネート耐性を付与し効率的に害虫及び雑草防除を行うことを目的として作成された。

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

60 宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Z. mays* ssp. *mays* (L.) Iltis)の非組換えデント種 PH184C 系統である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

65 トウモロコシの遺伝的先祖は *Zea* 属のテオシント(*Z. mays* ssp. *mexicana*)で、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)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

70 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、ラフィノース及びトリプシンインヒビターが知られている (OECD, 2002)。フィチン酸は、反芻動物以外の動物において、ミネラルの吸収を阻害することが知られている(OECD、2012)。ラフィノースは腹部を膨満させる原因物質である。トリプシンインヒビターはたん白質分解酵素阻害物質であるが、含有量がごくわずかであり、栄養学的に問題にならないとされている (OECD, 2002)。

75 (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、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

80 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（モザイク病、萎凋細菌病、茎腐病等）が知られているが(OECD, 2003)、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

また、植物病原体の *Fusarium* spp.や、植物体を汚染する糸状菌の *Aspergillus*

85 *flavus*等により生産されるカビ毒が家畜等へ悪影響を及ぼすことが知られているが、
組換え体の作出には、このような汚染がされた宿主を用いることはない。
なお、組換え体の作出においては、培養過程での汚染防止策が確立されており、再
生中の植物や幼植物体は無菌的に維持されている。

90 (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、雑草性は極めて低い。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

95 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。多くの品種では、風媒
による他家受粉が行われる。トウモロコシの近縁植物として、テオシント (*Z.
mays ssp. mexicana*) 及びトリプサカム属 (*Tripsacum spp.*) があるが、テオシン
トは米国のコーン・ベルト地帯、ヨーロッパ、アフリカ、オーストラリア及び日
本を含むアジアには自生していないこと、また、トリプサカム属との交雑は非常
に困難であることが知られている(OECD, 2003)。従って、トウモロコシとの交雑
100 は困難である。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

105 トウモロコシは、長い間飼料利用されてきた歴史がある。日本においては、明
治時代にデント種及びフリント種が導入され、九州、四国や本州で栽培されるよ
うになった。その後、飼料用、子実用及び生食用として幅広く利用されている。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

110 トウモロコシは、子実、サイレージ及び青刈り等が、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

115 トウモロコシは栽培植物であり、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)。収穫時に雌穂又は種子が地上に落下しても、種子の休眠性は
低いことが知られており、さらに土壤温度が 10℃に達し、適度な水分条件を伴う
まで発芽しないため、その多くが自然状態では腐敗し枯死する (菊池, 1987、中村,
2001)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

120 トウモロコシの近縁種としてテオシント (*Z. mays ssp. mexicana*) 及びトリプサ
カム属 (*Tripsacum spp.*) 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
性があるという報告はない。

- 125 4 ベクターに関する事項
- (1) 名称及び由来に関する事項
- DP910521 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP79620 は、大腸菌 (*E. coli*) 等由来のプラスミド pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) を基に作製された。プラスミド pUC19 の構成要素及び機能は明らかとなっている。
- 130 (2) 性質に関する事項
- 導入用プラスミド PHP79620 の塩基配列は 17,763bp である。
- プラスミド PHP79620 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。
- 135 (3) 薬剤耐性に関する事項
- 導入用プラスミド PHP79620 の外骨格領域には、微生物を用いて当該プラスミドを増殖させる際に用いた抗生物質アンピシリン耐性遺伝子 (*bla*) が組み込まれている。この遺伝子を含む外骨格領域は DP910521 トウモロコシ中に導入されていないことが確認されている。
- 140 (4) 伝達性に関する事項
- 導入用プラスミド PHP79620 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。
- 145 (5) 宿主依存性に関する事項
- 導入用プラスミド PHP79620 の外骨格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、植物、家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。さらに DP910521 トウモロコシ中には、これらの領域を含む外骨格領域は導入されていないことが確認されている。
- 150 (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 PHP79620 は、大腸菌 (*E. coli*) 等由来のプラスミド pUC19 を基に作製された。
- 155 (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 PHP79620 の宿主への導入は、パーティクルガン法により行った。詳細は 5 (2) に記載した。
- 160 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
- 以下の表に、導入された遺伝子の名称、その由来及び機能を示す。
- 165

表 1

構成要素	由来	機能
<i>cry1B.34</i> 遺伝子発現カセット		
MMV エンハンサー	ミラビリスモザイクウイルス	MMV エンハンサー領域。
MMV エンハンサー	ミラビリスモザイクウイルス	MMV エンハンサー領域。
LLDAD プロモーター	ラミウム奇形葉関連ウイルス	LLDAD プロモーター領域。
<i>zm-i6</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	翻訳開始因子 6 遺伝子のイントロン領域。
<i>zm</i> -エクステンシン 5' UTR	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	エクステンシン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR)。
<i>cry1B.34</i>	土壌中のグラム陽性細菌 (<i>Bacillus thuringiensis</i>)	Cry1B.34 たん白質をコードする遺伝子。
<i>os-ubi</i> ターミネーター	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	ユビキチン遺伝子のターミネーター領域。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
<i>os-actin</i> プロモーター	イネ (<i>O. sativa</i>)	アクチン遺伝子のプロモーター領域。
<i>os-actin</i> イントロン	イネ (<i>O. sativa</i>)	アクチン遺伝子のイントロン領域。
<i>pat</i>	土壌中のグラム陽性放線菌 (<i>Streptomyces viridochromogenes</i>)	ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (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	35S ターミネーター領域。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット		
<i>ubiZM1</i> プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子のプロモーター領域。
<i>ubiZM1</i> 5'UTR	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子の 5' 非翻訳領域 (UTR)。
<i>ubiZM1</i> イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子のイントロン領域。
FRT1	出芽酵母 (<i>S. cerevisiae</i>)	Flp リコンビナーゼ標的部位。

構成要素	由来	機能
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット		
<i>pmi</i>	大腸菌 (<i>E. coli</i>)	マンノースリン酸イソメラーゼ(PMIたん白質)をコードする遺伝子。
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>)	プロテアーゼインヒビターII 遺伝子(<i>pinII</i>)のターミネーター領域。

② 安全性に関する事項

・ *cry1B.34* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は土壤中に存在するグラム陽性細菌であり、生物農薬としてこれまでに安全に使用されている。ヒト及び家畜等への病原性は認められていない。

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

・ *pmi* 遺伝子の供与体である *E.coli* は哺乳類の腸に広く存在する。K-12 株は研究及び産業用途で安全に使用されており、ヒト及び動物への病原性は認められていない (US EPA, 1997) 。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

DP910521 トウモロコシは、1段階目で PHP71012、PHP70594、PHP21139 及び PHP21875 の4つのプラスミド、2段階目で PHP5096、PHP73572、PHP21875 の3つのプラスミド及び導入用プラスミド PHP79620 を用いて2段階で宿主へ目的遺伝子を導入している。PHP71012 は、部位特異的組換えの挿入標的配列 (以下、LP 配列という。) 含む DNA 配列を有する。PHP70594 は、Cas9 遺伝子及びガイド RNA 発現カセットを含んでおり、エンドヌクレアーゼを産生する。PHP21139、PHP73572 及び PHP21875 は形質転換における植物体の再生率向上を目的とした遺伝子を含む。PHP79620 は挿入 DNA 領域を含む。PHP5096 は Flp 遺伝子発現カセットを含む。産生された FLP たん白質の働きにより、相同組換えが誘起されて LP 配列と挿入 DNA 領域が置換される。

1段階目でパーティクルガン法により PHP70594 を宿主へ導入した後、LP 配列を有する PHP71012 を宿主に導入することで、エンドヌクレアーゼの働きにより切断された配列箇所に LP 配列を挿入した。また、植物体の再生率向上を目的として PHP21139 と PHP21875 を導入しているが、このプラスミドに含まれる遺伝子を含む外骨格領域は DP915635 に導入されていないことが確認されている。その後、次世代シーケンサー解析を行い、意図したとおり LP 配列のみが導入された個体を中間系統として選抜した。

2段階目でパーティクルガン法により導入用プラスミド PHP79620、PHP5096、PHP73572 及び PHP21875 を中間系統へ導入した。PHP5096 は Flp 遺伝子発現カセットを含んでいるため、導入に伴い FLP たん白質が産生される。その結果、

PHP79620 中の FRT1 及び FRT87 と、既にゲノムに挿入されている LP 配列中の FRT1 及び FRT87 との間で部位特異的組換えが誘導され、PHP79620 のうち挿入 DNA 領域だけがゲノム DNA 上の LP 配列中に挿入された。

205 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

210 *cry1B.34* 遺伝子発現カセットにはラミウム奇形葉関連ウイルス由来の LLDVAV プロモーター、*pat* 遺伝子発現カセットにはイネ(*O. sativa*) 由来の *os-actin* プロモーター、*pmi* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ由来の *ubiZM1* プロモーターが使用されている。

② ターミネーターに関する事項

215 *cry1B.34* 遺伝子発現カセットにはイネ(*O. sativa*) 由来の *os-ubi* ターミネーター、*pat* 遺伝子発現カセットにはカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S ターミネーター、*pmi* 遺伝子発現カセットにはジャガイモ(*S. tuberosum*)由来の *pin II* ターミネーターが使用されている。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

220 導入用プラスミド PHP79620 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

以下に導入遺伝子の機能を示す。

・ *cry1B.34* 遺伝子

225 *Cry1B.34* たん白質を発現する。当該たん白質は、標的害虫である特定のチョウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。なお、*Cry1B.34*たん白質を用いた結合試験の結果から、*Cry1B.34*たん白質は代表的な *Cry* たん白質 (*Cry1Ab* たん白質、*Cry2Ab* たん白質、*Vip3Aa* たん白質及び *Cry1F* たん白質) が結合する受容体とは異なる受容体に結合することが示唆されている。

・ *pat* 遺伝子

235 *PAT* たん白質を発現する。当該たん白質は、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-グルホシネートに代謝し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)。

・ *pmi* 遺伝子

240 *PMI* たん白質を発現させる。当該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。トウモロコシを含む多くの植物はマンノースを炭素源として利用できないが、*PMI* たん白質を産生する植物は炭素源

としてマンノースを含む培地において成長することが可能なため、組換え植物の選抜マーカーとして用いられる (Negrotto *et al.*, 2000)。

245 (5) 純度に関する事項

導入用プラスミド PHP79620 の挿入 DNA 領域の塩基数は 13,917 bp であり、その塩基配列並びに構成要素の大きさ及び由来は明らかである。挿入しようとする全ての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。

250

(6) コピー数に関する事項

次世代シーケンサーによる分析 (Southern by Sequencing (SbS) 分析) の結果、DP910521 トウモロコシのゲノム DNA 中には PHP79620 由来の配列として挿入 DNA 領域だけが 1 コピー挿入されていることが確認された。

255

また、他のプラスミドについても非意図的な配列が存在しないこと、遺伝子の挿入により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も確認された。

(7) 安定性に関する事項

260

DP910521 トウモロコシに導入された遺伝子の後代における安定性を確認するため、5 世代の葉組織から抽出したゲノム DNA を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、導入遺伝子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。

265

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DP910521 トウモロコシにおける Cry1B.34 たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質の産生量を ELISA 法により測定した。その結果、いずれのたん白質も分析を行った全ての組織において産生が確認された。

270

(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 PHP79620 の外骨格領域には、微生物を用いて当該プラスミドを増殖させる際に用いた抗生物質アンピシリン耐性遺伝子 (*bla*) が組み込まれている。このマーカー遺伝子については、SbS 分析により、DP910521 トウモロコシ中に組み込まれていないことが確認されている。

275

(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

280

DP910521 トウモロコシに挿入された DNA 及びその近傍配列のオープンリーディングフレーム(ORF)を調べるため終止コドンから終止コドンまで 8 アミノ酸以上のペプチドをコードする ORF を検索した。その結果 925 個の ORF が検出されたが、これら ORF について、既知の毒性たん白質と相同性は認められなかった。

6 組換え体に関する事項

285 (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

DP910521 トウモロコシ中には、挿入された遺伝子により Cry1B.34 たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質が産生される。

290 Cry1B.34 たん白質は、標的害虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊する。この働きにより特定のチョウ目昆虫に殺虫活性を示す。

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て無毒化するため、DP910521 は除草剤グルホシネートの除草作用に対する耐性を示す。

295 PMI たん白質は選抜マーカーであり、マンノース-6-リン酸をフルクトース-6-リン酸に変換するため、DP910521 はマンノースを炭素源とする選抜培地において成長することが可能である。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

300 Cry1B.34 たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質と、既知毒性たん白質との相同性を検討するため、UniprotKB/Swiss-Prot 毒性たん白質データベースを用いて、BLASTP (version 2.11.0+) によるアミノ酸配列検索を行った。

その結果、いずれのたん白質についても既知毒性たん白質との間に相同性は認められなかった。

305 なお Cry1B.34 たん白質の殺虫スペクトラムについて、チョウ目、コウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目及びトビムシ目の 5 目 16 種の生物種に対する生物検定により評価した。その結果、Cry1B.34 たん白質に対して、特定のチョウ目昆虫のみが感受性を示すことが確認された。評価に用いたチョウ目昆虫では、タテハチョウ科、トモエガ科、ヤガ科及びツトガ科に属する昆虫で感受性が確認された。

310 (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

315 Cry1B.34 たん白質について、消化性試験（人工胃液及び腸液）、加熱処理感受性試験を行った。その結果、消化性試験については人工胃液 37℃の条件下で 30 秒後には、Cry1B.34 たん白質の分子量約 129kDa 及び Cry1B.34 たん白質の部分断片である約 15 kDa のバンドは消失したが、試験開始 30 秒後に約 20 kDa のバンド及び 5 kDa 以下の複数のバンドが認められた。また、約 20 kDa のバンドは試験開始 5 分後には消失した一方で、5 kDa 以下の複数のバンドは試験開始 60 分後でも検出された。そのため Cry1B.34 たん白質を人工胃液で 10 分間処理した後、続いて人工腸液で処理した結果、30 秒以内には完全に消化されることが確認された。

320 人工腸液 37℃の条件下では分子量約 129 kDa の Cry1B.34 たん白質は試験開始 30 秒後で消失するものの、約 75 kDa 以下の複数のバンドが反応 60 分後でも検出された。

また、75℃以上の加熱処理を加えた場合、標的となるチョウ目害虫の致死率は Cry1B.34 たん白質を投与しなかった場合の致死率と同程度まで低下した。なお、

325 本試験には *E.coli* で生産した Cry1B.34 たん白質を用いており、当該たん白質が DP910521 トウモロコシ由来のたん白質と同等であることは確認済みである。

PMI たん白質及び PAT たん白質については、同一のたん白質を発現する作物が既に承認されており（PMI たん白質:トウモロコシ SYN-IR162-4、PAT たん白質:トウモロコシ DP-004114-3）、物理化学的処理に対する感受性も同様の結果であると考えられる。

330

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

Cry たん白質が酵素活性を有することを示す報告はない。したがって、Cry1B.34 たん白質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いと考えられる。

335

PAT たん白質は、グルホシネートの除草剤成分である L-ホスフィノスリシンに対して極めて高い基質特異性を有しており、その他の内在性化合物を代謝して、宿主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る。

PMI たん白質はマンノース 6 リン酸からフルクトース 6 リン酸への異性化反応を可逆的に触媒するが、マンノース 6 リン酸を炭素源として利用可能にするものを除き、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。

340

(5) 宿主との差異に関する事項

DP910521 トウモロコシ及び宿主の非組換えトウモロコシの茎葉及び種子について、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び有害生理活性物質の分析を行ったところ、統計学的有意差が認められたものがあつたが、分析した全ての成分において、分析値は従来商業品種の変動の範囲内又は文献値の範囲内であった。これらの相違が安全性に影響を与えているとは考えられない。

345

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

350

これまでに実施した圃場試験において、DP910521 トウモロコシと非組換えトウモロコシとの間に、外界における生存及び増殖能力の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

355

DP910521 トウモロコシと非組換えトウモロコシにおいて、生存及び増殖能力の制限要因に関しても変わりはない。

(8) 不活化法に関する事項

360

DP910521 トウモロコシも従来のトウモロコシと同様に、物理的防除（耕起）や化学的防除（感受性を示す除草剤の使用）など、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

申請国	目的	申請/承認年月			申請先
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
■	■	■	■	■	■
	■	■	■	■	■
EU	食品・飼料としての利用	2022 年	6 月	申請	欧州食品安全機関（EFSA）

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

DP910521 トウモロコシでは、発芽から生育期までの栽培管理において、標的とするチョウ目害虫の防除のための薬剤使用が軽減されうること及び除草剤グルホシネートによる雑草防除が可能なことを除き、栽培方法は従来のトウモロコシと相違ない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

従来のトウモロコシと相違はない。なお、宿主の非組換えトウモロコシ PH184C 系統の種子及び試験に使用した DP910521 トウモロコシの各世代の種子は保管されている。

- 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該当しない。

IV 審議結果

チョ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 (DP910521) 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續」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Abbitt, S.E. (2017). SB-UBI terminator sequence for gene expression in plants. US Patent. Patent No. US 9725731 B2.
- 2 AFSI. (2021). Agriculture and Food Systems Institute Crop Composition Database (Version 8.0). (<https://www.cropcomposition.org/>). Accessed on April 13th, 2021.
- 3 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.
- 4 Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, 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.
- 5 Brink, K., Anitha, S., Beatty, M., Anderson, J.A., Lyon, M., Weaver, J. and Dietrich, N. (2019). Comparison of Southern-by-Sequencing (SbSTM) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. Journal of Regulatory Science. 7: 1-14.
- 6 CERA. (2016). A Review of the Food and Feed Safety of the PAT Protein. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment.
- 7 CFIA. (1994). The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/zea-mays-l/eng/1330985739405/1330985818367>) Accessed on June 9th, 2022.
- 8 Cheo, D.L., Titus, S.A., Byrd, D.R.N., Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2004). Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: Functional analysis of multi-segment expression

clones. *Genome Research*. 14: 2111-2120.

- 430 9 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.
- 435 10 CODEX. (2019). Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius
Commission. CODEX-STAN 210-1999.
- 440 11 Cong B, Maxwell C, Luck S, Vespestad D, Richard K, Mickelson J, Zhong C (2015).
Genotypic and Environmental Impact on Natural Variation of Nutrient
Composition in 50 Non Genetically Modified Commercial Maize Hybrids in North
America. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 5321-5334.
- 445 12 Crickmore, N., Berry, C., Panneerselvam, S., Mishra, R., Connor, T.R., Bonning,
B.C. (2021). A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other
bacteria-derived pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*. 186:
107438
- 450 13 Dale, E.C. and Ow, D.W. (1990). Intra- and intermolecular site-specific
recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. *Gene*. 91:
79-85.
- 455 14 de Freitas, F.A., Yunes, J.A., da Silva, M.J., Arruda, P. and Leite, A. (1994).
Structural characterization and promoter activity analysis of the γ -kafirin gene
from sorghum. *Molecular and General Genetics*. 245: 177-186.
- 460 15 Delaney, B., Astwood, J.D., Cunny, H., Conn, R.E., Herouet-Guicheney, C.,
MacIntosh, S., Meyer, L.S., Privalle, L., Gao, Y., Mattsson, J. and Levine, M. (2008).
Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and
Chemical Toxicology*. 46: S71-S97.
- 465 16 Dey, N. and Maiti, I.B. (1999). Structure and promoter/leader deletion analysis of
mirabilis mosaic virus (MMV) full-length transcript promoter in transgenic plants.
Plant Mol Biol. 40: 771-782.
- 17 Diehen, S., Nott, A., Selinger, D.A., Simmons, C., Bhyri, P. and Tavva, V. (2019).
Regulatory sequences for modulating transgene expression in plants. United States

Patent. Patent No. US 10344290.

- 470 18 Flannagan, R.D. and Abad, A. (2009). *Bacillus thuringiensis* CRY9 nucleic acids. United States Patent. Patent No. US 7541517.
- 19 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-
475 nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.
- 20 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.
- 480 21 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.
- 22 Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982).
485 Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.
- 23 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.
- 490 24 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.
495 *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41: 134-149.
- 25 Izumi Wilcoxon, M. and Yamamoto, T. (2016). Insecticidal polypeptides having improved activity spectrum and uses thereof. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2016061197.
- 500 26 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2: 571-589.
- 27 Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary
505 structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14: 5641-5650.
- 28 Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996). Vectors

510 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: 165-174.

29 Lassner, M., Jantz, D., Smith, J.J., Cigan, M., Falco, C., Gao, H., Li, Z., Liu, Z-B.
 515 and Svitashhev, S. (2018). Methods for Producing a Complex Transgenic Trait Locus.
 United States Patent. Patent No. US10030245 B2.

30 Lowe, K., Wu, E., Wang, N., Hoerster, G., Hastings, C., Cho, M.-J., Scelonge, C.,
 Lenderts, B., Chamberlin, M., Cushatt, J., Wang, L., Ryan, L., Khan, T., Chow-Yiu,
 J., Hua, W., Yu, M., Banh, J., Bao, Z., Brink, K., Igo, E., Rudrappa, B., Shamseer,
 520 P., Bruce, W., Newman, L., Shen, B., Zheng, P., Bidney, D., Falco, C., Register, J.,
 Zhao, Z.-Y., Xu, D., Jones, T. and Gordan-Kamm, W. (2016). Morphogenic regulators
Baby boom and *Wuschel* improve monocot transformation. The Plant Cell. 28: 1998-
 2015.

525 31 Lundry, D.R., Burns J.A., Nemeth, M.A. and Riordan, S.G. (2013). Composition of
 Grain and Forage from Insect-Protected and Herbicide-Tolerant Corn, MON 89034
 x TC1507 x MON 88017 x DAS-59122-7 (SmartStax), Is Equivalent to That of
 Conventional Corn (*Zea mays* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:
 1991-1998.

530 32 Negrotto, D., Jolley, M., Beer, S., Wenck, A.R. and Hansen, G. (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.

535 33 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.
 540 (<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
 Accessed on June 9th, 2022.

34 OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new
 varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and
 545 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 June 9th, 2022.

550

555

560

565

570

575

580

585

590

- 35 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 June 9th, 2022.
- 36 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.
- 37 OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, anti-nutrients, toxicants and allergens. ENV/JM/MONO(2012)24. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 38 Proteau, G., Sidenberg, D. and Sadowski, P. (1986). The minimal duplex DNA sequence required for site-specific recombination promoted by the FLP protein of yeast *in vitro*. Nucleic Acids Research. 14: 4787-4802.
- 39 Sutcliffe, J.G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 75(8):3737-3741.
- 40 Tao, Y., Bidney, D., Gordon-Kamm, W. and Lyznik, L. (2007). Modified FRT recombination sites and methods of use. World Intellectual Property Organization. Application No.PCT/US2006/027380.
- 41 戸澤英男. (2005). トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用－. 農文協. pp.56-59, p.99, p.122, p.257, pp.324-327.
- 42 US EPA (1997) *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency, (<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra004.pdf>). Accessed on June 9th, 2022.
- 43 US EPA. (1998). Reregistration Eligibility Decision (RED): *Bacillus thuringiensis*. United States Environmental Protection Agency. EPA738-R-98-004. (<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/0247.pdf>).

Accessed on June 9th, 2022.

- 44 US EPA. (2001). Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-incorporated protectants (October 15, 2001). United States
595 Environmental Protection Agency.

(http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm).

Accessed on June 9th, 2022.

- 600 45 Wang, J., Jiang, J. and Oard, J.H. (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*. 156: 201-211.

- 46 Watson, S.A. (1982). “Corn: amazing maize. general properties” . CRC handbook
605 of processing and utilization in agriculture. Volume II. Wolff, I.A. eds. CRC Press Inc., Boca Raton. pp.3-29.

- 47 Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillemann, D., Strauch, E. and Pühler, A. (1988). Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyl transferase gene from
610 *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 70: 25-37.

- 48 Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.
615 *Gene*. 33(1):103-19.

- 49 財務省. (2021). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on June 9th, 2022.

- 620 50 Zastrow-Hayes, G.M., Lin, H., Sigmund, A.L., Hoffman, J.L., Alarcon, C.M., Hayes, K.R., Richmond, T.A., Jeddeloh, J.A., May, G.D. and Beatty, M.K. (2015). Southern-by-Sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. *The Plant Genome*. 8: 1-15.

- 625 51 Zhang, L., Lockhart, B., Dahal, G. and Olszewski, N. (2008). Studies on biology and genomic characterization of a caulimo-like virus associated with a leaf distortion disease of *Lamium maculatum*. *Archives of Virology*. 153: 1181-1184.

630

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2020-025_021).
- 635 2 トウモロコシ茎葉及び子実中の構成成分文献値一覧
- 3 Description and Sequence of the Recombination Fragment Region from Plasmid PHP79620 (STUDY NUMBER: PHI-2020-160).
- 4 Cry1B.34 Binding Data Summary (PHI-R019-Y23).
- 5 Spectrum of Activity and Non-Target Organism Analysis.
- 640 6 Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-91Ø521-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2021-045).
- 7 Sequence Characterization of Insert and Flanking Regions of DP-91Ø521-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2021-064).
- 8 Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-91Ø521-2
645 (STUDY NUMBER: PHI-2021-194_230).
- 9 Characterization of DP-91Ø521-2 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-052).
- 10 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2020-024_700).
- 650 11 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-91Ø521-2 (STUDY NUMBER: PHI-2021-195_225).
- 12 Characterization of Cry1B.34 Protein Derived from DP-91Ø521-2 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2021-115).
- 13 Characterization of Cry1B.34 (PCF-0042) Protein Derived from a Microbial
655 Expression System (STUDY NUMBER: PHI-2020-093).
- 14 Comparison of in planta Cry1B.34 and Microbially Produced Cry1B.34 Proteins by in silico Pepsin Digestion (STUDY NUMBER: PHI-2021-241).
- 15 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Cry1B.34 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-055).
- 660 16 Characterization of Cry1B.34 Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-056).
- 17 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Cry1B.34 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2021-078).

- 665 18 Determination of the Biological Activity of Heat-Treated Cry1B.34 Protein
Incorporated in an Artificial Diet and Fed to *Spodoptera frugiperda* (STUDY
NUMBER: PHI-2021-067).
- 19 Amino Acid Sequence Alignment: PMI-DP910521 vs. MIR162 vs. DP23211, PAT-
DP910521 vs. DP4114.