

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**チョウ目害虫抵抗性及び
除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
(DAS1131)**

**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	8
（４）性質に関する事項	8
（５）純度に関する事項	9
（６）コピー数に関する事項	9
（７）安定性に関する事項	9
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	9
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	9
（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	10
（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	10
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	10
（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	10
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	11
（５）宿主との差異に関する事項	11
（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	12
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項	12
（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	13
V 参考文献及び参考資料	13

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ（DAS1131）」
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リホサート耐性トウモロコシ（DAS1131）（以下「DAS1131 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リホサート耐性トウモロコシ（DAS1131）
性 質：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサートへの耐性を持つ。
15 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

DAS1131 トウモロコシは、トウモロコシのデント種 B104 系統に、改変 *cry1Da2* 遺伝子及び *dgt-28 epsps* 遺伝子を導入し作成された。改変 *cry1Da2* 遺伝子により発現する改変 Cry1Da2 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、*dgt-28 epsps* 遺伝子により発現する DGT-28 EPSPS たん白質により、除草剤グリホサート耐性を付与する。

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 B104 系統である。

30 DAS1131 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* 由来の改変 *cry1Da2* 遺伝子が導入されている。また、除草剤グリホサートへの耐性を付与するため *Streptomyces sviveus* 由来の *dgt-28 epsps* 遺伝子が導入されている。なお、当該遺伝子には *Brassica* 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列が含まれる。

35 (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。

40 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

DAS1131 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 DAS1131 トウモロコシは、導入された *dgt-28 epsps* 遺伝子により除草剤グリ
ホサート耐性を持つため、除草剤グリホサ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、DAS1131 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

DAS1131 トウモロコシは、チョウ目害虫抵抗性及び、除草剤グリホサート耐性を
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。

55

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Z. mays* ssp. *mays* (L.) Iltis)の非
組換えデント種 B104 系統である。

60

(2) 遺伝的先祖に関する事項

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)。

65

(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)。

70

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

130

DAS1131 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP88492 は、アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)) 等由来のプラスミド pSB11 の抗生物質スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) を持つ pBin19 から作製された。プラスミド pSB11 及び pBin19 の構成要素及び機能は明らかとなっている。

135

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PHP88492 の塩基配列は 18,024bp である。

プラスミド PHP88492 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。

140

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PHP88492 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スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) が組み込まれている。この遺伝子を含む外骨格領域は DAS1131 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。

145

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PHP88492 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。

150

(5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PHP88492 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 DAS1131 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。

155

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

160

導入用プラスミド PHP88492 は、アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)) 等由来のプラスミド pSB11 の抗生物質スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) を持つ pBin19 から作製された。

165

(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 PHP88492 の宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。詳細は5 (2) に記載した。

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

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。

表 1

構成要素	由来	機能
<i>cry1Da2</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。
改変 <i>cry1Da2</i>	土壌中のグラム陽性細菌 (<i>B. thuringiensis</i>)	改変 <i>Cry1Da2</i> たん白質をコードする遺伝子。
<i>ubiZM1</i> ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子のターミネーター領域。
<i>dgt-28 epsps</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。
<i>dgt-28 epsps</i>	土壌中のグラム陽性細菌(<i>S. sviveus</i>) アブラナ (<i>Brassica napus</i> L. 及び <i>Brassica rapa</i>)	DGT-28 EPSPS たん白質をコードする遺伝子。 当該遺伝子には <i>Brassica</i> 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列が含まれる。
<i>ubiZM1</i> ターミネーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	ユビキチン遺伝子のターミネーター領域。

② 安全性に関する事項

・改変 *cry1Da2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は土壌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。

・*dgt-28 epsps* 遺伝子の供与体である *S. sviveus* は、土壌中に広く存在し、ヒト及び動物に対する病原性は報告されていない(OECD, 1999)。*B. napus* L.

180 及び *B. rapa* はアブラナ科に属し、初期品種にはヒトやその他の動物に有害な
エルカ酸とグルコシノレートが含まれる (Eskin and Przybylski, 2003)。こ
れらの含量について特定の基準を満たすために品種改良がおこなわれ、現在
では低エルカ酸及び低グルコシノレートの品種が栽培されている (OGTR,
2011)。なお、*B. napus* L. 及び *B. rapa* に由来するキメラ葉緑体輸送ペプチド
185 は葉緑体への輸送時に切断されるため、それ自体が植物の代謝系に影響を及
ぼすことはない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

DNA の宿主への導入は、アグロバクテリウム DAt13192 株 (Merlo et al., 2012)
を用いてアグロバクテリウム法により行った。

190 導入用プラスミド PHP88492 を含むアグロバクテリウムを、宿主 B104 系統の
未熟胚に接種し、培養した。その後、除草剤グリホサート及びアグロバクテリウ
ム除去用の抗生物質カルベニシリンを添加した培地で胚を培養することにより、
DNA が導入された宿主を選抜した。植物体を再生し、T0 世代とした。その後 1 個
体の T0 世代と B104 を交配して T1 世代を育成した。安全性評価の対象は T1 世代
195 以降としており、いずれの世代も PCR 法により目的遺伝子が挿入されている個体
を選抜して得た。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

200 改変 *cry1Da2* 遺伝子発現カセット及び *dgt-28 epsps* 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

改変 *cry1Da2* 遺伝子発現カセット及び *dgt-28 epsps* 遺伝子発現カセットには、
205 トウモロコシ由来の *ubiZM1* 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

導入用プラスミド PHP88492 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。

210

(4) 性質に関する事項

以下に導入遺伝子の機能を示す。

・改変 *cry1Da2* 遺伝子

改変 *Cry1Da2* 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
215 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、改変 *Cry1Da2* たん白質を用いた結合試験の結果から、改
変 *Cry1Da2* 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。

220

・ *dgt-28 epsps* 遺伝子

225

DGT-28 EPSPS たん白質を発現する。当該たん白質はホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸から 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸への特異的な変換を触媒する。トウモロコシが有する内在性 EPSPS たん白質とは異なり、DGT-28 EPSPS たん白質は除草剤グリホサートに対して非感受性であり、除草剤グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、本組換えトウモロコシは除草剤グリホサートの存在下でも生育することができる。また、DGT-28 EPSPS たん白質の触媒効率は既知のグリホサート非感受性 EPSPS たん白質と同程度以上である (Griffin *et al.*, 2021)。

230

(5) 純度に関する事項

235

導入用プラスミド PHP88492 の挿入 DNA 領域の塩基数は 12,664 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。

240

(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、DAS1131 トウモロコシのゲノム DNA 中には PHP88492 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。

また、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。

245

(7) 安定性に関する事項

DAS1131 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。

250

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DAS1131 トウモロコシにおける改変 Cry1Da2 たん白質、DGT-28 EPSPS 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。

255

(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 PHP88492 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スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*spc*) 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、DAS1131 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。

260

- (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

265 DAS1131 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 723 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

- (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

270 DAS1131 トウモロコシ中には、挿入された遺伝子により改変 Cry1Da2 たん白質、DGT-28 EPSPS たん白質が産生される。

改変 Cry1Da2 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。

275 DGT-28 EPSPS たん白質はトウモロコシが有する内在性 EPSPS たん白質とは異なり、除草剤グリホサートに対して非感受性であり、除草剤グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、除草剤耐性を示す。

- (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

280 改変 Cry1Da2 たん白質及び DGT-EPSPS 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 2.10.0+) 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。

285 なお、改変 Cry1Da2 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、改変 Cry1Da2 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の中では、ヤガ科及びタテハチョウ科に属する昆虫で感受性が確認された。

290

- (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

295 改変 Cry1Da2 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、改変 Cry1Da2 たん白質の分子量約 68kDa のバンドは消失したが、60 分後まで 5 kDa 以下の複数のバンドが認められた。そのため改変 Cry1Da2 たん白質を人工胃液で 1 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。

300 人工腸液 37℃の条件下では分子量約 68 kDa の改変 Cry1Da2 たん白質は試験開始 30 秒後で消失するものの、68 kDa より僅かに小さいバンド及び約 20 kDa 以上の複数のバンドは 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改変 Cry1Da2 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、本試験には *Pseudomonas fluorescens* で生産した改変 Cry1Da2 たん白質を用いており、当該たん白質が DAS1131 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。

DGT-28 EPSPS たん白質については消化性試験（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、DGT-28 EPSPS たん白質の分子量約 45kDa のバンドは消失したが、60 分後まで 5 kDa 以下の複数のバンドが認められた。そのため DGT-28 EPSPS たん白質を人工胃液で 2 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。

人工腸液 37℃の条件下では分子量約 45 kDa の DGT-28 EPSPS たん白質は反応開始 30 秒後以内に消失した。また、25℃で加熱処理した場合、非加熱対象と同等の酵素活性を示したが、37℃の加熱処理を加えた場合、その酵素活性は 33.4%まで低下し、50℃以上の加熱処理で酵素活性は検出されなかった。なお、本試験には *E. coli* で生産した DGT-28 EPSPS たん白質を用いており、当該たん白質が DAS1131 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。

（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、改変 Cry1Da2 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。

DGT-28 EPSPS たん白質がコードする EPSPS たん白質は芳香族アミノ酸の生合成経路の前駆体（コリスミ酸）を生成するシキミ酸経路における律速酵素ではないと示唆されており、通常の 40 倍の EPSPS たん白質を生成する植物培養細胞においても、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている。加えて、DGT-28 EPSPS たん白質の触媒効率は、トウモロコシが有する内在性 DGT-28 EPSPS たん白質の触媒効率の 4 分の 1 程度であることから、DGT-28 EPSPS たん白質の導入により芳香族アミノ酸が過剰に生成する可能性は低いと考えられる。なお、これらの基質以外にシキミ酸が EPSPS たん白質と反応することが知られているが、その反応性はシキミ酸-3-リン酸との反応性の約 200 万分の 1 であり、生体内で基質として反応する可能性は極めて低い。また、DGT-28 EPSPS たん白質は、除草剤グリホサートに非感受性である以外は、構造的にも機能的にも他の EPSPS たん白質と類似しており、同一の作用機作をもつ。したがって、DGT-28 EPSPS たん白質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

（５）宿主との差異に関する事項

DAS1131 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つた。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。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

345 これまでに実施した圃場試験において、DAS1131 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

350 DAS1131 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

355 DAS1131 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

365 DAS1131 トウモロコシでは、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リホサ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

370 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 B104 系
統の種子及び試験に使用した DAS1131 トウモロコシの各世代の種子は保管されて
いる。

375 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。

IV 審議結果

380 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ (DAS1131) 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

- 385 1 AFISI. (2021). Agriculture and Food Systems Institute Crop Composition Database
(Version 8.0).
(<https://www.cropcomposition.org/>).
Accessed on April 13th, 2021.
- 390 2 Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R.,
Corbin, D.R., Miles, R.R., Arnold, N.L., Strange, T.L., Simpson, M.A., Cao, Z.,
Carroll, C., Pawelczak, K.S., Blue, R., West, K., Rowland, L.M., Perkins, D., Samuel,
P., Dewes, C.M., Shen, L., Sriram, S., Evans, S.L., Rebar, E.J., Zhang, L., Gregory,
395 P.D., Urnov, F.D., Webb, S.R. and Petolino, J.F. (2013). Trait stacking via targeted
genome editing. Plant Biotechnology Journal. 11: 1126-1134.
- 400 3 Ainley, W.M., Blue, R.C., Murray, M.G., Corbin, D.R., Miles, R.R. and Webb, S.R.
(2018). Engineered landing pads for gene targeting in plants. US Patent. Patent No.
US 10160975.
- 405 4 Baxevanis, A.D. (2005). “Assessing pairwise sequence similarity: BLAST and
FASTA” . Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins,
3rd edition. Baxevanis, A.D. and Ouellette, B.F.F. eds. John Wiley & Sons, Inc.
pp.295-324.
- 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

- 410 Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. Journal
of Regulatory Science. 7: 1-14.
- 6 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>).
415 Accessed on June 9th, 2022.
- 7 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
420 Molecular Biology. 18: 675-689.
- 8 CODEX. (2019). Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius
Commission. CODEX-STAN 210-1999.
- 425 9 Cong, B., Maxwell, C., Luck, S., Vespestad, D., Richard, K., Mickelson, J. and
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.
- 430 10 Eskin, N., Przybylski, R. (2003). Rape Seed Oil/Canola. In Encyclopedia of Food
Sciences and Nutrition, Ed 2nd. Academic Press.
- 11 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon
Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-
435 nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research. 13: 7095-7106.
- 12 Griffin, S.L., Chekan, J.R., Lira, J.M., Robinson, A.E., Yerkes, C.N., Siehl, D.L.,
Wright, T.R., Nair, S.K. and Cicchillo, R.M. (2021). Characterization of a
Glyphosate-Tolerant Enzyme from *Streptomyces svecius*: A Distinct Class of 5-
440 Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthases. Journal of Agricultural and Food
Chemistry. 69(17):5096-5104.
- 13 Gruys, K.J., Walker, M.C. and Sikorski, J.A. (1992). Substrate synergism and the
steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*.
445 Biochemistry. 31(24):5534-5544.
- 14 Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro
site-specific recombination. Genome Research. 10: 1788-1795.

- 450 15 Herrmann, Klaus M. (1983). "The common aromatic biosynthetic pathway". Amino
Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. Herrmann, K.; Somerville, R. eds.,
Addison-Wesley Publishing Co. 301-322.
- 16 Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system.
455 Expert Opinion on Drug Discovery. 2: 571-589.
- 17 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
460 markers. The Plant Journal. 10: 165-174.
- 18 Kumar, S., Gupta, M. and Alabed, D. (2017). Use of a Maize Untranslated Region
for Transgene Expression in Plants. US Patent. Patent No. US 9688996.
- 465 19 Lira, J.M., Cicchillo, R.M., Yerkes, C. and Robinson, A.E. (2013). Glyphosate
Resistant Plants and Associated Methods. World Intellectual Property
Organization. Patent No. WO 2013116700.
- 20 Lundry, D.R., Burns, J.A., Nemeth, M.A. and Riordan, S.G. (2013). Composition of
470 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.
- 475 21 Merlo, D.J., Russell, S.M., Retallack, D., Woosley, A., Meade, T. and Narva, K.E.
(2012). Strains of agrobacterium modified to increase plant transformation
frequency. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2012/016222.
- 22 OECD. (1999). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology
480 No.10. Consensus document on general information concerning the genes and their
enzymes that confer tolerance to glyphosate herbicide. ENV/JM/MONO(99)9.
- 23 OECD. (2002). Consensus document on compositional considerations for new
varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and
485 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 23th, 2021.
- 490

- 24 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).
 495 Accessed on June 23th, 2021.
- 25 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
 500 economic co-operation and development. ENV/JM/MONO(2007)14.
- 26 OGTR. (2011). The Biology of *Brassica napus* L. (canola). Office of the Gene Technology Regulator.
- 505 27 Peralta, E.G., Hellmiss, R. and Ream, W. (1986). *Overdrive*, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumour-inducing plasmid. The EMBO Journal. 5: 1137-1142.
- 510 28 Smart, C.C., Johanning, D., Müller, G. and Amrhein, N. (1985). Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. Journal of Biological Chemistry. 260(30): 16338-16346.
- 515 29 Tan, S.Y., Sheets, J.J., Glancy, T., Woosley, A.T., Worden, S.E., Alabed, D., Burton, S., McLaughlin, K.C., Narva, K.E. and Meade, T. (2018). Cry1d for Controlling Corn Earworm. US Patent. Patent No. US 9890390.
- 520 30 戸澤英男. (2005). トウモロコシー歴史・文化、特性・栽培、加工・利用ー. 農文協. pp.56-59, p.99, p.122, p.257, pp.324-327.
- 525 31 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.
- 530 32 US EPA. (2001). Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* (Bt) plant-incorporated protectants (October 15, 2001). United States Environmental Protection Agency. (http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/pip/bt_brad.htm). Accessed on June 9th, 2022.

- 33 Watson, S.A. (1982). “Corn: amazing maize. general properties” . CRC handbook of processing and utilization in agriculture. Volume II. Wolff, I.A. eds. CRC Press Inc., Boca Raton. pp.3-29.
- 535
- 34 Weiss, U. and Edwards, J.M. (1980). “Regulation of the shikimate pathway”. The biosynthesis of aromatic compounds, New York : John Wiley. 287-301.
- 35 財務省. (2021). 財務省貿易統計.
 540 (<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
 Accessed on June 9th, 2022.
- 36 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-
 545 by-Sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant Genome. 8: 1-15.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 550 1 Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2020-021/021).
- 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 T-DNA Region from Plasmid PHP88492 (STUDY ID: PHI-2020-140).
- 555 4 Cry1Da2 Binding Data Summary (STUDY ID: PHI-R018-Y23).
- 5 Spectrum of Activity and Non-Target Organism Analysis.
- 6 Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DAS-Ø1131-3 Maize (STUDY ID: PHI-2021-044).
- 7 Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DAS-Ø1131-
 560 3 Maize (STUDY ID: PHI-2020-173).
- 8 Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2021-171/230).
- 9 Characterization of DAS-Ø1131-3 Maize for Insertion Stability in Five Generations Using Southern Blot Analysis (SYUDY ID: PHI-2021-051).
- 565 10 Expressed Trait Protein Concentration of a Maize Line Containing Event DAS-Ø1131-3 (STUDY ID: PHI-2020-019/700).
- 11 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DAS-Ø1131-3

(STUDY ID: PHI-2021-173/225).

- 570 12 Characterization of Cry1Da2 Protein Derived from DAS-Ø1131-3 Maize (STUDY ID: PHI-2021-148).
- 13 Characterization of Cry1Da2 Protein Derived from a Microbial Expression System (STUDY ID: PHI-2020-28).
- 14 Comparison of Cry1Da2 in planta and Microbially Produced Cry1Da2 Proteins by in silico Pepsin Digestion (STUDY ID: PHI-2021-242).
- 575 15 Characterization of DGT-28 EPSPS Protein Derived from DAS-Ø1131-3 Maize (STUDY ID: PHI-2021-151).
- 16 Characterization of DGT-28 EPSPS Protein Lot PCF-0054 Derived from a Microbial Expression System (STUDY ID: PHI-2021-049).
- 580 17 Comparison of in planta DGT-28 EPSPS and Microbially Produced DGT-28 EPSPS Proteins by in silico Pepsin Digestion (STUDY ID: PHI-2021-243).
- 18 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Cry1Da2 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-098).
- 19 Characterization of Cry1Da2 Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY ID: PHI-2021-100).
- 585 20 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of DGT-28 EPSPS Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-099).
- 21 Characterization of DGT-28 EPSPS Following In Vitro Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY ID: PHI-2021-102).
- 590 22 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Cry1Da2 Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-101).
- 23 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of DGT-28 EPSPS Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY ID: PHI-2021-103).
- 24 Determination of the Biological Activity of Heat-Treated Cry1Da2 Protein Incorporated in an Artificial Diet and Fed to *Spodoptera frugiperda* (STUDY ID: PHI-2021-072).
- 595 25 Determination of the Enzymatic Activity of Heat-Treated DGT-28 EPSPS Protein (STUDY ID: PHI-2021-145).