

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**コウチュウ目害虫抵抗性及び
除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
(DP915635)**

**令和 6 年 9 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	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	5
(1)	名称及び由来に関する事項	5
(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	9
（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	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	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	11
（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	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	12
（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	13
V 参考文献及び参考資料	13

「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（DP915635）」
に係る安全性確認

I はじめに

5 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（DP915635）
 （以下「DP915635 トウモロコシ」という。）について、令和 3 年 11 月 1 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。

10

II 確認対象飼料の概要

飼料名：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
 （DP915635）

性 質：コウチュ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。

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

 DP915635 トウモロコシは、トウモロコシのデント種 PHR03 系統に、*ipd079Ea* 遺伝
 子 *pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子を導入し作成された。*ipd079Ea* 遺伝子により発現する
20 IPD079Ea 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。

20

III 審議内容

25 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.) Ittis)
 のデント種 PHR03 系統である。

30

 DP915635 トウモロコシには、コウチュウ目害虫への耐性を付与するため、
 Ophioglossum pendulum（コブラン）由来の *ipd079Ea* 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。

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。

 （3）飼料の構成成分等に関する事項

40

 DP915635 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 DP915635 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。

(1) ~ (4) より、DP915635 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。

50

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

DP915635 トウモロコシは、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)の非組換え品種 PHR03 のデント種である。

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

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

75 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*

*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。

85 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。

(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。

90

(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*) 及びトリプサクム属 (*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、トリプサク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は困難である。

95

100 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

 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。

105 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

 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

110

 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)。

115

(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 (*Z. mays* ssp. *mexicana*) 及びトリプサクム属 (*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。

120

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

125 DP915635 トウモロコシの作出に用いられた導入用プラスミド PHP83175 は、
アグロバクテリウム(*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*))由来
のプラスミド pSB1 を基に作製された。プラスミド pSB1 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 PHP83175 の塩基配列は 74,997bp である。

プラスミド PHP83175 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、既知の有害なタンパク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

PHP83175 の外側骨格領域には、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 (*spc*) 遺伝子及びテトラサイクリン
耐性遺伝子 (*tetA*) が含まれている。これらの遺伝子を含む外側骨格領域は
DP915635 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 PHP83175 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 PHP83175 の外側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 DP015635 トウモロコシ中には、これらの領域を含む外側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 PHP83175 は、アグロバクテリウム(*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*))由来のプラスミド pSB1 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 PHP83175 の宿主への導入は、バーティカルガン法及びアグ
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

160 (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 1 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 DP915635 に導入された各遺伝子発現カセットの構成要素の由来と機能

構成要素	由来	機能
<i>ipd079Ea</i> 遺伝子発現カセット		
<i>sb</i> -RCc3 エンハンサー	ソルガム (<i>S. bicolor</i>)	<i>sb</i> -RCc3 遺伝子のエンハンサー領域。
<i>sb</i> -RCc3 エンハンサー	ソルガム (<i>S. bicolor</i>)	<i>sb</i> -RCc3 遺伝子のエンハンサー領域。
<i>sb</i> -RCc3 エンハンサー	ソルガム (<i>S. bicolor</i>)	<i>sb</i> -RCc3 遺伝子のエンハンサー領域。
<i>zm</i> -PCOa プロモーター	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	mRNA 配列である PCO118362 上流のプロモーター領域。
<i>zm</i> -HPLV9 イントロン	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	<i>zm</i> -HPLV9 遺伝子オーソログのイントロン領域。
<i>ipd079Ea</i>	コブラン (<i>O. pendulum</i>)	殺虫たん白質 IPD079Ea をコードする遺伝子。
<i>sb</i> -SCI-1B ターミネーター	ソルガム (<i>S. bicolor</i>)	サブチリシン-キモトリプシンインヒビター 1B 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</i> -actin 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</i> -actin 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>ubi</i> ZM1 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>ubi</i> ZM1 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>ubi</i> ZM1 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
<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>pin</i> II 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>pin</i> II) のターミネーター領域

② 安全性に関する事項

ipd079Ea 遺伝子の供与体である *O. pendulum* の若葉は野菜として食用利用されており、ヒト及び家畜等への病原性は認められていない。また、IPD079Ea たん白

170 質のホモログたん白質は、主にヒカゲノカズラ目に分類される植物で同定されて
おり (WO Patent 2017023486)、その中でも *Huperzia phlegmaria* は食用とし
ての利用が報告されている (Yumkham *et al.*, 2017)。

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)。

175 *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

180 DP915635 トウモロコシは、PHP73878、PHP70605、PHP21139、PHP21875
の4つのプラスミド及び導入用プラスミド PHP83175 を用いて2段階で宿主へ目
的遺伝子を導入している。PHP73878 は、部位特異的組換えの挿入標的配列 (以
下、LP 配列という。) を含む DNA 配列を有する。PHP70605 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。
185 PHP21139 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。PHP83175 は挿入 DNA 領域、*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 PHP70605 を宿主へ導入した後、LP 配列
を有する PHP73878 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、植物体の再生率を向上させる遺
伝子を含むプラスミドが使用されたが、当該遺伝子は DP915635 トウモロコシの
ゲノムに導入されていないことが確認されている。得られた形質転換体のうち、
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。

195 2段階目でアグロバクテリウム法によりプラスミド PHP83175 を中間系統へ導入
し、部位特異的組換えを利用して先に導入しておいた LP 配列の一部とプラスミド
PHP83175 上の挿入 DNA 領域を置き換えた。

(3) 構造に関する事項

200 ① プロモーターに関する事項

ipd079Ea 遺伝子発現カセットにはトウモロコシ由来の *zm-PCOa* プロモーター、
pat 遺伝子発現カセットにはイネ由来の *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。

205 ② ターミネーターに関する事項

ipd079Ea 遺伝子発現カセットにはソルガム (*Sorghum bicolor*) 由来の *sb-SCI-1B*
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。

210

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 PHP83175 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。

215 (4) 性質に関する事項

以下に導入遺伝子の機能を示す。

• *ipd079Ea* 遺伝子

220 IPD079Ea たん白質を発現する。当該たん白質は、標的害虫である *Diabrotica virgifera virgifera* (ウエスタンコーンルートワーム) (以下、「WCR」という。) 等のコウチュウ目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。なお、当該たん白質が標的としないチョウ目昆虫である *Helicoverpa zea* (アメリカタバコガ)、*Spodoptera frugiperda* (ツマジロクサヨトウ) 及び *Ostrinia nubilalis* (ヨーロッパアワノメイガ) の受容体には結合しないことを確認した。

225

• *pat* 遺伝子

230 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)。

230

• *pmi* 遺伝子

235 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生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)。

235

(5) 純度に関する事項

240 導入用プラスミド PHP83175 の挿入 DNA 領域の塩基数は 18,190 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

245 (6) コピー数に関する事項

次世代シーケンサー及び Sanger 法による分析の結果、DP915635 トウモロコシのゲノム DNA 中には PHP83175 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。

245

250 また、他のプラスミドについても非意図的な配列が挿入されていないこと、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。

250

(7) 安定性に関する事項

255 DP915635 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。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

260 DP915635 トウモロコシにおける IPD079Ea 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、IPD079Ea たん白質が糊熟期の葉において定量下限値未満であったことを除き、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。

265 (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 PHP83175 の外側骨格領域には、抗生物質テトラサイクリン耐性マーカー遺伝子(*tetA*)及びスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子(*spc*)が組み込まれている。これらのマーカー遺伝子については、次世代シーケンス分析により、DP915635 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。

270

(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

275 DP915635 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、6 つの読み枠で ORF を検索した。その結果 378 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

280 DP915635 トウモロコシ中には、挿入された遺伝子により IPD079Ea たん白質、PAT たん白質及び PMI たん白質が産生される。

IPD079Ea 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。この働きによりコウチュウ目害虫に殺虫活性を示す。

285 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、DP915635 トウモロコシ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。

290 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、DP915635 はマンノースを炭素源とする選抜培地において生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

295 IPD079Ea 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 (IPD079Ea たん白質の相動性検索では version 2.9.0、PAT たん白質及び PMI たん白質の相同性検索では version 2.9.0+) 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。

300 なお IPD079Ea たん白質の標的害虫に対する毒性については、WCR に対して殺虫活性が認められた。その他の主なコウチュウ目昆虫 9 種及びチョウ目昆虫 4 種については、WCR 以外のコウチュウ目昆虫については 2 種で生存率への影響が認められたのに対し、チョウ目昆虫については試験に用いた本たん白質の最大濃度である 800 ppm においても生存率への影響は認められなかった。以上のことから、
305 本たん白質の殺虫活性は、標的昆虫である WCR 及びその近縁種に特異的である。

また、参考として提出されたほ乳類 (マウス) 及び鳥類 (コリンウズラ) に対する毒性試験のデータにおいて、IPD079Ea たん白質が毒性を示さなかったという結果を確認した。

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

IPD079Aa 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、分子量約 52 kDa のバンドは検出されなかったが、60 分後まで 10 kDa 以下の複数のバンドが認められた。そのため IPD079Ea たん白質を人工胃液
315 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。人工腸液 37℃の条件下では分子量約 52kDa の IPD079Ea たん白質は反応 60 分後でも検出されたものの、経時的に減少することが確認されている。また、50℃以上の加熱処理を加えた場合、致死率は IPD079Ea 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、
320 本試験には *E.coli* で生産した IPD079Ea たん白質を用いており、当該たん白質が DP915635 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。

PAT たん白質及び PMI たん白質については、既に安全性確認が終了した品目 (PAT たん白質: 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)、PMI たん白質: チョウ目害虫抵抗性トウモ
325 ロコシ (MIR162)) で産生されるものと同じのアミノ酸配列を有するたん白質が DP915635 トウモロコシにおいても産生される。したがって、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。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

330 IPD079Ea たん白質のアミノ酸配列について、酵素たん白質を含めた既知のたん白質との相同性は認められなかった。このことから、IPD079Ea たん白質が酵素活性を有する可能性は低く、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低い。

PAT たん白質は、グルホシネートの除草剤成分である L-グルホシネートに対し

335 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こと
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

345 DP915635 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っ
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。

(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ほ場試験において、DP915635 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 DP915635 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 DP915635 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

表2 諸外国における認可状況

申請国	目的	申請/承認年月			申請先
米国	食品・飼料としての利用	2023 年	7 月	確認 終了	米国食品医薬品庁 (FDA)
カナダ	環境安全性、飼料 としての利用	2022 年	4 月	承認	カナダ食品検査庁 (CFIA)
	食品としての利用	2022 年	4 月	承認	カナダ保健省 (HC)
韓国	飼料としての利用	2024 年	4 月	承認	韓国農村振興庁 (RDA)
台湾	食品としての利用	2022 年	11 月	承認	台湾食品薬物管理局 (TFDA)
	飼料としての利用	2023 年	12 月	承認	行政院農業委員会 (COA)

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	2020 年	12 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 DP915635 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
コウチュ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。

370 (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 PHR
03 系統の種子及び試験に使用した DP915635 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

380 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 (DP915635)
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

385 参考文献

【A】

Abbitt, S.E. and Shen, B. (2016). Maize and sorghum s-adenosyl-homocysteine hydrolase
promoters. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2016109157 A1.

390 Abbitt, S.E. (2017). SB-UBI terminator sequence for gene expression in plants. US Patent.
Patent No. US 9725731 B2.

Abbitt, S.E., Klein, K., Selinger, D. (2018). Transcriptional Terminators for Gene Expression
in Plants. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2018102131 A1.

395 AFSI. (2019). Agriculture and Food Systems Institute Crop Composition Database (Version
7.0).
(<https://www.cropcomposition.org/>).
Accessed on September 15th, 2020.

400

- Allen, S.M., Barry, J., Crane, V., English, J., Fengler, K., Schepers, E. and Udranszky, I. (2017). Plant Derived Insecticidal Proteins and Methods for Their Use. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2017023486 A1.
- 405 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.
- 410 Anderluh, G., Kisovec, M., Krasevec, N. and Gilbert, R. (2014). MACPF/CDC Proteins – Agents of Defense, Attack and Invasion. *Distribution of MACPF/CDC Proteins*, eds Anderluh G, Gilbert R (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp 7-30.
- [B]**
- 415 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.
- 420 Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B., Schaller, H. (1982). Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
- Brink, K., Anitha, S., Beatty, M., Anderson, J.A., Lyon, M., Weaver, J., and Dietrich, N. (2019). Comparison of Southern-by-Sequencing (SbS™) technology and Southern Blot Analysis for Molecular Characterization of Genetically Modified Crops. *Journal of Regulatory Science*. 7: 1-14.
- 425
- [C]**
- 430 Cajnko, M.M., Mikelj, M., Turk, T., Podobnik, M. and Anderluh, G. (2014). MACPF/CDC Proteins – Agents of Defense, Attack and Invasion. *Membrane Interactions and Cellular Effects of MACPF/CDC Proteins*, eds Anderluh G, Gilbert R (Springer, Dordrecht, The Netherlands), pp 119-144.
- 435 Callis, J., Carpenter, T., Sun, C-W. and Vierstra, R.D. (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia. *Genetics*. 139: 921-939.
- CERA. (2016). A Review of the Food and Feed Safety of the PAT Protein. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment.
- 440 CFIA. (1994). The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94->

- 445 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.
- 450 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.
- CODEX. (2019). Codex standard for named vegetable oils. Codex Alimentarius Commission.
455 CODEX-STAN 210-1999.
- 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*
460 *Agricultural and Food Chemistry* 63: 5321-5334.
- Crow, A., Diehn, S. and Sims, L. (2017). Plant regulatory elements and methods of use
thereof. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2017222821 A2.
- 465 **[D]**
- 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.
- Das, O.P., Ward, K., Ray, S. and Messing, J. (1991). Sequence variation between alleles reveals
470 two types of copy correction at the 27-kDa Zein locus of maize. *Genomics*. 11: 849-856.
- 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.
- 475 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.
- 480 de Winter, W.P. and Amoroso, V.B. (2003). Cryptogams: Ferns and Fern Allies. *Plant Resources*
of South-East Asia. 15:151-153.

485 Diehn, S. and Peterson-Burch, B. (2012). Root-Preferred Promoter and Methods of Use. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO 2012112411 A1.

Dymecki, S.M. (1996). A modular set of Flp, FRT and lacZ fusion vectors for manipulating genes by site-specific recombination. *Gene*. 171: 197-201.

490 **【E】**

Eckes, P., Rosahl, S., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Isolation and characterization of a light-inducible, organ-specific gene from potato and analysis of its expression after tagging and transfer into tobacco and potato shoots. *Molecular and General Genetics*. 205: 14-22.

495 **【F】**

Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985). Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*. 13: 7095-7106.

500 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-294.

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.

505

【G】

Gao, H., Bailin, L.I., Meeley, R.B., Perugini, L.D., Tabor, G.M. (2018). Generating Northern Leaf Blight Resistant Maize. World Intellectual Property Organization. Patent No. WO

510 2018071362 A1.

Guilley, H., Dudley, R.K., Jonard, G., Balázs, E. and Richards, K.E. (1982). Transcription of cauliflower mosaic virus DNA: Detection of promoter sequences, and characterization of transcripts. *Cell*. 30: 763-773.

515

【H】

Hartley, J.L., Temple, G.F. and Brasch, M.A. (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*. 10: 1788-1795.

520 Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R-J, 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.

525

Hershey, H.P. and Stoner, T.D. (1991). Isolation and characterization of cDNA clones for RNA species induced by substituted benzenesulfonamides in corn. *Plant Molecular Biology*. 17: 679-690.

530 **【K】**

Katzen, F. (2007). Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2: 571-589.

535

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.

Kew Science. (2020). *Ophioglossum pendulum* L. Plants of the World online. (<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:17167860-1>).

540

Accessed on June 23th, 2021.

菊池一徳. (1987). トウモロコシの生産と利用. 光琳. 東京

545

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: 165-174.

【L】

550

Liu, H., Shi, J., Sun, C., Gong, H., Fan, X., Qiu, F., Huang, X., Feng, Q., Zheng, X., Yuan, N., Li, C., Zhang, Z., Deng, Y., Wang, J., Pan, G., Han, B., Lai, J. and Wu, Y. (2016). Gene duplication confers enhanced expression of 27-kDa γ -zein for endosperm modification in quality protein maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 113: 4964-4969.

555

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, 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.

560

Lundry DR, Burns JA, Nemeth MA, Riordan SG (2013) Composition of Grain and Forage from Insect-Protected and Herbicide-Tolerant Corn, MON 89034 x TC1507 x MON 88017 x

565 DAS-59122-7 (SmartStax), Is Equivalent to That of Conventional Corn (*Zea mays* L.).
Journal of Agricultural and Food Chemistry 61: 1991-1998.

【M】

570 Mayer, K.F.X., Schoof, H., Haecker, A., Lenhard, M., Jürgens, G. and Laux, T. (1998). Role of
WUSCHEL in Regulating Stem Cell Fate in the Arabidopsis Shoot Meristem. Cell. 95:
805-815.

【N】

575 中村茂文. (2001). 生育のステージと生理, 生態 I 種子と発芽. 転作全書 第三巻 雑穀. 農山漁村文化
協会. 東京. pp. 41-43

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.

580 Noutoshi, Y., Kuromori, T., Wada, T., Hirayama, T., Kamiya, A., Imura, Y., Yasuda, M.,
Nakashita, H., Shirasu, K. and Shinozaki, K. (2006). Loss of *NECROTIC SPOTTED*
LESIONS1 associates with cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*.
Plant Molecular Biology. 62: 29-42.

【O】

585 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.
590 (<http://www.oecd.org/science/biosafety-biotrack/46815628.pdf>).
Accessed on June 23th, 2021.

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.
595 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.

600 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 23th, 2021.

605

OECD. (2012). Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, antinutrients, 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.

610

【P】

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.

615

【R】

Rosado, C.J., Stephanie, K., Bull, T.E., Kuiper, M.J., Law, R.H.P., Buckle, A.M., Voskoboinik, I., Bird, P.I., Trapani, J.A., Whisstock, J.C. and Dunstone, M.A. (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*. 10: 1765-1774.

620

【T】

Tomizawa, J.-I., Ohmori, H. and Bird, R.E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74: 1865-1869.

625

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.

【U】

USDA. (2020). Natural Resources Conservation Service.

630

(<https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=OPPE>).

Accessed on June 1st, 2021.

US EPA (1997) *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency,

635

(<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra004.pdf>).

Accessed on June 23th, 2021.

【W】

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.

640

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

645

【Y】

650 Yu, L., Liu, D., Chen, S., Dai, Y., Guo, W., Zhang, X., Wang, L., Ma, S., Xiao, M., Qi, H., Xiao, S. and Chen, Q. (2020). Evolution and Expression of the Membrane Attack Complex and Perforin Gene Family in the Poaceae. International Journal of Molecular Sciences. 21(16): 5736.

655 Yumkham, S. D., Chakpram, L., Salam, S., Bhattacharya, M. K., Singh, P. K. (2017). Edible ferns and fern-allies of North East India: a study on potential wild vegetables. Genetic Resources and Crop Evolution. 64: 467-477.

【Z】

660 財務省. (2021). 財務省貿易統計.
(<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>).
Accessed on June 23th, 2021.

665 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.

665 参考資料 (申請者提出 社外秘)

1 Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Maize Line Containing Event DP-915635-4_U.S. and Canada Test Sites (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2019-016_021).

670 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 PHP83175 (STUDY NUMBER: PHI-2019-247).

675 4 Description of Transformation Method and Familiarity of PAT and PMI Proteins for Maize Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-R066-Y20).

680 5 Summary - IPD079Ea Protien Mode of Action.

6 Summary - Transmission Electron Microscopy Study of IPD079Ea Pore-like Structures.

685 7 Southern-by-Sequencing Analysis of the T1 Generation of DP-915635-4 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2020-044).

- 8 Sequence Characterization of Insert and Flanking Genomic Regions of DP-915635-4 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2019-245).
- 690 9 Characterization of the Genomic Border Regions of Maize Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-2020-210_230).
- 10 Characterization of DP-915635-4 Maize for Insertion Stability in Five Generations using Southern Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2020-114).
- 695 11 Expressed Trait Protein Concentrations of a Maize Line Containing Event DP-915635 4_U.S. and Canada (REPORT NUMBER: PHI-2019-015_700).
- 700 12 Reading Frame Analysis at the Insertion Site of Maize Event DP-915635-4 (STUDY NUMBER: PHI-2020-214_221).
- 13 Comparison of the IPD079Ea Protein Sequence to the Protein Sequences in the Internal Toxin Database (STUDY NUMBER: PHI-2020-105_211).
- 705 14 Comparison of the PAT Protein Sequence to the Protein Sequences in the Internal Toxin Database (STUDY NUMBER: PHI-2020-103_211).
- 15 Comparison of the PMI Protein Sequence to the Protein Sequences in the Internal Toxin Database (STUDY NUMBER: PHI-2020-206_211).
- 710 16 Summary - LC50 and Spectrum Analysis.
- 17 IPD079Ea Protein - Acute Oral Toxicity Study in Mice (STUDY NUMBER: PHI-2019-224).
- 715 18 Recombinant IPD079Ea Protein - Northern Bobwhite (*Colinus virginianus*) Acute Oral Toxicity Limit Test (STUDY NUMBER: PHI-2019-225).
- 19 Characterization of IPD079Ea Protein Derived from DP-915635-4 Maize (STUDY NUMBER: PHI-2020-146).
- 720 20 Characterization of IPD079Ea Protein Derived from Microbial Expression System (STUDY NUMBER: PHI-2019-047).
- 725 21 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of IPD079Ea Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2020-165).

- 730 22 Characterization of IPD079Ea Following In Vitro Pepsin and Sequential
Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2020-
174).
- 23 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of IPD079Ea Using SDS-
PAGE and Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2020-175).
- 735 24 Determination of the Biological Activity of Heat-Treated IPD079Ea Protein
Incorporated in an Artificial Diet and Fed to *Diabrotica virgifera virgifera*
(STUDY NUMBER: PHI-2020-030).