

「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6275 系統」に係る安全性確認

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 6275 系統（以下「6275 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 : 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6275系統
性質 : 害虫抵抗性及び除草剤耐性
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社

6275 系統は、チョウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry1F たん白質を発現する遺伝子（改変 *cry1F* 遺伝子）及び除草剤グルホシネートを *N*-アセチルグルホシネートにアセチル化する PAT たん白質を発現する遺伝子（改変 *bar* 遺伝子）を導入したものであり、チョウ目害虫に抵抗性をもつ性質と除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

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、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) でデント種に属する。6275 系統に導入された改変 *cry1F* 遺伝子は *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* PS811 株に由来し、改変 *bar* 遺伝子は *Streptomyces hygroscopicus* に由来する。

(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

6275 系統の穀粒及び茎葉部の主要構成成分等（たん白質、脂質、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、灰分及び炭水化物）の分析値について、非組換えトウモロコシ等（参考文献 1～3）と比較したところ差異は認められなかった。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

6275 系統と既存のトウモロコシとの相違は、6275 系統が改変 Cry1F たん白質の発現によりチョウ目害虫に対して抵抗性を示す点と、PAT たん白質の発現により除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育できる点のみである。これらの点を除けば、6275 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相違はない。

以上（１）～（４）により、6275 系統の飼料としての安全性を評価するために、既存のトウモロコシを比較対象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

6275 系統は、改変 Cry1F たん白質の発現によりチョウ目害虫に対して抵抗性を示し、トウモロコシに被害を及ぼすヨーロッパアワノメイガ等のチョウ目害虫に対し効果的な防除を行うことが可能となる（参考文献 4）。また、PAT たん白質の発現により除草剤グルホシネートに対して耐性を示し、非選択性の本除草剤を使用することが可能となる。

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

宿主はイネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ(*Zea mays* L.)で、6275 系統の作出には Hi-II 系統が用いられた。

（２） 遺伝的先祖に関する事項

トウモロコシは、一般に、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、その植物学的起源は、育種過程でブタモロコシから派生したとする説が有力とされている（参考文献 5）。

（３） 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシが有害生理活性物質を生産することは知られていない（参考文献 6）。

（４） 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシの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

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知られていない。

（６） 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

トウモロコシは栽培作物であり、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。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される（参考文献 5）。トウモロコシの近縁種にはトリプサカム属及びブタモロコシがあるが、トウモロコシと自然交雑可能なのはブタモロコシのみである。なお、我が国においてブタモロコシの自生は知られていない。

（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。

飼料としての利用は、子実を配合飼料の原料として利用することが最も多く、その他にもサイレージ用として利用する場合、青刈りのまま利用する場合がある。また、ウェットミリング及びドライミリング、アルコール発酵の際の副産物も飼料として利用されている。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

上記(8)のとおり、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。

(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種において有害生理活性物質の産生は報告されていない。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

6275 系統の作出にはプラスミド・ベクターPHP12537 が用いられた。PHP12537 は *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 株由来のベクター-pSB1 を用いて作成された。

(2) 性質に関する事項

PHP12537 の塩基数は 49,698bp であり、制限酵素による切断地図は明らかになっている。また、PHP12537 に存在する全ての遺伝子の由来及び機能は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

PHP12537 には、テトラサイクリンに対する耐性を付与する *tet* 遺伝子及びスペクチノマイシンに対する耐性を付与する *spc* 遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子は T-DNA 領域外に存在しているため 6275 系統中に導入されておらず、また、このことはサザンプロット分析によって確認された。

(4) 伝達性に関する事項

PHP12537 は伝達を可能とする配列を含まない。

(5) 宿主依存性に関する事項

PHP12537 には、家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

PHP12537 は、挿入遺伝子である改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子とこれらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子が pBS1 に組み込まれ作成された。

(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

PHP12537 の T-DNA 領域がアグロバクテリウム法により宿主に導入された。

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 *cry1F* 遺伝子は、*B. t. var. aizawai* に由来する *cry1F* 遺伝子をもとに、トウモロコシでの発現を高めるためにコアトキシンをコードする部分を G (グアニン) 及び C (シトシン) 含量を高めた遺伝子である。なお、改変 *Cry1F* たん白質のアミノ酸配列において 604 番目のフェニルアラニンがロイシンに置換されている。

改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygrosopicus* に由来する *bar* 遺伝子をもとに、トウモロコシでの発現を高めるために開始コドンを変更した遺伝子である。なお、PAT たん白質のアミノ酸配列は変更されていない。

② 安全性に関する事項

B. t. var. aizawai は世界的に広く土壤中に存在するグラム陽性菌で、*B. t.* 菌が産生する δ -エンドトキシンの安全性については家畜等に対して毒性がないことが示されている (参考文献 7)。

S. hygrosopicus は土壤中に存在するグラム陽性菌であり、家畜等に対しての病原性は知られていない (参考文献 8)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

PHP12537 は、改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子並びにこれらの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子が DNA クローニング法で pSB1 に組み込まれ作成された。宿主への導入はアグロバクテリウム法により行われた。導入後は、カルベニシリン及び除草剤グルホシネート・アンモニウムを含む培地上で形質転換体が選抜された。

(3) 構造に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシ由来の UBI1ZM プロモーター (参考文献 9) で、改変 *bar* 遺伝子のプロモーターはカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S プロモーターである (参考文献 10)。なお、UBI1ZM プロモーターは、遺伝子挿入の際に欠失していることが確認された (5 (7) 参照)。

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子のターミネーターはジャガイモ由来のプロテアーゼインヒビター II 遺伝子 (PINII) のターミネーター配列である (参考文献 11)。

(4) 性質に関する事項

6275 系統に導入された改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 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。

(5) 純度に関する事項

挿入した遺伝子の塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット	
UBI1ZM	トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター (参考文献 9)。
改変 <i>cry1F</i>	<i>B.t. var. aizawai</i> 由来の <i>cry1F</i> 遺伝子。トウモロコシでの発現を最適化するように改変されている。
PIN II	ジャガイモ由来のプロテアーゼ II のターミネーター (参考文献 11)
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット	
CaMV35S ENH	カリフラワーモザイクウイルス 1841 株由来の 35S エンハンサー (参考文献 10)
CaMV35S PRO	カリフラワーモザイクウイルス 1841 株由来の 35S プロモーター (参考文献 10)。
ADH1	トウモロコシ由来のアルコール脱水素酵素イントロン 1。
改変 <i>bar</i>	<i>S. hygrosopicus</i> 由来のホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (参考文献 12)
PIN II	ジャガイモ由来のプロテアーゼ II のターミネーター (参考文献 11)

(6) 安定性に関する事項

6275 系統の後代世代での挿入遺伝子の安定性を確認するため、改変 *cry1F* プローブもしくは改変 *bar* プローブをハイブリダイズさせることによりサザンブロット分析を行ったところ (参考文献 13)、改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子が安定していることが確認された。

(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、PHP12537 の UBI1ZM プロモーターとイントロンの一部を除く改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセットが、トウモロコシゲノムに 1 コピー挿入されたことが確認された。

6275 系統に挿入された T-DNA 領域と PHP12537 の T-DNA 領域の塩基配列を比較した際に、挿入 T-DNA 領域の 3' 末端で 25bp が欠失したこと、また、5' 末端で 1,597bp が欠失し、PHP12537 の UBI1ZM プロモーターとイントロンの一部が欠失していることが確認された。3' 末端の 25bp の欠失については、T-DNA のゲノムへの挿入においてしばしば起こる現象として知られている (参考文献 14)。なお、5' 末端の 1,597bp の欠失にともない、UBI1ZM プロモーターが欠落しているが、T-DNA 領域 5' 末端の近傍配列解析によりオープンリーディングフレームが存在しないことが確認された (参考文献 15)。一方、トウモロコシのユビキチンイントロン中に存在し、プロモーター活性の可能性が示唆されている TATAA 配列 (参考文献 16) が、6275 系統に挿入された UBI1ZM イントロン中の 3' 末端側に存在していることから、UBI1ZM イントロン中の TATAA 配列がプロモーターとして働いた可能性が高いと考えられた。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

6275 系統における改変 *Cry1F* たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、その発現量の平均値は、穀粒 1.14ng/mg dwt ($n=30$)、葉 44.8ng/mg dwt ($n=18$)、根 5.99ng/mg dwt ($n=18$)、花粉 3.67ng/mg dwt ($n=30$) であった。また、PAT たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、その発現量の平均値は、穀粒 23ng/mg dwt ($n=30$)、葉

682ng/mg dwt ($n=18$)、根 223ng/mg dwt ($n=18$)、花粉 0.2ng/mg dwt ($n=30$) 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

PHP12537 の T-DNA 領域外には *tet* 遺伝子及び *spc* 遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子は 6275 系統には存在せず、このことはサザンブロット分析により確認された。

(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

遺伝子解析ソフト Vector NTI7.1 (InforMax 社) を用いた分析の結果から、6275 系統に挿入された T-DNA の 5'末端及び 3'末端に隣接する領域に新たなオープンリーディングフレームは存在しないことが確認された (参考文献 15)。

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

6275 系統は、改変 Cry 1F たん白質が発現することによりチョウ目害虫に対して抵抗性を示し、PAT たん白質が発現することにより除草剤グルホシネートに耐性を示す。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

改変 Cry1F たん白質と既知毒素との構造相同性を確認するため、GenBank CDS translations、PDB、SwissProt、PIR、PRF に登録されているたん白質毒素のアミノ酸配列を基にデータベースを構築し、BLASTP プログラムを用いて改変 Cry1F たん白質のアミノ酸配列と比較した。その結果、改変 Cry1F たん白質と既知毒素との間に構造相同性は認められなかった (参考文献 17)。

同様に、PAT たん白質と既知毒素との構造相同性を確認するため、GENEBANK DNA データベースに登録されているたん白質毒素との相同性がないことが確認されている。また、これまでに多くの PAT たん白質の安全性評価試験が行われており、植物中に産生される PAT たん白質について、飼料としての安全性上の懸念はないとされている (参考文献 8)。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

微生物 (*Pseudomonas fluorescens*) で発現させた改変 Cry1F たん白質 (参考文献 18) を人工胃液で処理し、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行ったところ (参考文献 19)、試験開始後 15 秒以内で検出限界 (6.6ng) 以下に消失することが確認された。

② 人工腸液に対する感受性

微生物 (*Pseudomonas fluorescens*) で発現させた改変 Cry1F たん白質を人工腸液で処理し、SDS-PAGE 分析を行ったところ、試験開始 120 分後でも消失しなかった。

③ 加熱処理に対する感受性

穀粒の加工処理段階で用いられる温度条件 (参考文献 5) を考慮して設定した 100°C、5 分間及び 15 分間の加熱条件により処理した 6275 系統中の改変 Cry1F たん白質について、SDS-PAGE 分析によりその分子量に変化のないことが確認された。また、100°C、15 分間の処理を行った場合、ELISA 法によりその免疫反応性が消失することが確認された (参考文献 20)。

なお、PAT たん白質については、これまで多くの安全性評価試験が行われており、人工胃液中で 15 秒以内に消化されること、ほ乳類の胃内環境を模した条件下では 1 分以内に活性を失うこと、加熱や酸性環境下で速やかに変性すること等の報告があることから（参考文献 8）、物理化学的処理に対する感受性試験は行われていない。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry1F たん白質は、他の *B.t.* の Cry1F たん白質と同様に酵素活性を待たないため、トウモロコシの代謝経路へ影響を及ぼすものではなく、また、PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有するため、トウモロコシの代謝経路へ影響を及ぼすものではないと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

6275 系統、対照の非組換えトウモロコシを用いて、穀粒中の主要構成成分（たん白質、脂質、灰分及び炭水化物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、粗繊維、ミネラル（リン、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、カリウム、ナトリウム、亜鉛）、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン類、フィチン酸、トリプシンインヒビター、イノシトール、ラフィノース、フルフラール、*p*-クマル酸、フェルラ酸の分析を行った。また、茎葉中の主要構成成分（たん白質、脂質、灰分及び炭水化物）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、粗繊維及びミネラル（カルシウム、リン）の分析を行った。

その結果、茎葉中の中性デタージェント繊維（NDF）において、6275 系統と非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められたが、その分析値は文献値の範囲内に収まっていた。なお、6275 系統及び非組換えトウモロコシのフルフラール分析値は定量限界（0.0001%）以下であり統計学的有意差の確認は行われていない。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国及びカナダで行われた 6275 系統のほ場試験において、その生存・増殖能力は非組換えトウモロコシ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

上記（6）のとおり、6275 系統の生存・増殖能力は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両者の間に変化はないと考えられた。

(8) 不活化法に関する事項

物理的防除（耕耘）や化学的防除（グルホシネート以外の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 6275 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）より、2004 年 6 月に飼料としての安全性が認可された。

カナダ食品検査庁（CFIA）より、2006 年 6 月に飼料としての安全性が認可された。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

6275 系統と既存のトウモロコシとの相違は、6275 系統がチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性の性質を有する点のみであり、栽培方法等は既存のトウモロコシと同様である。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

6275 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。組換え体の各世代の種子は、ダウ・アグロサイエンス社（米国）において保存されている。

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 6275 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. Watson, S.A. 1982. Corn : Amazing Maize. General Properties. pp.3-29. In CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, Vol. II : Part 1 Plant Products. I.A. Wolff(ed). CRC Press, Inc., Florida.
2. Watson, S.A. 1987. Structure and Composition. pp.53-82. In Corn : Chemistry and Technology, S.A. Watson and P.E. Ransted(eds). American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota.
3. ILSI(2006) <http://www.cropcomposition.org>
4. Babcock JM, Bing J (2003) 'Field efficacy of maize-optimized Cry1F (TC6275) for the control of Lepidoptera pests of corn.' (Dow AgroScience LLC, Midwest Research Center, Indiana) (社内資料)
5. トウモロコシ(2005)・戸澤英男著, (社)農山漁村文化協会
6. White P.J., Pollak L.M. (1995) Corn as a food source in the United State :Part II. Processes, Products, Composition, and Nutritive Values. Cereal Foods World 40, 756-762.
7. MacKenzie D, McLean M (2002) Who's afraid of GM feed? FEED MIX 10(3), 16-19.
8. OECD (1999) 'Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide.' (Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.)
9. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (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.
10. Pietrzak. M., Shillito RD, Hohn T, Potrykus I (1986) Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. Nucleic Acid Research 14, 5857-5868.
11. An G, Mitra A, Choi M, Costa M, An K, Thornburg TW, Ryan CA (1989) Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible protease inhibitor II gene. Plan Cell 1, 115-122.

12. Thompson CJ, Rao Movva N, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwerys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6, 2519-2523.
13. Locke ME, Tyree C (2003) 'Characterization of DNA Inserted into Transgenic Corn Event TC6275' (DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware) (社内資料)
14. Tinland B, Hohn B, Puchta H (1994) *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8000-8004.
15. Tagliani L, Song P, Sanders C, Locke M (2003) 'Insert and Border Sequence Characterization of B.t. Cry1F Maize Event TC6275' (DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware/Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana) (社内資料)
16. Salgueiro S, Pignocchi C, Parry M (2000) 'Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment' *Plant Molecular Biology* 42, 615-622.
17. Stelman SJ (2002) 'Comparison of the Amino Acid Sequence of the *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* Cry1F Insect Control Protein as Expressed in *Zea mays* Event1507 to Assess Homology to Known Protein Toxins' (Dow AgroSciences LLC, San Diego, CA) (社内資料)
18. Schafer BW, Schwedler DA, Ni W (2003) 'Characterization of Cry1F Protein Drived from *Pseudomonas fluorescens* and Transgenic Corn (TC6275) Grain' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana) (社内資料)
19. Schafer BW, Korjagin VA (2002) '*In Vitro* Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Truncated Cry1F Delta-endotoxin Derived from *Pseudomonas fluorescens*' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana) (社内資料)
20. Gao Y, Collins RA (2002) 'Gel Electrophoresis, Western Blot, and ELISA of Truncated Cry1F Delta-endotoxin Following Heat Treatment' (Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana) (社内資料)