

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
トウモロコシ MON95275 系統**

**令和 5 年 10 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
5	(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.....	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項.....	4
	(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
10	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.....	5
15	(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.....	5
	(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
20	(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
25	(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.....	7
30	5 挿入遺伝子に関する事項.....	7

	(1) 供与体に関する事項.....	7
	(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項.....	10
	(3) 構造に関する事項.....	10
	(4) 性質に関する事項.....	10
35	(5) 純度に関する事項.....	11
	(6) コピー数に関する事項.....	11
	(7) 安定性に関する事項.....	11
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	12
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	12
40	(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.....	12
	6 組換え体に関する事項.....	12
	(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.....	12
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	13
45	(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.....	13
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	13
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	14
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	14
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	14
50	(8) 不活化法に関する事項.....	14
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	14
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	15
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	15
55	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.....	15
	IV 審議結果.....	15
	V 参考文献及び参考資料.....	15

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統」
に係る安全性確認

I はじめに

60 コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統（以下「MON95275 系統」という。）について、令和 5 年 6 月 21 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。

65

II 確認対象飼料の概要

飼料名：コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統

性 質：コウチュウ目害虫への抵抗性を持つ。

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

70 開発者：バイエルグループ

MON95275 系統は、トウモロコシのデント種 LH244 系統に、*Brevibacillus laterosporus* 由来の *mpp75Aa1.1* 遺伝子、*Bacillus thuringiensis* 由来の *vpb4Da2* 遺伝子及びウエスタンコーンルーツワーム（以下「WCR」という。）由来の *DvSnf7* 遺伝子と一致するように設計された配列を導入し作成された。

75

MON95275 系統においては、*DvSnf7* 遺伝子の逆方向反復配列の転写産物から形成される dsRNA が、MON95275 系統を摂取したコウチュウ目害虫に取り込まれた後、RNAi（RNA 干渉）を誘導し、オートファジー経路に関与する *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで細胞の恒常性を妨げ、コウチュウ目害虫への抵抗性が付与されている。

80

また、MON95275 系統に導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子は、*Mpp75Aa1.1* たん白質及び *Vpb4Da2* たん白質を発現しており、コウチュウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

このことにより、トウモロコシ栽培における害虫防除を効果的に行うことを目的としている。

85

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

90 宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ(*Zea mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種 LH244 系統である。

MON95275 系統には、*Brevibacillus laterosporus* 由来の *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* 由来の *vpb4Da2* 遺伝子が導入され、いずれもコウチュウ目に属する特定の昆虫に対する殺虫活性を発揮する。また、MON95275 系統に導入された *DvSnf7* 遺伝子の部分配列を含む *DvSnf7.1* 抑制カセットの発現により産生される *DvSnf7* dsRNA も、コウチュウ目昆虫に対する殺虫活性を発揮する。

95

(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もつ。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON95275 系統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

MON95275 系統は、導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子により、コウチュウ目害虫に抵抗性を持つ。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) により、MON95275 系統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

MON95275 系統で発現する *Mpp75Aa1.1* たん白質、*Vpb4Da2* たん白質及び WCR の *DvSnf* 遺伝子と一致するように設計された逆方向反復配列から発現する二本鎖 RNA (*DvSnf7 dsRNA*) により、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。本系統は、コウチュウ目害虫による深刻な地域において効果的な害虫防除方法を農家に提供する目的として作出された。

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

宿主は、イネ科トウモロコシ属のトウモロコシ (*Z. mays* subsp. *mays* (L.) Iltis) のデント種の非組換え品種 LH244 系統である。

(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* subsp. *mexicana*) で、人為的選抜を経て栽培化されたといわれている (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

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、リンの吸収を阻害することが知られている (OECD, 2002)。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 (OECD, 2012)、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)。

140 (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

145 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、*Fusarium spp.*や、*Aspergillus flavus* 等により生産されるカビ毒の家畜への悪影響が知られているが、組換え体の作出には汚染された宿主を用いることはない。培養過程でも汚染防止策が確立されており、
150 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、雑草性はないと考えられる。なお、我が国においても自生するとの報告はない。

155

(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 (*Zea* 属) 及びトリプサカム (*Tripsacum* 属) があるが、テオシントはわが国において自生するとの報告はなく、またトリプサカムとトウモロコシ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、わが国においては、トウモロコシとの交雑はないと考えられる。
160

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

165 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、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

170 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

175 トウモロコシは成長点が地上に出た 5～7 葉期に 6～8 時間以上、0℃以下の外気にさらされると生存できない(OECD, 2003)。また、種子の休眠性は低い(CFIA, 1994)。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)。仮に、自生したとしても、鍬や感受性を示す除草剤による物理的又は化学的な方法により防除することができる(OECD, 2003)。

180

(1 1) 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 (*Zea* 属)及びトリプサカム(*Tripsacum* 属)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。

185

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON95275 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-ZMIR525664 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322などを基に作成された。

190

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の塩基数は 22,873 bp である。また、プラスミド PV-ZMIR525664 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。

195

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の外骨格領域にはスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子 (アミノグリコシド改変酵素 3''(9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードする)が含まれている。*aadA* 遺伝子は、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして用いられた。

200

なお、MON95275 系統のゲノム DNA 中に *aadA* 遺伝子を含む外骨格領域が挿入されていないことを次世代シーケンス解析により確認している。

205

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 には伝達を可能とする配列は含まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

210

導入用プラスミド PV-ZMIR525664 には、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori V* 及び *E. coli* に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* が組み込まれている。しかし、これらの領域により導入用プラスミド PV-ZMIR525664 が、植物や家畜等で複製されることはない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON95275 系統中には、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。

215

(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 PV-ZMIR525664 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322などを基に作成されており、*mpp75Aa1.1* 遺伝子発現カセット、*vpb4Da2* 遺伝子発現カセット及び *DvSnf7.1* 抑制カセットを含む T-DNA 領域を有する。

220

(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 PV-ZMIR525664 を用いて、アグロバクテリウム法により非組換えトウモロコシ品種 LH244 系統の未成熟胚に導入することにより作出された。

225

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及びその由来を示す。

230

表 1 MON95275 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来	機能
T-DNA 領域		
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
T- <i>E9</i>	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>)	リブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
<i>DvSnf7</i>	<i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	<i>Snf7</i> 遺伝子の部分配列 (Baum et al., 2007a; Baum et al., 2007b)。ESCRT-III 複合体の <i>Snf7</i> サブユニットの一部をコードする (Babst et al., 2002)。
I- <i>Hsp70</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	熱ショックたん白質 (HSP70) をコードする <i>hsp70</i> 遺伝子のイントロン及びその近傍領域に存在するエクソン配列 (Rochester et al., 1986) で、目的遺伝子の発現制御に関わる (Brown and Santino, 1997)。
P- <i>35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV)	35S プロモーター及びリーダー配列 (Odell et al., 1985)。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。
E- <i>pIIIG-Zm1</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	物理的インピーダンス誘導たん白質をコードする <i>pIIIG</i> 遺伝子のエンハンサー配列 (Huang et al., 1998)。植物細胞内での転写を高める。

構成要素	由来	機能
S- <i>Isr-1</i>	—	隣接する遺伝子が互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化するためのスペーサーとして設計された非コード配列 (Casini et al., 2014) (GenBank accession: MT611522)。
E- <i>DaMV-1</i>	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域	エンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)で、植物細胞内での転写を高める。
P- <i>RCc3-Td1</i>	ガマグラス (<i>Tripsacum dactyloides</i>)	<i>RCc3</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611509)。植物細胞内での転写を誘導する。
I- <i>14-3-3c-Si1</i>	アワ (<i>Setaria italica</i>)	<i>14-3-3c</i> 遺伝子のイントロン配列 (GenBank accession: MT611514) で、目的遺伝子の発現制御に関わる (Rose, 2008)。
CS- <i>mpp75Aa1.1</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Mpp75Aa1.1 たん白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Bowen et al., 2021)。
T- <i>HSP-Cl1</i>	ハトムギ (<i>Coix lacryma-jobi</i>)	熱ショックたん白質をコードする <i>Hsp</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611516)。転写の終結及び mRNA のポリアダデニル化を誘導する。
T- <i>SAM1-Si1</i>	アワ (<i>S. italica</i>)	S-アデノシルメチオニン合成酵素 1 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域の配列 (Hunt, 1994) (GenBank accession: MT611517)。転写の終結及び mRNA のポリアダデニル化を誘導する。
CS- <i>vpb4Da2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Vpb4Da2 たん白質をコードする配列で、コウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Yin et al., 2020)。
I- <i>Act-Si1</i>	アワ (<i>S. italica</i>)	アクチン遺伝子のイントロン配列 (Rose, 2008) (GenBank accession: MT611515)。目的遺伝子の発現制御に関わる。
P- <i>Ltp-Zm1</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>)	脂質輸送たん白質遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Hernandez-Garcia and Finer, 2014) (GenBank accession: MT611508)。植物細胞における転写を誘導する。
E- <i>DaMV-2</i>	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域	エンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)で、植物細胞内での転写を高める。

構成要素	由来	機能
P- <i>TubA</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター、5' 末端非翻訳リーダー及びイントロンの配列 (Jeon et al., 2000)。植物細胞における転写を誘導する。
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
CS- <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。形質転換の選抜マーカーとして使用されるが、育成過程で取り除かれる。
T- <i>TubA</i>	イネ (<i>O. sativa</i>)	α チューブリンをコードしている <i>OsTubA</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (Jeon et al., 2000)。転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
<i>loxP</i>	バクテリオファージ P1	<i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Cre リコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。

② 安全性に関する事項

235

mpp75Aa1.1 遺伝子の供与体である *Brevibacillus laterosporus* はグラム陽性の内生孢子形成細菌であり、ヒトや他の脊椎動物に対する病原性は知られていない。また、土壌等の広範囲の環境から単離されるほか、チーズや豆類、蜂蜜、ヒト用のプロバイオティクス食品など多くの食品でも検出され、家禽用の飼料添加物にも含まれている。ニュージーランドの環境保護庁 (NZ EPA) には、園芸植物用及び農作物用の農薬として登録されている。これらのことから、*Brevibacillus laterosporus* は広範囲の安全な摂取経験が存在するといえる。

240

vpb4Da2 遺伝子の供与体である *Bacillus thuringiensis* は、土壌中に遍在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等への病原性は報告されていない。

DvSnf7.1 抑制カセットに存在する *DvSnf7* 遺伝子の部分配列は WCR (*D. virgifera virgifera*) の *DvSnf7* 遺伝子と一致するように設計された配列である。

245 WCR は北米を原産とするコウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫であり、ヒトや家畜等に対して直接的な健康被害などの影響を及ぼしたとの報告はない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

250 宿主への導入は、アグロバクテリウム法により行った。宿主であるトウモロコシ品種 LH244 系統の未成熟胚を、導入用プラスミド PV-ZMIR525664 を含む *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) と共存培養することにより、グリホサート存在下で形質転換を行った。

255 その後、選抜マーカーカセットを含む形質転換個体を選抜し、Cre リコンビナーゼ発現カセットをもつ組換えトウモロコシ系統 (LH244Cre 系統) と交配させて Cre/lox 法により選抜マーカーカセットをもたない個体を作成し、さらにその後代で Cre リコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜した。

(3) 構造に関する事項

260 ① プロモーターに関する事項

mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセットはガマガラス (*Tripsacum dactyloides*) 由来の *RCc3-Td1* プロモーターが、*vpd4Da2* 遺伝子発現カセットはトウモロコシ (*Z. mays*) 由来の *Ltp-Zm1* プロモーターが、*DvSnf7.1* 抑制カセットは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーターが使用されている。

265

② ターミネーターに関する事項

mpp75Aa1.1 遺伝子発現カセットはハトムギ (*Coix lacryma-jobi*) 由来の *HSP-Cl1* ターミネーターが、*vpd4Da2* 遺伝子発現カセットはアワ (*S. italica*) 由来の *SAM1-Si1* ターミネーターが、*DvSnf7.1* 抑制カセットはエンドウ (*Pisum sativum*) 由来の *E9* ターミネーターが使用されている。

270

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 PV-ZMIR525664 の塩基配列、由来及び機能は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

275

(4) 性質に関する事項

 以下に各遺伝子の機能を示す。

mpp75Aa1.1 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子

280 *mpp75Aa1.1* 遺伝子は、Mpp75Aa1.1 たん白質を発現し、旧命名法では Cry たん白質グループに属していたが、新命名法では Mpp クラスに属する。
 vpb4Da2 遺伝子は、Vpb4Da2 たん白質を発現し、旧命名法では Vip グループに分類されていたが、新命名法では Vpb クラスに分類された。

285 感受性昆虫の体内に取り込まれた当該たん白質は、どちらも昆虫消化管の生理条件下で消化管のたん白質分解酵素により部分的に分解され、殺虫活性をもつたん白質分解酵素耐性のコアたん白質へ変換される。コアたん白質は、昆虫

の消化管の細胞膜で特異的受容体へ結合し、小孔を形成することで細胞溶解を引き起こし、その結果として消化管組織に損傷を与え殺虫活性を示す(Bravo et al., 2013; Deist et al., 2014)。これまで Cry や Vip たん白質を発現する遺伝子組換えの作物の摂取が、哺乳類や鳥類、両生類、爬虫類に対して悪影響を及ぼしたことはない。(Schnepf et al., 1998; OECD, 2007)。

Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質と既知の毒性たん白質との相同性の有無を調査するため、TOX_2021 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行ったところ、Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質と既知の毒性たん白質との相同性は確認されなかった。

DvSnf7.1 抑制カセット

WCR がもつ *Snf7* 遺伝子と一致するように設計された逆方向反復配列が存在し、その転写産物では DvSnf7 dsRNA が形成される。この DvSnf7 dsRNA は MON95275 系統を摂食した WCR の中腸において RNAi を誘導し、オートファジー経路に関与する *DvSnf7* 遺伝子の発現を抑制することで細胞の恒常性を妨げ、殺虫活性を示す。

また、*in vitro* で合成した DvSnf7 dsRNA を混餌投与した生物検定において、コウチュウ目の昆虫種の中でも WCR が属するハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫のみに活性を発揮することが確認されている。

(5) 純度に関する事項

塩基配列解析により、T-DNA 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している。

(6) コピー数に関する事項

MON95275 系統に導入された遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、並びに導入遺伝子及びその近傍配列を確認するために、次世代シーケンス解析及び導入遺伝子領域の PCR 並びに塩基配列解析を行った。次世代シーケンス解析の結果、導入遺伝子は核ゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されていること、及び導入用プラスミド PV-ZMOO513642 に由来する非意図的な配列及び Cre リコンビナーゼ発現カセットを持つ組換えトウモロコシ系統 (LH244Cre 系統) 中の導入用プラスミド PV-ZMOO513642 が存在しないことが確認された。また導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析により、導入用プラスミド PV-ZMIR525664 の T-DNA 領域の塩基配列と同一であること、及び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が確認された。

(7) 安定性に関する事項

MON95275 系統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 世代の穀粒から抽出したゲノム DNA を用いて次世代シーケンス解析を行った。

その結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 箇所検出され、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。

330 複数世代にわたる Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vbp4Da2 たん白質の発現の安定性を確認するため、5 世代及び対照の非組換えトウモロコシから採取した穀粒について、ウエスタンブロット分析を行った。その結果、それぞれのたん白質が、非組換えトウモロコシでは発現していないが、MON95379 系統 5 世代では発現していることが確認された。

335 また、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物である完全長の RNA 及び siRNA の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代及び対照の非組換えトウモロコシから採取した葉について、ノーザンブロット分析を行った。その結果、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) が安定して後代で発現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

340 MON95275 系統における Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質の発現量を ELISA 法により測定し、また *DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物 (RNA) の発現量を QuantiGene アッセイにより分析した。その結果、Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質は、葉、根、地上部及び穀粒で発現しており、特に葉において最も高い発現量が確認された。一方、*DvSnf7.1* 抑制カセットの転写産物
345 (RNA) はすべての組織サンプル (葉、根、地上部、穀粒、花粉) から検出され、特に葉において最も高い発現量が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

350 導入用プラスミド PV-ZMIR525664 には、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして、外骨格領域にスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子 (アミノグリコシド改変酵素 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (AAD) をコードする) が存在している。

355 なお、MON95275 系統中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、次世代シーケンシング解析により確認されている。

(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

360 MON95275 系統に挿入された DNA 配列及びその境界領域で、6 つの読み枠において ORF を検索した。その結果、10 個の ORF が検出されたが、これらの 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

365 MON95275 系統に導入された *mpp75Aa1.1* 遺伝子及び *vpb4Da2* 遺伝子はそれぞれ Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質を発現することにより、チョウ目害虫抵抗性を付与する。また、*DvSnf7.1* 抑制カセットの導入もチョウ目

害虫抵抗性を付与する。この点を除けば、MON95275 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

MON95275 系統の Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質と、既知の毒性たん白質との相同性を確認するため、TOX_2021 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより期待値が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行った。その結果、Mpp75Aa1.1 たん白質が Q02307 の配列と相同性を示し、Vpb4Da2 たん白質が P13423 の配列と相同性を示したが、Q02307 や P13423 の毒性発現に重要な受容体結合ドメインにおいて、Mpp75Aa1.1 たん白質や Vpb4Da2 たん白質との相同性は低いことから、TOX_2021 を用いた相同性検索の結果は導入遺伝子の毒性を示すものではないと考えられる。

MON95275 系統に導入された *DvSnf7.1* 抑制カセットにより産生される *DvSnf7* dsRNA については、遺伝子組換え飼料等として安全性が確認された MON87411 系統において発現する *DvSnf7* dsRNA の塩基配列と同じ配列をもち、その完全長の転写産物はリーダー配列の一部を除いて同じ配列である。*DvSnf7* dsRNA に含まれないリーダー配列は転写産物の機能に影響するものではないことから、MON87411 系統の *DvSnf7* dsRNA の安全性評価が、MON95275 系統の *DvSnf7* dsRNA に対して適用できる。

(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

発現するたん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、人工胃液（ペプシン（pH1.2））処理、人工腸液（パンクレアチン（pH7.5））処理及び加熱処理を行った。

MON95275 系統での Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質は少量であるため、試験に供試する十分量を精製できないことから、*B. thuringiensis* で発現させた Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質を試験に供試した。その結果、人工胃液（ペプシン）処理では、0.5 分以内に検出限界以下まで消化され、人工腸液（パンクレアチン）処理では、Mpp75Aa1.1 たん白質は 15 分以内に、Vpb4Da2 たん白質は 5 分以内に検出限界以下まで消化された。

また、加熱処理では、Mpp75Aa1.1 は 75℃、15 分以上で、Vpb4Da2 たん白質は 55℃、15 分以上で感受性を示すことが確認された。なお、*B. thuringiensis* で発現させた Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質は、MON95275 系統中で発現する Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質と同等であることを確認済みである。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

Mpp75Aa1.1 たん白質及び Vpb4Da2 たん白質が、何らかの酵素活性をもつという報告はない。したがって、MON95275 系統がこれらのたん白質の発現により、新しい代謝経路及び代謝産物を作ることは考えにくい。

410

415

また、*DvSnf7.1* 抑制カセットの発現により産生される *DvSnf7* dsRNA については、コウチュウ目ハムシ科ヒゲナガハムシ亜科に属する昆虫種間において高度に保存されている遺伝子配列であること、トウモロコシ中の転写産物の配列と *DvSnf7* 遺伝子の部分配列との間に 21 塩基長の一致が存在しないことが確認されていること、また dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されることから、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

420

MON953275 系統及び対照の非組換えトウモロコシの穀粒及び地上部について、粗たん白質及びアミノ酸、粗脂肪及び脂肪酸、炭水化物及び繊維質、灰分及び無機質、ビタミン、抗栄養素、二次代謝産物の分析を行ったところ、穀粒の栄養素の項目には統計学的有意差が認められたものがあったが、**MON95275** 系統の平均値はいずれも **ILSI** データベースのデント種の範囲内に収まっており、これまで安全に摂取されている従来トウモロコシの変動の範囲内であった。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。

425

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに実施したほ場試験において、**MON95275** 系統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

430

MON95275 系統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

435

MON95275 系統も従来のトウモロコシと同様に、物理的防除（耕耘）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	飼料	食品	環境
米国	FDA 申請中 (2021 年 11 月)	FDA 申請中 (2021 年 11 月)	USDA 申請中 (2021 年 12 月)
欧州	EFSA 申請中 (2022 年 4 月)	EFSA 申請中 (2022 年 4 月)	EFSA 申請中 (2022 年 4 月)
オーストラリア・ニュージーランド	—	FSANZ 申請中 (2022 年 9 月)	—
カナダ	CFIA 申請中	HC 申請中	CFIA 申請中

	(2023 年 1 月)	(2023 年 1 月)	(2023 年 1 月)
--	--------------	--------------	--------------

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
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。

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

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 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、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

- Adang, M.J., N. Crickmore and J.L. Jurat-Fuentes. 2014. Diversity of *Bacillus thuringiensis* crystal toxins and mechanism of action. *Advances in Insect Physiology* 47: 39-87.
- Alves, G.G., R.A.M. de Ávila, C.D. Chávez-Olórtegui and F.C.F. Lobato. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: The third most potent bacterial toxin known. *Anaerobe* 30: 102-107.
- Babst, M., D.J. Katzmann, E.J. Estepa-Sabal, T. Meerloo and S.D. Emr. 2002. ESCRT-III: An endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell* 3: 271-282.
- Bachman, P.M., R. Bolognesi, W.J. Moar, G.M. Mueller, M.S. Paradise, P. Ramaseshadri, J. Tan, J.P. Uffman, J. Warren, B.E. Wiggins and S.L. Levine. 2013. Characterization of the spectrum of insecticidal activity of a double-stranded RNA with targeted activity against Western Corn Rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *Transgenic Research* 22: 1207-1222.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-

enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

7 Baum, J.A., T. Bogaert, W. Clinton, G.R. Heck, P. Feldmann, O. Ilagan, S. Johnson, G. Plaetinck, T. Munyikwa, M. Pleau, T. Vaughn and J. Roberts. 2007a. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25: 1322-1326.

8 Baum, J.A., C.A. Cajacob, P. Feldmann, G.R. Heck, I. Nooren, G. Plaetinck, W. Maddelein and T.T. Vaughn. 2007b. Methods for genetic control of insect infestations in plants and compositions thereof. Patent US 2007/0124836 A1, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

9 Bolognesi, R., P. Ramaseshadri, J. Anderson, P. Bachman, W. Clinton, R. Flannagan, O. Ilagan, C. Lawrence, S. Levine, W. Moar, G. Mueller, J.G. Tan, J. Uffman, E. Wiggins, G. Heck and G. Segers. 2012. Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte). *PLoS ONE* 7: e47534.

10 Bowen, D., Y. Yin, S. Flasinski, C. Chay, G. Bean, J. Milligan, W. Moar, A. Pan, B. Werner, K. Buckman, A. Howe, T. Ciche, K. Turner, M. Pleau, J. Zhang, J.-L. Kouadio, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts. 2021. Cry75Aa (Mpp75Aa) insecticidal proteins for controlling the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte (Coleoptera: Chrysomelidae), isolated from the insect-pathogenic bacterium *Brevibacillus laterosporus*. *Applied and Environmental Microbiology* 87: e02507-02520.

11 BPPRC. 2022. Bacterial Pesticidal Proteins. Bacterial Pesticidal Protein Resource Center. <https://camtech-bpp.ifas.ufl.edu> [Accessed July 12, 2022].

12 Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodríguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. *Microbial Biotechnology* 6: 17-26.

13 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

14 Campbell, J.D., K.H. Clement, S.S. Wasserman, S. Donegan, L. Chrisley and K.L. Kotloff. 2007. Safety, Reactogenicity and Immunogenicity of a Recombinant Protective Antigen Anthrax Vaccine Given to Healthy Adults. 205.

15 Casini, A., G. Christodoulou, P.S. Freemont, G.S. Baldwin, T. Ellis and J.T. MacDonald. 2014. R2oDNA designer: Computational design of biologically neutral synthetic DNA sequences. *ACS Synthetic Biology* 3: 525-528.

- 520 16 CFIA. 1994. The biology of *Zea mays* (L.) (Maize). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario.
- 17 Chakroun, M., N. Banyuls, Y. Bel, B. Escriche and J. Ferré. 2016. Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria. Microbiology and Molecular
- 525 Biology Reviews 80: 329-350.
- 18 Ciosi, M., N.J. Miller, S. Toepfer and T. Guillemaud. 2011. Stratified dispersal and increasing genetic variation during the invasion of Central Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. Evolutionary Applications 4: 54-70.
- 530 19 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. The EMBO Journal 3: 1671-1679.
- 535 20 Crickmore, N., C. Berry, S. Panneerselvam, R. Mishra, T.R. Connor and B.C. Bonning. 2021. A structure-based nomenclature for *Bacillus thuringiensis* and other bacteria-derived pesticidal proteins. Journal of Invertebrate Pathology 186: 107438.
- 540 21 Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813.
- 22 Dal Peraro, M. and F.G. van der Goot. 2016. Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. Nature Reviews Microbiology 14: 77-92.
- 545 23 de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends in Genetics 17: 193-199.
- 24 Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. Toxins (Basel) 6: 3005-3027.
- 550 25 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.
- 555 26 Fader, C.M. and M.I. Colombo. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: Two closely related partners. Cell Death and Differentiation 16: 70-78.
- 27 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids
- 560

Research 13: 7095-7106.

- 565 28 Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annual Review of Entomology 37: 615-636.
- 29 Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. Nature Biotechnology 20: 575-580.
- 570 30 Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. Plant Science 217-218: 109-119.
- 31 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell 7: 907-919.
- 575 32 Hinnebusch, A.G. 2011. Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. Microbiology and Molecular Biology Reviews 75: 434-467
- 33 Hong, H.A., L.H. Duc and S.M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews 29: 813-835.
- 580 34 Huang, Y.-F., W.R. Jordan, R.A. Wing and P.W. Morgan. 1998. Gene expression induced by physical impedance in maize roots. Plant Molecular Biology 37: 921-930.
- 35 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 45: 47-60.
- 585 36 ILSI. 2019. Crop composition database, version 7. International life sciences institute. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed January 25, 2019].
- 590 37 Ivie, S.E. and M.S. McClain. 2012. Identification of amino acids important for binding of *Clostridium perfringens* epsilon toxin to host cells and to HAVCR1. Biochemistry 51: 7588-7595.
- 595 38 Jeon, J.-S., S. Lee, K.-H. Jung, S.-H. Jun, C. Kim and G. An. 2000. Tissue-preferential expression of a rice α -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. Plant Physiology 123: 1005-1014.
- 600 39 Kim, D.-W., H. Sung, D. Shin, H. Shen, J. Ahn, S.-K. Lee and S. Lee. 2011. Differential physiological roles of ESCRT complexes in *Caenorhabditis elegans*. Molecules and Cells 31: 585-592.

- 40 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- 605
- 41 Kouadio, J.-L., S. Duff, M. Aikins, M. Zheng, T. Rydel, D. Chen, E. Bretsnyder, C. Xia, J. Zhang, J. Milligan, A. Evdokimov, J. Nageotte, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021a. Structural and functional characterization of Mpp75Aa1.1, a putative beta-pore forming protein from *Brevibacillus laterosporus* active against the western corn rootworm. *PLoS ONE* 16: e0258052.
- 610
- 43 Kouadio, J.-L., M. Zheng, M. Aikins, J. Zhang, D. Chen, D. Duda, S. Duff, J. Milligan, C. Taylor, P. Mamanella, R. Timothy, C. Kessenich, T. Panosian, Y. Yin, W. Moar, K. Giddings, Y. Park, A. Jerga and J. Haas. 2021b. Structural and functional insights into the first *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein of the Vpb4 fold, active against western corn rootworm. *PLoS ONE*. Manuscript.
- 615
- 44 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- 620
- 45 Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
- 625
- 46 Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. *Russian Journal of Genetics* 43: 1413-1414.
- 630
- 47 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.
- 635
- 48 Laubach, C.A. 1916. Studies on aerobic spore-bearing non-pathogenic bacteria. Part II: Spore-bearing bacteria in dust 1916. *Journal of Bacteriology*: 493-533.
- 640
- 49 Moar, W.J., A.J. Evans, C.R. Kessenich, J.A. Baum, D.J. Bowen, T.C. Edrington, J.A. Haas, J.-L.K. Kouadio, J.K. Roberts, A. Silvanovich, Y. Yin, B.E. Weiner, K.C. Glenn and M.L. Odegaard. 2017. The sequence, structural, and functional diversity within a protein family and implications for specificity and safety: The case for ETX_MTX2 insecticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology* 142: 50-59.
- 50 Nivetha, L. and H. Jayachandran. 2017. Isolation and identification of *Brevibacillus*

lactosporum from soil and evaluation of their antibiotic properties. International Journal of Advanced Research in Biological Sciences 4: 93-98.

645

51 NZ-EPA. 2022a. Decision on APP204039. NZ_EPA. https://epa.govt.nz/assets/FileAPI/hsno-ar/APP204039/APP204039_Final_Decision.pdf [Accessed July 12th, 2022].

52 NZ-EPA. 2022b. Approval of APP204039. Environmental Protection Authority, New Zealand.

650

53 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.

54 OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of
655 maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2002)25. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 6. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

55 OECD. 2003. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize).
660 ENV/JM/MONO(2003)11. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 27. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

56 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing
Bacillus thuringiensis-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on
665 Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

57 OECD. 2012. Revised consensus document on compositional considerations for new
varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, anti-nutrients,
670 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.

58 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore
and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a
675 Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

59 Panda, A.K., S.S. Bisht, S. DeMondal, N. Senthil Kumar, G. Gurusubramanian and A.K.
680 Panigrahi. 2014. *Brevibacillus* as a biological tool: A short review. Antonie van Leeuwenhoek 105: 623-639.

60 Peck, J.W., E.T. Bowden and P.D. Burbelo. 2004. Structure and function of human Vps20

and Snf7 proteins. Biochemical Journal 377: 693-700.

685

61 Rochester, D.E., J.A. Winer and D.M. Shah. 1986. The structure and expression of maize genes encoding the major heat shock protein, hsp70. EMBO Journal 5: 451-458.

690

62 Román Blanco, C., J.J. Sanz Gómez, T.M. López Díaz, A. Otero and M.L. García López. 1999. Numbers and species of *Bacillus* during the manufacture and ripening of Castellano cheese. Milchwissenschaft 54: 385-388.

695

63 Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. Current Topics in Microbiology and Immunology 326: 277-290.

64 Ruiu, L. 2013. *Brevibacillus laterosporus*, a pathogen of invertebrates and a broad-spectrum antimicrobial species. Insects 4: 476-492.

700

65 Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. Molecular and General Genetics 234: 49-59.

66 Salomon, S. and H. Puchta. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. The EMBO Journal 17: 6086-6095.

705

67 Sarkar, P.K., B. Hasenack and M.J.R. Noun. 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). International Journal of Food Microbiology 77: 175-186.

710

68 Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.

715

69 Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki and K. Komagata. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 46: 939-946.

720

70 Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Molecular and General Genetics 181: 8-12.

71 Stiles, B.G., G. Barth, H. Barth and M.R. Popoff. 2013. *Clostridium perfringens* epsilon toxin: A malevolent molecule for animals and man? Toxins 5: 2138-2160.

72 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322.

- 725 Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor,
New York.
- 73 Teis, D., S. Saksena and S.D. Emr. 2008. Ordered assembly of the ESCRT-III complex on
endosomes is required to sequester cargo during MVB formation. *Developmental Cell* 15: 578-
730 589.
- 74 Uniprot. 2022. Uniprot_P13423· PAG_BACAN.
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P13423/entry> [Accessed July 12, 2022].
- 735 75 Vaccari, T., T.E. Rusten, L. Menut, I.P. Nezis, A. Brech, H. Stenmark and D. Bilder. 2009.
Comparative analysis of ESCRT-I, ESCRT-II and ESCRT-III function in *Drosophila* by
efficient isolation of ESCRT mutants. *Journal of Cell Science* 122: 2413-2423.
- 76 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of
740 *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate
Pathology* 111: 1-12.
- 77 van Frankenhuyzen, K. 2009. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins.
Journal of Invertebrate Pathology 101: 1-16.
- 745 78 Wesche, J., J.L. Elliott, P.O. Falnes, S. Olsnes and R.J. Collier. 1998. Characterization of
membrane translocation by anthrax protective antigen. *Biochemistry* 37: 15737-15746.
- 79 Winter, V. and M.-T. Hauser. 2006. Exploring the ESCRTing machinery in eukaryotes.
750 *TRENDS in Plant Science* 11: 115-123.
- 80 Xing, A., B.P. Moon, K.M. Mills, S.C. Falco and Z. Li. 2010. Revealing frequent alternative
polyadenylation and widespread low-level transcription read-through of novel plant
transcription terminators. *Plant Biotechnology Journal* 8: 772-782.
- 755 81 Xu, C., B.-C. Wang, Z. Yu and M. Sun. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis*
Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins* 6: 2732-2770.
- 82 Yin, Y., S. Flasiński, W. Moar, D. Bowen, C. Chay, J. Milligan, J.-L. Kouadio, A. Pan, B.
760 Werner, K. Buckman, J. Zhang, G. Mueller, C. Preftakes, B.E. Hibbard, P. Price and J. Roberts.
2020. A new *Bacillus thuringiensis* protein for Western corn rootworm control. *PLoS ONE* 15:
e0242791.
- 83 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by
765 *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and*

Applied Genetics 1: 361-370.

- 84 Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A.
770 Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-sequencing: A robust
screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant
Genome 8: 1-15.
- 85 Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson.
2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants.
775 Theoretical and Applied Genetics 107: 1157-1168.
- 86 財務省 2022 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed July 17, 2022]
- 780 87 食品安全委員会 2016 遺伝子組換え食品等評価書 チョウ目害虫抵抗性ダイズ
MON87751 系統 評価結果通知日 2016年8月30日
<http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20160419015&fileId=201>
- 88 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 農山漁村
785 文化協会 東京
- 89 農林水産省 2022 遺伝子組換え生物等の第一種使用規程の承認申請に係る審査報
告書、コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95275 系統 農林水産省 消費・安
全 局 農 産 安 全 管 理 課 [https://public-comment.e-](https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000231907)
790 [gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000231907](https://public-comment.e-gov.go.jp/servlet/PcmFileDownload?seqNo=0000231907)

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 Sequence of Genetic Elements in PV-ZMIR525664 (社外秘)
- 2 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Mpp75Aa1.1 Against a
795 Range of Invertebrate Taxa (TRR0000993) (社外秘)
- 3 Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Vpb4Da2 Against a
Range of Invertebrate Taxa (TRR0000994) (社外秘)
- 4 Amended From TRR0000931: Updated Bioinformatics Evaluation of Mpp75Aa1.1 and
Vpb4Da2 in MON 95275 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases
800 (TRR0001416) (社外秘)
- 5 Amended from TRR0001330: Molecular Characterization of Insect Protected Maize MON
95275 (REG-2019-0551) (社外秘)

- 6 プラスミド PV-ZMOO513642 の構成要素 (社外秘)
- 7 Amended From TRR0000934: Updated Bioinformatics Evaluation of the MON 95275
805 Insertion Site Utilizing the ZMA_2021 Database (TRR0001436) (社外秘)
- 8 Demonstration of the Presence of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Proteins in Maize Grain
Samples Across Multiple Generations of MON 95275 (TRR0000780) (社外秘)
- 9 Amended from TRR0001019: Demonstration of the Presence or Absence of DvSnf7.1
Transcripts in Maize Leaf Tissues Across Multiple Generations of MON 95275
810 (TRR0001433) (社外秘)
- 10 Amended from TRR0000902: Northern Blot Analysis of DvSnf7.1 RNA Expression in
MON 95275 (TRR0001020) (社外秘)
- 11 Amended from TRR0000719: Characterization of DvSnf7.1 Read-through Transcripts in
Maize MON 95275 (TRR0001021) (社外秘)
- 815 12 Assessment of Mpp75Aa1.1 and Vpb4Da2 Protein Levels in Maize Leaf, Root, Forage,
Grain, and Pollen Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Field Sites of
United States Field Trials During 2019 (TRR0000722) (社外秘)
- 13 Assessment of DvSnf7.1 RNA Levels in OSL1, OSR1, Forage, Grain, and Pollen Maize
Tissues Collected from MON 95275 Produced in Five Sites in the United States Field
820 Trials during 2019 (TRR0000653) (社外秘)
- 14 Amended From TRR0000932: Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-
Junction Peptides in MON 95275 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021
Databases (TRR0001434) (社外秘)
- 1 Amended From TRR0000933: Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in
825 MON 95275 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001435)
(社外秘)
- 2 Amended Report for TRR0001114: Characterization of the Mpp75Aa1.1 Protein Purified
from the Maize Grain of MON 95275 and Comparison of the Physicochemical and
Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced
830 Mpp75Aa1.1 Proteins (TRR0001571) (社外秘)
- 3 Amended Report for TRR0001113: Characterization of the Vpb4Da2 Protein Purified
from the Maize Grain of MON 95275 and Comparison of the Physicochemical and
Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced
Vpb4Da2 Proteins (TRR0001572) (社外秘)
- 835 4 Amended Report for TRR0000731: Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia*
coli-produced Mpp75Aa1.1 Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0000731) (社外秘)

- 5 Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia coli*-produced Vpb4Da2 Protein by
Pepsin and Pancreatin (TRR0000596) (社外秘)
- 840 6 Supplemental Information of TRR0000731 and TRR0000596: Western Blot Analysis of
the Degradation of Vpb4Da2 and Mpp75Aa1.1 Proteins (社外秘)
- 7 The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Escherichia coli*-produced
Mpp75Aa1.1 Protein (TRR0000870) (社外秘)
- 8 The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Escherichia coli*-produced
Vpb4Da2 Protein (TRR0000871) (社外秘)
- 845 9 Compositional Analyses of Maize Grain and Forage Harvested from MON 95275 Grown
in the United States During the 2019 Season (MSL0030998) (社外秘)