

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議状況について

1. 審議状況

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」に係る食品健康影響評価（平成 20 年 4 月 8 日付け厚生労働省発食安第 0408007 号）については、平成 20 年 6 月 20 日に開催された第 63 回遺伝子組換え食品等専門調査会（座長：澤田純一）において審議され、審議結果（案）がとりまとめられた。

また、審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. 「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」の食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 20 年 8 月 7 日（木）開催の食品安全委員会（第 250 回会合）終了後、平成 20 年 9 月 5 日（金）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等をとりまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果をとりまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書（食品）

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604

(第2版)

2008年8月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目次

	頁
○ 審議の経緯.....	1
○ 食品安全委員会委員.....	2
○ 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員.....	2
要 約.....	3
I. はじめに.....	4
II. 評価対象食品の概要.....	4
III. 食品健康影響評価.....	4
第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項.....	4
1. 宿主及び導入DNAに関する事項.....	4
2. 宿主の食経験に関する事項.....	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	5
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項.....	5
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項.....	8
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	6
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	6
第3. 宿主に関する事項.....	6
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	6
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	6
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	6
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	7
6. 安全な摂取に関する事項.....	7
7. 近縁の植物種に関する事項.....	7
第4. ベクターに関する事項.....	7
1. 名称及び由来に関する事項.....	7
2. 性質に関する事項.....	7
第5. 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	8
1. 挿入DNAの供与体に関する事項.....	8
2. 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	8
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	10
4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10

6.	DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	11
第 6.	組換え体に関する事項	12
1.	遺伝子導入に関する事項.....	12
2.	遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	13
3.	遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項 ...	14
4.	遺伝子産物（タンパク質）のアレルギ－誘発性に関する事項	14
5.	組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	16
6.	遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項	17
7.	宿主との差異に関する事項	17
8.	諸外国における認可、食用等に関する事項	18
9.	栽培方法に関する事項	18
10.	種子の製法及び管理方法に関する事項	18
第 7.	第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	18
IV.	食品健康影響評価結果.....	19
	＜参照＞	19

〈審議の経緯〉

第 1 版関係

2006 年 5 月 19 日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請
2006 年 5 月 22 日	関係書類の受理
2006 年 5 月 25 日	第 114 回食品安全委員会（要請事項説明）
2006 年 6 月 30 日	第 39 回遺伝子組換え食品等専門調査会
2007 年 4 月 16 日	第 47 回遺伝子組換え食品等専門調査会
2007 年 6 月 18 日	第 49 回遺伝子組換え食品等専門調査会
2007 年 6 月 28 日	第 196 回食品安全委員会（報告）
2007 年 6 月 28 日～7 月 27 日	国民からの意見・情報の募集
2007 年 8 月 1 日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
2007 年 8 月 2 日	第 201 回食品安全委員会（報告） 同日付で食品安全委員会委員長から厚生労働大臣へ通知

第 2 版関係

<u>2008 年 4 月 8 日</u>	<u>厚生労働大臣より遺伝子組換え食品等の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第 0408007 号）関係書類の接受</u>
<u>2008 年 4 月 10 日</u>	<u>第 233 回食品安全委員会（要請事項説明）</u>
<u>2008 年 6 月 12 日</u>	<u>第 242 回食品安全委員会（要請事項追加説明）</u>
<u>2008 年 6 月 20 日</u>	<u>第 63 回遺伝子組換え食品等専門調査会</u>

〈食品安全委員会委員〉

2006年6月30日まで

寺田雅昭（委員長）
寺尾允男（委員長代理）
小泉直子
坂本元子
中村靖彦
本間清一
見上 彪

2006年12月20日まで

寺田雅昭（委員長）
見上 彪（委員長代理）
小泉直子
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
本間清一

2006年12月21日から

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理*¹）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄*²
本間清一

*1：2007年2月1日から

*2：2007年4月1日から

〈食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員〉

2007年9月30日まで

早川堯夫（座長）
澤田純一（座長代理）
五十君静信
池上 幸江
今井田克己
宇理須厚雄
小関 良宏
橘田 和美*¹
澁谷 直人

手島 玲子
丹生谷 博
日野 明寛*²
室伏きみ子
山川 隆
山崎 壮
渡邊雄一郎

2007年10月1日から

澤田 純一（座長）
鎌田 博（座長代理）
五十君静信
石見 佳子
宇理須厚雄
小関 良宏
橘田 和美
澁谷 直人
手島 玲子

丹生谷 博
飯 哲夫
山川 隆
山崎 壮
和久井 信
渡邊雄一郎

*1：2006年10月1日から

*2：2006年7月31日まで

要 約

I はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、遺伝子組換えトウモロコシ「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」の食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。

II 評価対象食品の概要

名 称 : コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604
性 質 : コウチュウ目害虫抵抗性
申請者 : シンジェンタシード株式会社
開発者 : Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Production AG and its affiliates

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子を導入して作製されており、コウチュウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。

本食品の宿主であるトウモロコシ（デント種）は、主に飼料として利用されるが、食品としてもコーン油やコーンスターチ等に幅広く用いられている。

III 食品健康影響評価結果

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断された。

I. はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、遺伝子組換えトウモロコシ「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」の食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められ（平成 18 年 5 月 22 日、関係書類を受理）、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日 食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した（平成 19 年 8 月 2 日）。

その後、平成 20 年 4 月、厚生労働省より、導入遺伝子の近傍配列について平成 18 年に提出した資料の塩基配列との相違が認められたため、当該食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について再度意見を求められた。

II. 評価対象食品の概要

名 称 : コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604
性 質 : コウチュウ目害虫抵抗性
申請者 : シンジェンタシード株式会社
開発者 : Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Production AG and its affiliates

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」（以下、「トウモロコシ MIR604」という）は、*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子を導入して作製されており、コウチュウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。

本食品の宿主であるトウモロコシ（デント種）は、主に飼料として利用されるが、食品としてもコーン油やコーンスターチ等に幅広く用いられている。

III. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主植物として用いたトウモロコシは、イネ科トウモロコシ属トウモロコシ (*Zea mays* L.) のデント種である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

トウモロコシ MIR604 に挿入された改変 *cry3A* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* から単離された *cry3A* 遺伝子から 5' 末端の一部が除かれ、さらに塩基配列に変更が加えられたものである。また、選択マーカー遺伝子として用いたマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子（以下「*pmi* 遺伝子」という。）は、*Escherichia coli* から単離されたものである。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法

組換えトウモロコシのゲノムに組み込まれた改変 *cry3A* 遺伝子は、コウチュウ目害虫に対する殺虫活性を付与するタンパク質 (B.t.タンパク質) を、*pmi* 遺伝子は、マンノース 6-リン酸からフルクトース 6-リン酸への異性化を触媒する酵素タンパク質を発現し、遺伝子導入された形質転換体の選択マーカーとして用いられた (参照 1)。これら挿入 DNA は、改変 *cry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子を含むプラスミド pZM26 を用いてアグロバクテリウム法により、デント種トウモロコシに導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシ (デント種) は、主に飼料用として栽培されているが、コーンスターチの原料として利用される他、食用油やスナック菓子に加工されて摂取されており、安全な食品としての長い利用の歴史をもつ (参照 2)。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等 (タンパク質、脂質等) の種類及びその量の概要

トウモロコシ (デント種) の穀粒中の主要栄養素の含有量はタンパク質 6.0-15.0% 乾燥重量 (以下「DW」)、脂質 1.7-5.8% (DW)、灰分 0.6-6.3% (DW)、炭水化物 74.3-89.5% (DW)、総食物繊維 11.1-25.6% (DW) と報告されている (参照 3, 4, 5, 6, 7)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

宿主であるトウモロコシ (デント種) には、ヒト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。

栄養阻害物質としては、フェルラ酸、*p*-クマル酸、フルフラール、イノシトール、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。トウモロコシ穀粒中のこれら栄養阻害物質の含有量は、フェルラ酸 0.02-0.37% (DW)、*p*-クマル酸 0.003-0.058%、フルフラール 5ppm 以下、イノシトール 138-2570ppm、フィチン酸 0.29-1.29% (DW)、ラフィノース 0.04-0.31% (DW)、トリプシンインヒビター 1.1-7.18TIU/mg (TIU:trypsin inhibitor unit) である。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期 (成熟程度) と貯蔵方法

トウモロコシ MIR604 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

(2) 摂取 (可食) 部位

トウモロコシ MIR604 の可食部位は、従来のトウモロコシと変わらない。

(3) 摂取量

トウモロコシ MIR604 の摂取量は、従来のトウモロコシと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MIR604 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ MIR604 において、改変 *cry3A* 遺伝子カセット及び *pmi* 遺伝子カセットの導入により、改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質が産生されていることが、宿主との唯一の相違点と考えられる。

以上、1～6 により、トウモロコシ MIR604 の安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

トウモロコシ MIR604 は、そのゲノムに組み込まれた改変 *cry3A* 遺伝子が、改変 Cry3A タンパク質を産生することから、トウモロコシのコウチュウ目害虫であるコーンルートワームに対して抵抗性を示し、本害虫の防除を可能にする。よって、栽培に用いる殺虫剤の使用量を軽減でき、また、殺虫剤散布や輪作による防除体系と組み合わせることによって、従来よりも省力的で、効果的な害虫の防除が可能となる。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主植物として用いたトウモロコシ (*Z. mays* L.) は、デント種トウモロコシである。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの原産地は、決定的な説はないが、一般的には紀元前 5000 年のメキシコ、あるいはグアテマラが原産地と考えられている。植物学的には、育種の過程で近縁種である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（参照 8）。

その後、新大陸の発見に伴い、アメリカ大陸から世界各地へと普及し、現在、世界各地で栽培されている（参照 9）。日本へは天正年間（1579 年）に伝来したのが最初であるとされており、明治時代に近代的な品種が米国から輸入されるようになって以来、全国的に栽培されるようになった（参照 2）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシにおいて、栄養学的に有害と考えられるレベルの有害生理活性物質の産生性は知られていない（参照 10）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシは世界的に食品として消費されているが、アレルゲン性に関する報告はわずかであり、トウモロコシタンパク質が食物アレルゲンとなることは稀である(参照 11)。

トウモロコシのアレルギー誘発性に関していくつかの報告があるが(参照 12, 13, 14, 15, 16)、真性の食物アレルギーと確認された例は少ない。

最近のトウモロコシのアレルゲンに関する研究では、分子量 9 kDa の lipid transfer protein (LTP) と呼ばれる膜輸送タンパク質(参照 17, 18) 及び 50kDa のタンパク質(参照 19) が、アレルゲンとして作用することが示唆されている。

5. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

多くの植物と同様に、トウモロコシの病気は多く知られているが、それらが人や動物に感染することは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは、米、小麦とともに、世界の主要な穀物の一つであり、古くから食されている。2005 年の全世界におけるトウモロコシの生産量は、約 7 億トンで、米国がその約 4 割を占めている(参照 20)。我が国では 2005 年、約 1,666 万トンのトウモロコシを輸入しており、そのうち約 94%が米国からの輸入である(参照 21)。

また、2005 年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約 1,221 万トンが飼料として用いられ、食品等の加工用に約 445 万トンが使用されている(参照 21)。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、ブタモロコシ及びトリブサクム属があるが、両者は野生種であり、食用にされることはなく、これらについての有害生理活性物質の報告はない(参照 6, 22)。

第 4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

トウモロコシ MIR604 の作出に用いられたプラスミド pZM26 は、pNOV2114 を用いて作出されており、その由来は明らかとなっている。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pNOV2114 の全塩基数は 5,760bp であり、その塩基配列は明らかとなっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pNOV2114 の塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

プラスミド pNOV2114 には、その T-DNA 領域の外骨格領域に細菌中での選抜・維持のため、*E. coli* Tn7 由来の *spec* 遺伝子が含まれており、この遺伝子によってコードされるストレプトマイシンアデニルトランスフェラーゼによって、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性が付与される(参照 23)。なお、*spec* 遺伝子は、宿主ゲノムには挿入されない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pNOV2114 には、その T-DNA 領域の外骨格領域に、*Pseudomonas* 由来の *VS1 ori* (参照 24)、*E. coli* 由来の *ColE1 ori* (参照 25) 及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来の *virG* (参照 26) が含まれているが、宿主ゲノムには挿入されない。

第5. 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入DNAの供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

トウモロコシ MIR604 に導入された遺伝子のうち、改変 *cry3A* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する *cry3A* 遺伝子を改変したものである。また、*pmi* 遺伝子は、*E. coli* K-12 株に由来するものである。

(2) 安全性に関する事項

cry3A 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* は、ヒトに対する食経験はないが、微生物農薬の有効成分として、安全に利用されている歴史がある。また、*pmi* 遺伝子が由来する *E. coli* は、自然界やヒトの消化器官に広く存在することが知られており、これまでヒトは食物を通じて間接的に摂取している。また、*E. coli* K-12 株には毒性を持つ遺伝子は見出されておらず(参照 27)、ヒトや動物の腸内でコロニーを形成できないことが示されている(参照 28)。

2. 挿入DNA又は遺伝子(抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。)及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

改変 *cry3A* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する *cry3A* 遺伝子リーディングフレームの二番目のメチオニン(メチオニン48)から始まる67kDaの改変Cry3Aタンパク質をコードする塩基配列から構成されており、宿主であるトウモロコシでの発現に最適なコドンに置換されたものである。加えて、標的害虫に対する抵抗性を高めるために、バリン-セリン-セリンに相当するアミノ酸配列が、カテプシン

Gプロテアーゼの認識配列であるアラニン-アラニン-プロリン-フェニルアラニンの4アミノ酸となるように、塩基配列が改変されている。

pmi 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされている。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

トウモロコシ MIR604 に導入しようとする改変 *cry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の塩基数及び塩基配列は明らかとされている。

挿入 DNA の構成要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図等は明らかとなっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

土壌細菌である *B. thuringiensis* から単離された殺虫性 Cry3A タンパク質は、特定の昆虫種に対して殺虫活性を示す。感受性昆虫種が Cry3A タンパク質を摂取して消化すると、活性ポリペプチド（コアタンパク質）となり、昆虫の中腸表面の特異的な受容体に結合し、イオンチャネルが形成されて消化器官に損傷を与え、殺虫活性を示すことが知られている（参照 29, 30, 31, 32, 33）。

cry3A 遺伝子は、73kDa の Cry3A タンパク質をコードする。この 73kDa の Cry3A タンパク質は、結晶タンパク質形成の過程又はその後にプロセッシングを受け、67kDa の結晶構造をとり、さらに分解酵素によって、55kDa のコアタンパク質に分解されることによって殺虫活性を示す。

トウモロコシ MIR604 に挿入された改変 *cry3A* 遺伝子は、トウモロコシ害虫であるコウチュウ目昆虫に対し殺虫活性を持つ 598 個のアミノ酸からなる 67kDa の改変 Cry3A タンパク質を宿主において発現するように作製された。

しかし、トウモロコシ MIR604 から抽出した改変 Cry3A タンパク質について、ウエスタンブロット分析を行ったところ、プロテアーゼ阻害剤存在下でも、67kDa の改変 Cry3A タンパク質の他に 55kDa のコアタンパク質が検出されることから、改変 Cry3A タンパク質の一部が、内在性のセリンプロテアーゼにより、55kDa のコアタンパク質となっている可能性も示されている。

pmi 遺伝子は、391 個のアミノ酸からなるマンノースリン酸イソメラーゼ（PMI タンパク質）をコードする。PMI タンパク質は、マンノース-6 リン酸をフルクトース-6 リン酸へ変換する酵素であり、トウモロコシ MIR604 の作出における形質転換体の選択マーカーとして用いられた（参照 1）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

抗生物質耐性マーカー遺伝子である *spec* 遺伝子は、プラスミドの細菌中での選抜・維持のために組み込まれているが、作出されたトウモロコシ MIR604 には挿入されていないことが、確認されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

プラスミド pZM26 の 2 つの遺伝子発現カセットのうち、改変 *cry3A* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシ由来のメタロチオネイン遺伝子のプロモーター領域の MTL PRO であり、*pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシ由来の polyubiquitin 遺伝子のプロモーター領域 Zm UbiInt PRO である。

(2) ターミネーターに関する事項

プラスミド pZM26 の改変 *cry3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域 NOS TERM である。

(3) その他

プラスミド中に、ヒト及び家畜に有害であることが知られているタンパク質をコードする DNA 配列は存在しない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

アグロバクテリウム法によるトウモロコシ MIR604 の作出に用いた DNA 導入用プラスミド pZM26 は、プラスミド pNOV2114 に、pNOV200 由来の [Zm UbiInt]・[*pmi*]・[NOS] 発現カセットを組み込むことにより、pNOV2115 を構築し、さらに、クローニングの汎用性を高めるためにポリリンカーを挿入し、pNOV2117 を構築した。

これとは別に、pCIB6850 から切り出した改変 *cry3A* 遺伝子を pNOV3514 の [MTL]・[NOS] との間に挿入し、[MTL]・[改変 *cry3A*]・[NOS] 発現カセットを持つ pCMS064 を構築した。構築した pCMS064 と pNOV2117 を制限酵素で処理し、結合させることによりプラスミド pZM26 を構築した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

トウモロコシ MIR604 は、プラスミド pZM26 を用いて作出された。pZM26 の塩基数は 13,811bp であり、本プラスミドの塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

構築されたプラスミドには、改変 *Cry3A* タンパク質及び PMI タンパク質以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレーム（以下、ORF という。）は含まれていない。

- (3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

トウモロコシ MIR604 はプラスミド pZM26 を用いて、アグロバクテリウム法により作出されたものであるが、改変 *cry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子のコード配列とともに、組換え体内でのこれらの遺伝子発現に必要な調節要素を含む挿入領域は、プラスミド上で明らかとなっている。

- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

プラスミド pZM26 の各要素は明らかにされており、挿入領域に目的以外の遺伝子は含まれていない。

表 トウモロコシ MIR604 への挿入 DNA

改変 <i>cry3A</i> 遺伝子カセット	
MTL PRO	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） トウモロコシのメタロチオネイン遺伝子のプロモーター領域
改変 <i>cry3A</i>	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>tenebrionis</i> 由来の改変 Cry3A タンパク質をコードする遺伝子
NOS TERM	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域
<i>pmi</i> 遺伝子カセット	
Zm UbiInt PRO	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子のプロモーター領域
<i>pmi</i>	大腸菌 (<i>E. coli</i>) の PMI タンパク質をコードする遺伝子
NOS TERM	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主への遺伝子導入にはアグロバクテリウム法を用い、プラスミド pZM26 を含むアグロバクテリウムを宿主の未熟胚に接種した。

その後、マンノースを含む組織培養培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得た。得られた再生個体について、PCR 法で挿入遺伝子の存在を確認し、その挿入遺伝子由来のタンパク質の発現量、標的コウチュウ目害虫に対する効果、形質、挿入遺伝子の存在様式、構成成分等の評価に基づき、優良株を選抜した。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

プラスミド pZM26 を遺伝子導入して得られた初期世代のトウモロコシ MIR604 のゲノム中に挿入された改変 *cry3A* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットの挿入箇所数、コピー数、挿入遺伝子発現カセットの完全性及び外側骨格配列の有無を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、トウモロコシ MIR604 の染色体上の 1 箇所に 1 コピーの改変 *cry3A* 遺伝子発現カセット及び 1 コピーの *pmi* 遺伝子発現カセットが完全な状態で導入されていることが確認された。また、プラスミド pZM26 の外骨格領域 DNA はサザンブロット分析を行った結果、検出されなかった。

トウモロコシ MIR604 に導入された導入遺伝子の全塩基配列を決定した結果、導入 DNA の左側境界域から 44bp が、右側境界域から 43bp が欠損していたが、改変 *cry3A* 遺伝子カセット及び *pmi* 遺伝子カセットは完全であり、導入遺伝子の全長は、8,415bp であった。

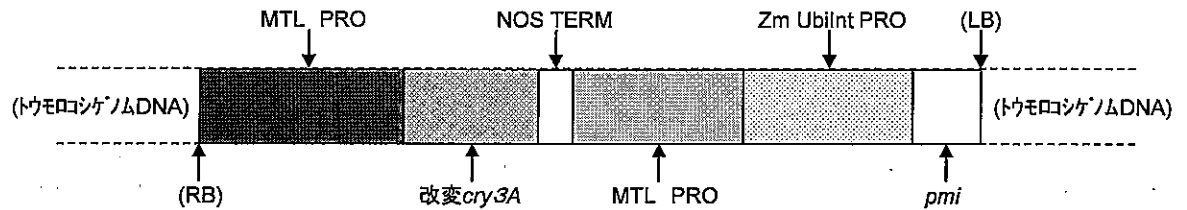
また、改変 *cry3A* 遺伝子カセットの MTL プロモーターの 1 箇所及び *pmi* 遺伝子カセットの *pmi* 遺伝子の 2 箇所に塩基置換が認められたが、これらは、遺伝子導入時に生じたものと考えられる。MTL プロモーターの 1 箇所の塩基置換はタンパク質をコードする領域ではなく、また、*pmi* 遺伝子の 2 箇所の塩基置換によって、2 箇所のアミノ酸置換が起こっているが、トウモロコシ MIR604 中で発現する PMI タンパク質は、目的とする機能を有しており、実質的に同等であることが確認されている。

また、遺伝子の導入に伴いトウモロコシゲノムの 64bp の DNA 配列が欠失していることが確認された（参照 34）。そのため、導入遺伝子のゲノムへの組込みが宿主の既知の遺伝子内で生じている可能性について、公的に利用できる核酸データベース（GenBank, RefSeqNucleotides, EMBL, DDBJ 及び PDB）を対象に BLAST Ver. 2.2.12 の blastn を使用して相同検索を行った結果、欠失 DNA 配列に相同性を示す配列は検出されなかった。このことから、遺伝子導入によって、宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことが示唆された。

トウモロコシ MIR604 の挿入遺伝子の右側境界の近傍ゲノム配列、挿入遺伝子領域の配列及び挿入遺伝子の左側境界の近傍ゲノム配列に対応する 3 本のプライマーを用い PCR 分析を行った。

その結果、右側境界近傍ゲノム配列及び挿入遺伝子領域配列のプライマー対によって、トウモロコシ MIR604 のみに特異的な PCR 産物が増幅された。一方、挿入遺伝子の右側境界の近傍ゲノム配列及び挿入遺伝子の左側境界近傍ゲノム配列のプライマー対によって、非組換え体のみに特異的な PCR 産物が増幅された。このことから、トウモロコシ MIR604 の挿入遺伝子の近傍ゲノム配列はトウモロコシゲノム由来であることが、確認された（参照 35）。

・組換えトウモロコシ MIR604 に挿入された DNA (模式図)



(2) 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

トウモロコシ MIR604 の導入遺伝子の右端及び左端の近傍配列を基に、導入遺伝子と両近傍配列の接合部及び近傍配列において意図しない ORF が形成されているかについて分析した。ORF は 20 以上の連続するアミノ酸配列を持ち、終止コドンから終止コドンまでの領域と定義し、5'側近傍配列 (1,451 bp) 及び隣接する T-DNA 領域 (400bp) の配列 (計 1,851bp) 並びに 3'側近傍配列 (1,766bp) 及び隣接する T-DNA 領域 (400bp) の配列 (計 2,166bp) に対して、センス方向、アンチセンス方向のそれぞれ読み枠をずらした 3 フレームについて、InforMax の VNTi (Ver9.0) を用いて ORF 検索を行った。その結果、導入遺伝子と近傍配列の接合部に 10 個、近傍配列上に 106 個、T-DNA 上に 27 個の計 143 個の ORF が検出された(参照 36)。

この ORF がコードするアミノ酸配列が既知タンパク質と相同性を持つかについて公的に利用できるデータベース (NCBI Non-redundant protein sequences (nr)) を対象に、blastp による検索を行ったが、相同性を示すアレルゲンや毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 37)。

また、エピトープ検索として、この ORF がコードするアミノ酸配列について、Food Allergy Research and Resource Program (FARRP)を対象に、8 つの連続アミノ酸で一致するものがあるかの検索を行ったが、一致するものは見いだされなかった (参照 37)。

さらに、5'側近傍配列 (1,451 bp) 及び隣接する T-DNA 領域 (400bp) の配列 (計 1,851bp) 並びに 3'側近傍配列 (1,766bp) 及び隣接する T-DNA 領域 (400bp) の配列 (計 2,166bp) について、既知のタンパク質と相同性を持つ配列が存在するかについて、NCBI Non-redundant protein sequences (nr) に対し、blastx による検索を行ったが、アレルゲンや毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 38)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質の組換え体及び非組換え体中の発現量を測定した。

米国イリノイ州の試験圃場から採取した 3 種類 (インブレット 1 種類、ハイブリッド 2 種類) の試料を供試し、トウモロコシ MIR604 の葉、根、穀粒、全植物体について、ELISA 法によりタンパク質の発現量を測定した。

トウモロコシ MIR604 における、生育初期から収穫期までの生育ステージを通じた改変 Cry3A タンパク質の発現量の平均値の範囲は、葉で 4.05-93.52 μ g/g (DW)、根で 7.29-62.38 μ g/g (DW)、穀粒で 0.77-1.95 μ g/g (DW)、全植物体で 3.18-28.29 μ g/g (DW)

であった。

一方、PMIタンパク質の発現量の平均値の範囲は、葉で定量限界値未満・2.14 μ g/g (DW)、根で定量限界値未満・1.02 μ g/g (DW)、穀粒で定量限界値未満・0.50 μ g/g (DW)、全植物体で定量限界値未満・2.01 μ g/g (DW) であった。

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

圃場試験で収穫されたトウモロコシ MIR604 の穀粒における改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質の最大発現量は、1.95 μ g/g (DW) 及び 0.50 μ g/g (DW) であった。

平成 14 年度の国民栄養調査結果に基づく日本人一日一人当たりの「とうもろこし・加工品」の平均摂取量 0.4g (参照 39) をすべてトウモロコシ MIR604 に置き換えて計算すると、改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質の一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で 0.78 μ g 及び 0.2 μ g となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 72.15g (参照 39) に基づき、改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質が一日蛋白摂取量に占める割合を計算したところ、 $1 \times 10^{-6}\%$ 及び $3 \times 10^{-7}\%$ であった。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

改変 *cry3A* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* 及び *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* と、ヒトに対するアレルギー誘発性の報告はない (参照 40, 41)。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質ともアレルギー誘発性を持つという知見はこれまでのところ報告されていない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）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

・改変 Cry3A タンパク質

E. coli で発現させた改変 Cry3A タンパク質及びトウモロコシ MIR604 から抽出した改変 Cry3A タンパク質を人工胃液中で処理し、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。

その結果、SDS-PAGE 分析において、両タンパク質とも試験開始後 2 分以内で免疫反応の検出限界未満に消化された。また、ウェスタンブロット分析において、当該タンパク質と免疫反応性のある断片は検出されなかった (参照 42)。

なお、人工胃液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia) に記載されている方法に従って調製した。

- ・ PMI タンパク質

トウモロコシ MIR604 で発現している PMI タンパク質と同じアミノ酸配列を有する PMI タンパク質を *E. coli* で発現させ人工胃液中で処理し、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始後 1 分以内で免疫反応性の検出限界未満に消化された（参照 43）。

なお、人工胃液は、米国薬局方（The United States Pharmacopeia）に記載されている方法に従って調製した。

- ② 人工腸液に対する感受性

- ・ 改変 Cry3A タンパク質

改変 Cry3A タンパク質は、パンクレアチンに含まれるタンパク質分解酵素であるトリプシン又はキモトリプシン処理によって、55kDa のコアタンパク質はほとんど消化されないことが明らかにされているため（参照 44）、人工腸液を用いた消化試験は実施されなかった。

- ・ PMI タンパク質

トウモロコシ MIR604 で発現している PMI タンパク質と同じアミノ酸配列を有する PMI タンパク質を *E. coli* で発現させ 0.1X 及び 0.01X の人工腸液中で処理し、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析を行った。その結果、0.1X の人工腸液中では試験開始後 30 分以内に PMI タンパク質の免疫反応性の検出限界未満に消化された。また、0.01X の人工腸液中では試験開始後 30 分以後も PMI タンパク質のバンドは検出された（参照 45）。

- ③ 加熱処理に対する感受性

- ・ 改変 Cry3A タンパク質

E. coli で発現させた改変 Cry3A タンパク質を用いた加熱試験では、95℃の温度で 30 分間熱処理することによって、殺虫活性を失い、変性することが、生物検定により確認されている（参照 46）。

- ・ PMI タンパク質

トウモロコシ MIR604 で発現している PMI タンパク質と同じアミノ酸配列を有する PMI タンパク質を *E. coli* で発現させた加熱試験では、65℃の温度で 30 分間熱処理することによって、酵素活性を失っていることが、酵素活性検定により確認されている（参照 47）。また、65℃の温度で 30 分間熱処理することによって抗原性は失われていることが、ELISA 法により確認されている（参照 47）。

- (4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項

改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質について、アレルゲン等との構造相同性を確認するため、グリアジンを含む 1,217 のアレルゲン等からなるデータベースを構築し、それを用いて 80 個の連続アミノ酸について、35%以上の一致があるかについて検索を行った。検索は、データベース検索の標準法である FASTA 型ア

ルゴリズム (参照 48) を使用した。また、改変 Cry3A タンパク質及び PMI タンパク質について、アミノ酸配列中にアレルゲンエピトープを示す可能性のある配列が含まれているかを確認するために、連続する 8 つのアミノ酸配列による相同性検索を行った。

- ・改変 Cry3A タンパク質

いずれの検索においても、改変 Cry3A タンパク質について、アレルゲン等との間に構造相同性がないことが確認された (参照 49)。

- ・PMI タンパク質

アレルゲン等との構造相同性を確認した結果、80 連続アミノ酸について 35% 以上の一致は見られなかった。

連続する 8 つのアミノ酸配列検索の結果、PMI タンパク質のアミノ酸配列とカエルの一種 (*Rana species* CH2001) の既知アレルゲンである α -パルブアルブミン (参照 50) のアミノ酸配列が一致することが、確認された (参照 51)。

更に、カエル又は魚由来のアレルゲンであるパルブアルブミンが登録されている Syngenta Biotechnology Inc (SBI) Allergen Database (Food Allergy Research and Resource Program (FARRP)、Allergen Protein database を基に構築) を用いて、連続する 6 及び 7 アミノ酸検索の結果、*R. species* CH2001 の α -パルブアルブミン以外に、カエルの一種 (*Rana esculenta*) の既知アレルゲンである α -パルブアルブミンで相同性が見られたが、魚の α -パルブアルブミンとは相同性が見られなかった。なお、*R. esculenta* で相同性が見られたアミノ酸配列は、*R. species* CH2001 で一致の見られた連続する 8 アミノ酸配列中に含まれており、2 種類のカエルにおいて、同一の配列であることが確認された (参照 52)。

(5) 遺伝子産物 (タンパク質) の IgE 結合能の検討

- ・改変 Cry3A タンパク質

上記 (1) ~ (4) の試験結果から総合的に判断し、改変 Cry3A タンパク質については、IgE 結合の検討は行われなかった。

- ・PMI タンパク質

8 連続アミノ酸検索の結果一致が見られた *R. species* CH2001 の α -パルブアルブミンの報告者である Dr. Hilger に依頼し、*E. coli* で発現させた PMI タンパク質と *R. species* CH2001 由来の α -パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE との結合能の検討を行った。

その結果、PMI タンパク質と *R. species* CH2001 由来の α -パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE との間で結合は認められず、PMI タンパク質の全てのアミノ酸配列が、アレルゲンエピトープとして、 α -パルブアルブミン感受性患者の血清 IgE によって認識される可能性は極めて低いことが、確認された (参照 51)。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

トウモロコシ MIR604 系統のあるハイブリッドを交配して得られた F2 世代について、PMI タンパク質の ELISA 分析と改変 *cry3A* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の PCR 分析

結果を指標として各形質の分離比を検討した結果、F2 世代で実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかった。

トウモロコシ MIR604 の挿入遺伝子の後代における安定性を確認するために、複数世代のゲノム DNA について導入 DNA 領域内に切断部位がある複数の制限酵素で切断し、導入 DNA 領域をカバーする 2 つのプローブを用いてサザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが確認された。

以上のことから、トウモロコシ MIR604 の挿入遺伝子は、メンデルの法則に従って単一の優性遺伝子として後代に安定して遺伝することが確認された。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry3A タンパク質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系と独立して機能していることから、植物の代謝系に影響を及ぼさないと考えられた。

PMI タンパク質は、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触媒酵素タンパク質であり、その反応はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸に対して特異的で、PMI タンパク質に対する他の天然基質は知られていない（参照 53）。

7. 宿主との差異に関する事項

2002 年（4 圃場）及び 2003 年（9 圃場）に栽培されたトウモロコシ MIR604 と非組換え体との間で、茎葉及び穀粒について、主要構成成分、繊維、脂肪酸組成、アミノ酸組成、無機物、ビタミン類、栄養阻害物質及び二次代謝産物の分析、比較を行った。

2002 年に、茎葉中の主要構成成分（灰分、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、粗繊維）、を測定したところ、灰分で、トウモロコシ MIR604 と非組換え対照品種との間に統計学的な有意差が認められたが、測定値は、従来商業品種の分析値の範囲内であった。

2003 年に、茎葉中の主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、総食物繊維）、無機物（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛）を測定したところ、水分、タンパク質、炭水化物、カリウム、銅、マグネシウムで、トウモロコシ MIR604 と非組換え対照品種との間に統計学的な有意差が認められたが、カリウム以外の測定値は、従来商業品種の分析値の範囲内であった。

2002 年に、穀粒中のアミノ酸 18 種類、脂肪酸 5 種類、無機物（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛、クロム）、主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質、デンプン）、粗繊維、ビタミン類（β-カロテン、葉酸、ナイアシン、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6 及びビタミン E）を分析したところ、メチオニン、チロシン、ステアリン酸、オレイン酸、亜鉛で、トウモロコシ MIR604 と非組換え体との間に統計学的な有意差が認められたが、測定値は、従来商業品種の分析値の範囲内であったことから、これらの統計学的な有意差は生物学的に有意な差ではないと考えられた。

2003年に、穀粒中のアミノ酸18種類、脂肪酸5種類、無機物（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛、セレン）、主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質、デンプン）、繊維（酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、総食物繊維）、ビタミン類（β-カロテン、クリプトキサンチン、葉酸、ナイアシン、ビタミンB1、ビタミンB2、パントテン酸、ビタミンB6、ビタミンC、α-トコフェロール、β-トコフェロール、γ-トコフェロール及びδ-トコフェロール）、二次代謝産物（フルフラール、フェルラ酸、*p*-クマル酸）、栄養阻害物質（イノシトール、フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビター）及びフィトステロール（コレステロール、カンペステロール、スチグマステロール、β-シトステロール）を分析したところ、アスパラギン、トレオニン、セリン、グルタミン、アラニン、システイン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、タンパク質、炭水化物、酸性デタージェント繊維、総食物繊維、β-カロテン、クリプトキサンチン、ナイアシン、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、α-トコフェロール、γ-トコフェロール、フェルラ酸、*p*-クマル酸、カンペステロール及びスチグマステロールで、トウモロコシMIR604系統と非組換え体との間に統計学的な有意差が認められたが、測定値は、従来商業品種の分析値の範囲内であったことから、これらの統計学的な有意差は生物学的に有意な差ではないと考えられた。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国環境保護庁（EPA）から、PMI タンパク質については2004年5月14日に、改変Cry3A タンパク質については2005年4月6日に、それぞれ許容値設定除外について認可を得ている。

また、米国食品医薬品庁（FDA）に2005年2月23日に食品・飼料としての利用のための申請を行い、2007年1月30日に安全性審査が終了している。米国農務省（USDA）に2004年12月12日、無規制裁培（商業栽培）のための申請を行い、2007年3月23日に許可を得ている。

欧州食品安全機関（EFSA）には2004年12月23日、輸入のための申請を行っている。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシMIR604の栽培方法については、従来のトウモロコシ品種と同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシMIR604の種子の製法及び管理方法については、従来のトウモロコシ品種と同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6までにより安全性の知見は得られており、次に示された試験は必要な

いと判断される。なお、申請者からは急性毒性試験のデータが提出されていたことから、このデータを念のため確認した。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

1. 急性毒性に関する試験

E. coli で発現させた改変 Cry3A タンパク質を用いてマウスの急性経口毒性試験が行われている。最大投与量（2,377mg/kg 体重）でもマウスに有害な影響は認められなかった。このタンパク質の投与量は、当該トウモロコシ穀粒での改変 Cry3A タンパク質の最大平均発現量（1.95µg/g）を基に計算すると、体重 50kg のヒトが、1 日約 61,000kg のトウモロコシ穀粒を摂取することに相当する（参照 54）。

E. coli で発現させた PMI タンパク質を用いてマウスの急性経口毒性試験が行われている。最大投与量（3,030mg/kg 体重）でもマウスに有害な影響は認められなかった。このタンパク質の投与量は、当該トウモロコシ穀粒での PMI タンパク質の最大平均発現量（0.50µg/g）を基に計算すると、体重 50kg のヒトが、1 日約 303,000kg のトウモロコシ穀粒を摂取することに相当する（参照 55）。

IV. 食品健康影響評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR604」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断された。

<参照>

- 1 Negrotto D, Jolley M, Beer S, Wenck AR, Hansen G. The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. Plant Cell Reports 2000; 19: 798-803.
- 2 菊池一徳. トウモロコシの生産と利用. 光林. 1987.
- 3 OECD. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites. (Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France) *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, No.6. ENV/JM/MONO 2002; 25.
- 4 ILSI. International Life Sciences Institute Crop Composition Database.

- 5 USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 18, 2004.
- 6 Watson SA. Structure and Composition. In *Corn: Chemistry and Technology*. S A Watson and P E Ranstead (ed.), American Association of Cereal Chemists, Minnesota. 1987.
- 7 Souci S W, Fachmann W, Kraut H. *Food Composition and Nutrition Tables*, 5th edition. CRC Press. Scientific Publishers Stuttgart. 1994.
- 8 Galinat W C. The origin of corn. In: *Corn and corn improvement*. G F Sprague and J W Dudley (ed.), Agronomy Monographs No.18: 1-31. American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin. 1988.
- 9 農学大辞典. 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 養賢堂. 1994.
- 10 White P J, Pollak L M. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World* 1995; 40: 756-762.
- 11 Frisner H, Rosendal A, Barkholt V. Identification of immunogenic maize proteins in a casein hydrosylate formula. *Pediatric Allergy Immunol.* 2000; 11:106-110.
- 12 Ispano M, Colafrancesco M, Ansaloni R, Vighi G, Ortolani C. Comparison of the results of skin prick tests, CAP system and ENEA system in the diagnosis of food allergy. *Monogr Allergy* 1996; 32:181-186.
- 13 Jones S M, Magnolfi C F, Cooke S K, Sampson H A. Immunologic cross-reactivity among cereal grains in children with food hypersensitivity. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 96: 341-351.
- 14 Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Schibola E, Trambaioli C, Giuffrida M G, Ansaloni R, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Fortunato D, Ortolani C. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 744-751.
- 15 Pauls J D, Cross D. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis to corn. *J Allergy Clin Immunol.* 1998; 101: 853-854.
- 16 Tanaka L G, El-Dahr J M, Lehrer S B. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107: 744.
- 17 Pastorello E A, Robino A M. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol. Nutr. Food. Res.* 2004; 48: 356-362.
- 18 Pastorello E A, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari A M, Scibilia J, Robino A M, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C. Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112: 775-783.
- 19 Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Peruffo A D,

- Giannattasio M. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy*. 2002; 57: 98-106.
- 20 FAO Food and Agriculture Organization (of the United Nations) 2006
 - 21 財務省貿易統計, 2006
 - 22 Sprague G F, Dudley J W. In *The Origin of Corn: Corn and Corn Improvement* Third Edition. Agronomy No.18 American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin 1988; p.1-31
 - 23 Fling M E, Kopf J, Richards C. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 1985; 13: 7095-7106.
 - 24 Itoh Y, Watson J M, Haas D, Lesinger T. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 1984, 11:206-220.
 - 25 Itoh T, Tomizawa J. Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology* 1978, 43: 409-418.
 - 26 Hansen G, Das A, Chilton M D. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; 91: 7603-7607.
 - 27 Muhldorfer I, Hacker J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*. 1994; 16: 171-181.
 - 28 Smith HW. Survival of orally administered *E. coli* K-12 in alimentary tract of man. *Nature* 1975; 255: 500-502.
 - 29 Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H, Van Rie J, Jansens S, Van Mellaert H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 7844-7848.
 - 30 Von Tersch MA, Slatin SL, Kulesza CA, English LH. Membrane-permeabilizing activities of *Bacillus thuringiensis* coleopteran-active toxin CryIIIB2 and CryIIIB2 domain I peptide. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994; 60: 3711-3717.
 - 31 Carroll J, Convents D, Van Damme J, Boets A, Van Rie J, Ellar D J. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A delta-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* 1997; 70: 41-49.
 - 32 Rausell C, Garcia-Robles I, Sanchez J, Munoz-Garay C, Martinez-Ramirez A C, Real M D, Bravo A. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* Cry3 toxins in membranes of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Biochim. Biophys. Acta*, 2004; 1660: 99-105.
 - 33 Knowles B. Mechanisms of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in Insect Physiology* 1994; 24: 275-308.
 - 34 Analysis of the T-DNA Insertion Site in the Genome of Event MIR604 Maize. 2006; 社内報告書

- 35 PCR Assay for Determination of Zygosity for Corn Transgenic Event: MIR604. 2005; 社内報告書.
- 36 MIR604 FSC response. 2008; 社内報告書
- 37 BLASTP analysis 143 orfs (20aa minimum, stop-to-stop) in 5'FS+400bp T-DNA and 3'FS+400bp T-DNA. 2008; 社内報告書
- 38 BLASTX analysis of MIR604 flanking sequence plus 400bp insert. 2008; 社内報告書
- 39 国民栄養の現状－平成 14 年 厚生労働省国民栄養調査結果. 健康・栄養情報研究会編. 第一出版. 2004.
- 40 Taylor SL, Hefle SL. Will genetically modified foods be allergenic? J Allergy Clin Immunol. 2001; 107: 765-771.
- 41 FAO/WHO Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. January 22-25, 2001. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. 2001
- 42 *In vitro* Digestibility of Modified Cry3A Protein (MCRY3A-0102 and IAPMIR604-0103) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. 2003; 社内報告書.
- 43 *IN VITRO* DIGESTIBILITY OF Phosphomannose Isomerase(PMI) from Test Substance MIR604-PMI-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. 2006; 社内報告書.
- 44 Characterization and Safety of Modified Cry3A Protein and Maize(Corn) Plants Derived from Event MIR604. 2003; 社内報告書.
- 45 *In vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance MIR604-PMI-0105 Under Diluted Simulated Mammalian Intestinal Conditions. 2007; 社内報告書.
- 46 Effect of Temperature on the Stability of Modified Cry3A Protein (MCRY3A-0102). 2003; 社内報告書.
- 47 Effect of Temperature on the Stability of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance MIR604-PMI-0105. 2006; 社内報告書.
- 48 Pearson W R, Lipman D J. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. 1988; 85: 2444-2448.
- 49 Modified Cry3A Protein as Expressed in Transgenic Maize Event MIR604: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Allergens. 2004; 社内報告書.
- 50 Hilger C, Grigioni F, Thill L, Mertens L, Hentges F. Severe IgE-mediated anaphylaxis following consumption of fried frog legs: Definition of alpha-parvalbumin as the allergen in cause. Allergy 2002; 57: 1053-1058.
- 51 Phosphomannose Isomerase as Expressed in Transgenic Maize Event MIR604: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. 2004; 社内

報告書.

- 52 Phosphomannose Isomerase as Expressed in Transgenic Event MIR604 Maize: Assessment of 6,7, and 8 Amino Acid Residue Sequence Homology with Known Allergens. 2007; 社内報告書.
- 53 Freeze H. Phosphomannose isomerase. In Handbook of glycosyltransferases and related genes. Edition 1. Taniguchi N, Honke K. and Fukuda M. (eds) Springer-Verlag, Tokyo and New York 2002; 595-599.
- 54 Acute Oral Toxicity Study of Modified Cry3A Protein (MCRY3A-0102) in the Mouse. 2003; 社内報告書.
- 55 Phosphomannose Isomerase (Sample PMI-0198) FINAL REPORT ACUTE ORAL TOXICITY STUDY IN MICE. 1999; 社内報告書.