

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」に係る食品健康影響評価（平成 21 年 10 月 6 日付け厚生労働省発食安 1006 第 1 号）については、平成 22 年 10 月 27 日に開催された第 85 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）が取りまとめられた。

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. 「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」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 23 年 1 月 13 日（木）開催の食品安全委員会（第 362 回会合）終了後、平成 23 年 2 月 11 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・情報等を取りまとめ、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、審議結果を取りまとめ、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

乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統

2011年1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>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<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名簿>.....	3
要 約.....	4
Ⅰ. 評価対象食品の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
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.....	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	5
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.....	6
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.....	6
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.....	6
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.....	7
第3. 宿主に関する事項.....	7
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.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
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.....	8
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
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.....	9
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.....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	12
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.....	14
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.....	15
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.....	15
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.....	19
9. 栽培方法に関する事項.....	19
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	19
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.....	19
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	19
<参照>.....	20

<審議の経緯>

2009年10月6日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性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1006第1号）、関係書類の接受
2009年10月8日	第304回食品安全委員会（要請事項説明）
2009年10月19日	第75回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年11月16日	第76回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年6月23日	第82回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年10月27日	第85回遺伝子組換え食品等専門調査会
2011年1月13日	第362回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2011年1月6日まで	2011年1月7日から
小泉直子（委員長）	小泉直子（委員長）
見上 彪（委員長代理）	熊谷 進
長尾 拓	長尾 拓
野村一正	野村一正
畑江敬子	畑江敬子
廣瀬雅雄	廣瀬雅雄
村田容常	村田容常

<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名簿>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	澁谷直人
石見佳子	手島玲子
海老澤元宏	中島春紫
小関良宏	飯 哲夫
橘田和美	山崎 壮
児玉浩明	和久井信

要 約

「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を行った。

本系統は、*Bacillus subtilis* に由来する改変低温ショックタンパク質 B 遺伝子を導入して作出されており、改変低温ショックタンパク質 B を発現することで、後期栄養生長期から初期生殖生長期での乾燥ストレス条件下において収量の減少を抑制するとされている。なお、本系統には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株のトランスポゾン Tn5 に由来するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子が導入されている。

「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、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較等について確認した結果、非組換えトウモロコシと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統

性質：乾燥耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」（以下「トウモロコシ MON87460」という。）は、*Bacillus subtilis* に由来する改変低温ショックタンパク質 B 遺伝子（改変 *cspB* 遺伝子）を導入して作出されており、改変低温ショックタンパク質 B（改変 CSPB）を発現することで、後期栄養生長期から初期生殖生長期における乾燥ストレス条件下において収量の減少を抑制するとされている。なお、トウモロコシ MON87460 には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株のトランスポゾン Tn5 に由来するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子 (*npt II* 遺伝子) が導入されている。

II. 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

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) のデント種である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cspB* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* である。また、*npt II* 遺伝子の供与体は *E. coli* K-12 株のトランスポゾン Tn5 である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cspB* 遺伝子が発現する改変 CSPB が RNA シャペロンとして働くことによって、後期栄養生長期から初期生殖生長期での乾燥ストレス条件下において収量の減少を抑制すると考えられている。また、*npt II* 遺伝子は、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられ、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ (NPT II タンパク質) を発現する。

改変 *cspB* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子は、アグロバクテリウム法によって宿主ゲノムに挿入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシの栽培起源は、およそ紀元前 5,000 年前と考えられている。その後、育種、品種改良が行われ、紀元前 3,000 年～1,500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになった。現在、トウモロコシは

小麦、イネと並ぶ三大穀物の一つであり、世界各地で栽培されている。

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

トウモロコシ種子（デント種）の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 6.2～17.3%、総脂質 1.7～5.8%、総繊維 8.8～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.5%である（参照1）。

- (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

トウモロコシ種子（デント種）の有害生理活性物質組成（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.1～1.6%、ラフィノース 0.02～0.32%、トリプシンインヒビター 0.5～7.2 TIU^a/mg である（参照 1,2）。

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 MON87460 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ MON87460 の摂取部位は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (3) 摂取量

トウモロコシ MON87460 の摂取量は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MON87460 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）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 MON87460 は、改変 *cspB* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子の導入によって、改変 CSPB 及び NPT II タンパク質を発現することが宿主との相違点である。

^a TIU : Trypsine Inhibitor Unit

以上、1～6により、トウモロコシ MON87460 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した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

一般にトウモロコシの収量は、乾燥ストレスにより強い影響を受けることが知られており、特に開花期及び登熟期における乾燥ストレスは穀粒の形成を妨げ、収量を減少させることが知られている（参照3, 4）。トウモロコシ MON87460 は、導入された改変 *cspB* 遺伝子が改変 CSPB を発現することによって、後期栄養生長期から初期生殖生長期における乾燥ストレス条件下において収量の減少を抑制するとされている。

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

宿主は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Z. mays* L.) のデント種である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの植物学的起源についての決定的な説はないが、育種過程でテオシントから派生した説が有力とされている。トウモロコシの育種は、古くから集団選抜法が行われていたが、1920年代に一代雑種トウモロコシの育種方法が生まれ、様々な品種が作出された。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシ種子には、フィチン酸、ラフィノース、トリプシンインヒビターが含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシによるアレルギー誘発性の報告は少なく、重要なアレルギー誘発食品とは考えられていない。

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

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が知られているが、これらがヒトに対して病原性を示す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、食品分野においてコーン油、コーンフレーク、コーングリッツ等の原料として幅広く利用されている。

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、*Tripsacum* 属及び *Zea* 属に分類されるテオシントがあるが、いずれも安全性に懸念があるとの報告はない。また、テオシントは現在の栽培用トウモロコシの起源であると考えられており、栽培用トウモロコシに至る過程で摂取された経験がある。

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 MON87460 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMAP595 の構築にはベクターE が用いられた。

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

ベクターE の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

ベクターE の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ベクターE の塩基配列は明らかになっており、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

ベクターE にはストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *aadA* 遺伝子及びカナマイシンやネオマイシン等に対して耐性を付与する *npt II* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターE には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

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

改変 *cspB* 遺伝子の供与体は、*B. subtilis* である。また、*npt II* 遺伝子の供与体は、*E. coli* K-12 株のトランスポゾン Tn5 である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cspB* 遺伝子の供与体である *B. subtilis* は、病原性及び毒性は知られておらず、ヒトは納豆等を通じて多くの食経験がある。

npt II 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株にはヒトに影響を与えるような病原性はないと考えられている。

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 *cspB* 遺伝子は、*B. subtilis* 由来の *cspB* 遺伝子の塩基配列を基に PCR により合成された。その際に、制限酵素切断部位を付加するために、*cspB* 遺伝子の 5'末端に *Nco* I サイトを、3'末端に *EcoR* I サイトを導入するようなプライマーが使用された。その結果、*B. subtilis* の *cspB* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目のロイシンがバリンに改変されている。

npt II 遺伝子は、*E. coli* K-12 株由来であり、トウモロコシ MON87460 で発現する NPT II タンパク質のアミノ酸配列は、野生型の NPT II タンパク質のアミノ酸配列と同一である。

(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

挿入遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・改変 *cspB* 遺伝子

改変 *cspB* 遺伝子は、*B. subtilis* の *cspB* 遺伝子に由来する。*cspB* 遺伝子から発現する低温ショックタンパク質 B (CSPB) は、低温ショックタンパク質 (CSP) に分類され、RNA に結合する低温ショックドメイン (CSD) と呼ばれる配列を保存している。

一般に、細菌中で発現する RNA は、多様な環境ストレス条件下で二次構造を形成し、正常なタンパク質の合成が阻害される。しかし、CSP は RNA に結合し、RNA の二次構造を解消し、翻訳を安定させ、細胞の機能を向上させる RNA シャペロンとして働くことが知られている（参照5,6）。また、植物においても、CSD を含むタンパク質の存在が知られており、細菌と同様に RNA シャペロンとして働くことが知られている（参照7,8,9,10,11）。

in vitro 及び *in vivo* の試験により、トウモロコシ MON87460 で発現する改変 CSPB は、RNA シャペロンとして働くことが確認されたが、トウモロコシ MON87460 は、乾燥ストレスに耐性を示し、低温、高温及び塩ストレスに対して耐性は獲得していないことが確認された（参照12,13,14,15,16）。

トウモロコシ MON87460 における乾燥ストレス耐性能を確認したところ、後期栄養生長期から初期生殖生長期での乾燥ストレス条件下において、非組換えトウモロコシと比較して 9.6～32.1%の収量の増加が確認されたが、通常的水分条件下では、非組換えトウモロコシと比較して収量の差は認められていない（参照17,18）。また、後期栄養生長期から初期生殖生長期での乾燥ストレス条件下と通常的水分条件下での収量を比較したところ、乾燥ストレス条件下で、約 48%収量が減少しており、乾燥ストレスに対して一定の感受性を示すこ

とが確認されている（参照 18）。

改変 *CSPB* と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース（*TOXIN6*^b）を用いて相同性検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照19）。

CD-1 系マウス（雌雄各 10 匹）に *E. coli* で発現させた改変 *CSPB* を 4.7mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与試験を行ったところ、被験物質の投与に関連した異常は認められなかった（参照20及び第7）。

・ *npt II* 遺伝子

npt II 遺伝子は、*E. coli* K-12 株のトランスポゾンである *Tn5* 由来である。*npt II* 遺伝子がコードする *NPT II* タンパク質は、アデノシン-3-リン酸（*ATP*）を利用してカナマイシンやネオマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質をリン酸化して不活化することから、トウモロコシ *MON87460* の作出において形質転換体の選択マーカーとして使用された。

NPT II タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース（*TOX2009*^c）を用いて相同性検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 21）。また、*NPT II* タンパク質について、マウスを用いた単回強制経口投与試験の結果、有害な影響は認められていない（参照22）。

（4）抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

・ *npt II* 遺伝子

食品安全委員会において、*npt II* 遺伝子が導入された遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価は終了しており、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断している。また、欧州食品安全機関においても、遺伝子組換え作物中の *npt II* 遺伝子がヒトの健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断されている（参照23）。

・ *aadA* 遺伝子

導入用プラスミド *PV-ZMAP595* の外骨格領域には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、トウモロコシ *MON87460* のゲノムに挿入されていないことがサザンブロット分析によって確認されている。

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

改変 *cspB* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、イネのアクチン遺伝子由

^b *TOXIN6* : GenBank (GenBank protein database, 163.0 版、2007 年 12 月 15 日)に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース(*PROTEIN*) から検索して集めた 7,176 配列のサブセット。

^c *TOX2009*: GenBank (GenBank protein database, 169.0 版、2008 年 12 月 16 日)に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース(*PROTEIN*) から検索して集めた 7,651 配列のサブセット。

来の Ract1 プロモーターである（参照24）。

npt II 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターである（参照25）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cspB* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) の *tr7* 遺伝子由来のターミネーターである（参照26）。

npt II 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (*nos*) 遺伝子由来のターミネーターである（参照27）。

(3) その他

改変 *cspB* 遺伝子発現カセットには、mRNA の転写の安定化あるいは翻訳効率改善のためのイネのアクチン遺伝子由来のリーダー配列及び発現量を高めるためのイネのアクチン遺伝子由来のイントロンが挿入されている（参照 24）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *npt II* 遺伝子発現カセットを含むベクター E に改変 *cspB* 遺伝子発現カセットを導入することによって導入用プラスミド PV-ZMAP595 が作製された。

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

導入用プラスミド PV-ZMAP595 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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

導入用プラスミド PV-ZMAP595 の T-DNA 領域の塩基配列は明らかになっており、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (ORF) 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

意図する挿入領域は、導入用プラスミド PV-ZMAP595 の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの T-DNA 領域である。この領域がアグロバクテリウム法によって宿主ゲノムに挿入された。

(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

導入用プラスミド PV-ZMAP595 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表1 トウモロコシ MON87460 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
RB	<i>R. radiobacter</i> 由来のノパリン型 T-DNA 領域の右側境界領域
(改変 <i>cspB</i> 遺伝子発現カセット)	
Ract1	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) イネのアクチン遺伝子由来のプロモーター及びリーダー配列
Ract1	(遺伝子産物の発現量を高めるための配列) イネのアクチン遺伝子由来のイントロン
改変 <i>cspB</i>	<i>B. subtilis</i> 由来の改変 CSPB をコードする遺伝子
tr7	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>) の <i>tr7</i> 遺伝子由来のターミネーター
(npt II 遺伝子発現カセット)	
loxP	バクテリオファージ P1 由来の Cre リコンビナーゼ認識部位
35S	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター領域
<i>npt II</i>	<i>E. coli</i> K-12 株由来の NPTII タンパク質をコードする遺伝子
nos	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 <i>nos</i> 遺伝子のターミネーター
loxP	バクテリオファージ P1 由来の Cre リコンビナーゼ認識部位
LB	<i>R. radiobacter</i> 由来のノパリン型 T-DNA 領域の左側境界領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した後、パロモマイシンを添加した培地で選抜して再生個体が得られた。次に、自殖により得た個体について、定量 PCR 分析によりホモ接合体を選抜した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスにしたがって、既存の優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配及び自殖を行い、トウモロコシ MON87460 が得られた。

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

トウモロコシ MON87460 のゲノムに挿入された改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、改変 *cspB* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現

カセットがそれぞれ1コピー挿入されていることが確認された(参照28)。

導入用プラスミド PV-ZMAP595 の外骨格領域が導入されていないことを確認するために、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は導入されていないことが確認された(参照28)。

トウモロコシ MON87460 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-ZMAP595 の T-DNA 領域と比較した結果、5'末端領域の 1,122 bp の欠損(RB 領域の 357 bp、導入用プラスミド配列の 32 bp 及びプロモーターの 5'末端から 733 bp) 及び 3'末端領域の 194 bp (LB 領域) の欠損を除き、塩基配列は一致することが確認された(参照28)。

トウモロコシ MON87460 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、トウモロコシ MON87460 の塩基配列に基づいて、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列に対して挿入 DNA を挟むようにプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、宿主である非組換えトウモロコシのみに特異的な PCR 産物が増幅された(参照28)。また、増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、トウモロコシ MON87460 の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列の塩基配列と比較した結果、DNA の挿入に伴う 22 bp の欠失を除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主ゲノムの塩基配列は一致した(参照28)。これらのことから、挿入 DNA の近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された。

トウモロコシ MON87460 のゲノムに DNA を挿入することによって宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列(1,143 bp) 及び 3'末端近傍配列(784 bp) について、公的に利用できる核酸データベース(GenBank) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索においてトウモロコシ由来の mRNA と相同性が認められたが、相同性が認められた配列は全長 534 bp ある mRNA の一部(76 bp) であり、挿入遺伝子の 3'末端から 673 bp 下流に位置していること、blastx 検索において相同性を示す既知のトウモロコシ由来のタンパク質は見いだされなかった(参照29)。したがって、DNA の挿入によって既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた。

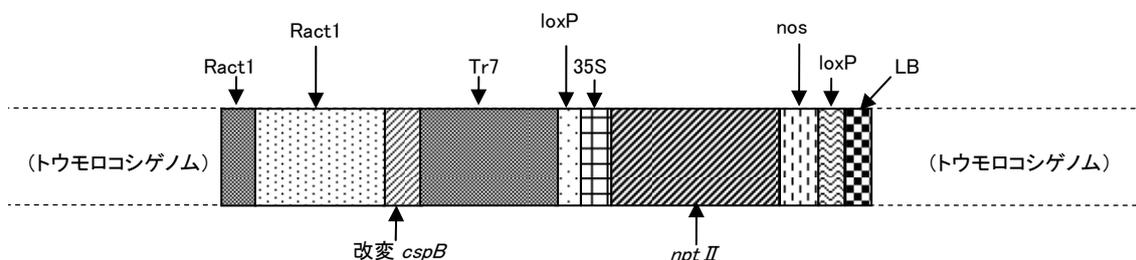


図1 トウモロコシ MON87460 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87460 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列(1,121 bp)

及び3'末端近傍配列(784 bp)との接合部において意図しないORFが生じていないことを確認するために、6つの読み枠においてORF検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する8アミノ酸以上のORFが9個見いだされた(参照30)。

9個のORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、TOXIN6及びNCBIプロテインデータベースを用いてFASTA検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照30)。

9個のORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース(AD8^d)を用いて相同性検索を行った結果、連続する80以上のアミノ酸配列について35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった(参照30)。また、抗原決定基の有無を確認するために、AD8を用いて相同性検索を行った結果、連続する8アミノ酸配列と一致する配列は見いだされなかった(参照30)。

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

トウモロコシMON87460の葉、根、植物体及び穀粒について、通常的水分条件下及び乾燥ストレス条件下における改変CSPB及びNPTⅡタンパク質の発現量をELISA法を用いて分析を行った。結果は表2及び3のとおりである(参照31)。

表2 トウモロコシMON87460における改変CSPBの発現量

(単位はµg/g 新鮮重)

分析組織*	通常的水分条件	乾燥ストレス条件
葉	0.023~0.80	0.023~0.80
根	0.032~0.18	0.036~0.20
全植物体	0.065~0.52	0.067~0.42
穀粒	0.028~0.065	0.021~0.045

* 葉、根、植物体は2葉期~15葉期、穀粒は収穫期の値を示した。

表3 トウモロコシMON87460におけるNPTⅡタンパク質の発現量

(単位はµg/g 新鮮重)

分析組織*	通常的水分条件	乾燥ストレス条件
葉	0.15~0.85	0.16~0.68
根	0.041~0.064	0.035~0.057
茎葉	0.031~0.044	0.034~0.048
穀粒	検出限界**以下~0.0057	検出限界以下~0.0051

* 葉及び根は1葉期、茎葉は初期黄熟期、穀粒は収穫期の値を示した。

**検出限界は0.0024 µg/gである。

^d AD8: Food Allergy Research and Resource Program Database(FARRP)から得られた配列をもとに作成されたアレルゲン、グリアジン及びグルテニンからなるデータベース

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

日本人 1 人が 1 日に摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 0.5 g (参照32) をすべてトウモロコシ MON87460 に置き換えて改変 CSPB の摂取量を計算すると、0.0205 µg となり、1 人 1 日当たりのタンパク質摂取量 71.1 g (参照 32) に占める割合は 2.9×10^{-10} となる。また、NPT II タンパク質は穀粒では定量限界値以下であったことから、定量限界値の量を含んでいたと仮定し、日本人 1 人が 1 日に摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量をすべてトウモロコシ MON87460 に置き換えて NPT II タンパク質の摂取量を計算すると、0.00235 µg となり、1 人 1 日当たりのタンパク質摂取量に占める割合は 3.3×10^{-11} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

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 *csxB* 遺伝子の供与体である *B. subtilis* 及び *npt II* 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 CSPB 及び NPT II タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(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 CSPB

E. coli で発現させた改変 CSPB の人工胃液中における消化性について確認するために、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 分析においては、試験開始後 30 秒以内にポリペプチド断片に分解され、60 分後には消化されることが確認された。ウェスタンブロット分析においては、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された。なお、SDS-PAGE 分析において確認されたポリペプチド断片はウェスタンブロット分析においては確認されなかった (参照33, 34)。

SDS-PAGE 分析で検出されたポリペプチド断片の消化性について確認するために、人工胃液中で 2 分間処理後、人工腸液中で処理した結果、ポリペプチド断片は人工腸液処理後 30 秒未満で消化されることが確認された (参照 34)。

・NPT II タンパク質

E. coli で発現させた NPT II タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析が行われており、10 秒以内に消化されることが報告されている (参照 22,35)。

② 人工腸液に対する感受性

・改変 CSPB

E. coli で発現させた改変 CSPB の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された（参照 33,34）。

・NPT II タンパク質

E. coli で発現させた NPT II タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析が行われており、15 分以内に消化されることが報告されている（参照 22, 35）。

③ 加熱処理に対する感受性

・改変 CSPB

トウモロコシ MON87460 の穀粒中に含まれる改変 CSPB の加熱処理に対する感受性について確認するために、ELISA 法を用いて分析を行った。その結果、改変 CSPB は、204℃、15 分間の加熱で免疫反応性が失われることが確認された（参照36）。

・NPT II タンパク質

トウモロコシ MON87460 の穀粒中に含まれる NPT II タンパク質は含量が少ないことから、加熱処理に対する感受性試験は行われていないが、同じ NPT II タンパク質が含まれる遺伝子組換えトウモロコシ MON863 系統で行われた穀粒の加熱処理に対する感受性試験（ELISA 法）の結果、204℃、30 分間の加熱で免疫反応性が失われることが確認されている（参照37）。

(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 CSPB 及び NPT II タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース（AD8）を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった（参照 38,39）。また、改変 CSPB 及び NPT II タンパク質における抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース（AD8）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致する配列は見いだされなかった（参照 38,39）。

上記（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 CSPB 及び NPT II タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

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 MON87460 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、7 世代のトウモロコシ MON87460 について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の期待分

離比と実測値を比較した。その結果、改変 *cspB* 遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが示された（参照40）。

また挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、7世代のトウモロコシ MON87460 につ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（参照 28）。

さらに、改変 CSPB の発現の安定性を確認するために、7世代のトウモロコシ MON87460 の種子について ELISA 法を用いて分析を行った結果、いずれの世代でも発現していることが確認された（参照41）。

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

CSP は、RNA シャペロンとして、RNA の二次構造を解消し、翻訳を安定させると考えられているが（参照42,43）、CSPB がタンパク質の翻訳に直接関与するとの報告はない（参照44,45）。また、CSPB が酵素活性を有するとの報告もないこと、トウモロコシ MON87460 の種子における成分分析の結果、差異は認められないことから、改変 CSPB の発現により新たな代謝物が生じる可能性はないと考えられる。

また、NPT II タンパク質は、アミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ酸配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素であり（参照46）、このリン酸化反応にのみ関与し、高い基質特異性を持つことが示唆されている（参照 47,48,49）。

したがってこれらのタンパク質が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。

7. 宿主との差異に関する事項

チリ及び米国の圃場で通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下において栽培されたトウモロコシ MON87460 と宿主である非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、二次代謝産物及び栄養阻害物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照50,51）。また、チリの圃場で通常の水分条件下及び乾燥ストレス条件下において栽培されたトウモロコシ MON87460 と非組換えトウモロコシについて、ストレス応答に関わる二次代謝産物等の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照52,53）。

（1）主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維、総食物繊維（穀粒のみ））について分析を行った結果、対照に用いた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ないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(2) ミネラル類

穀粒のミネラル類（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）及び茎葉のミネラル類（カルシウム、リン）について分析を行った結果、対照に用いた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ないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(3) ビタミン類

穀粒の葉酸、ナイアシン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン E について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(5) 脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、対照に用いた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ないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(6) 二次代謝産物

穀粒のフェルラ酸、p-クマル酸及びフルフラールについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(7) 栄養阻害物質

穀粒のフィチン酸及びラフィノースについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(8) ストレス応答に関わる二次代謝産物等

穀粒及び茎葉のサリチル酸、アブシシン酸、スクロース、グルコース、フルクトース、ソルビトール、マンニトール、グリセロール、遊離プロリン、コリン及びグリシンベタインについて分析を行った結果、通常的水分条件下における茎葉中のアブシシン酸で有意な増加が認められた。しかし、有意差が認められたのは 3 箇所の圃場のうち 1 箇所であり、穀粒では統計学的有意差は認められなかった。その他の項目については、対照に用いた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ないか、統計学的有意差が認められた場合で

あっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

また、アレルゲンとして知られている LTP について分析を行った結果、LTP 含量が対照に用いた非組換えトウモロコシよりも高まることはないことを確認した。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、2008年12月、米国食品医薬品庁（FDA）に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2009年2月、米国農務省（USDA）に無規制栽培のための申請を行った。

カナダにおいては、2009年3月、カナダ保健省（Health Canada）に食品としての安全性審査の申請を行い、2009年3月、カナダ農務省（CFIA）に飼料・環境の安全性審査の申請を行った。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に食品としての安全性審査の申請を行い、2010年9月に確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87460 の栽培方法は、従来のトウモロコシ（デント種）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 MON87460 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ（デント種）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5の2（3）に係る安全性確認のため、改変 CSPB の急性毒性試験結果の確認を行った（参照 20）。

CD-1 系マウス(雌雄各 10 匹)に *E. coli* で発現させた改変 CSPB を 4.7 mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、15 日目に剖検を行った。その結果、体重、摂餌量、肉眼的観察において、被験物質の投与に関連した異常は認められなかった。

III. 食品健康影響評価結果

「乾燥耐性トウモロコシ MON87460 系統」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」（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と判断した。

<参照>

- 1 ILSI. Crop Composition Database. International Life Science Institute, 2007.
<http://www.cropcomposition.org>.
- 2 Ridley, W.P., R.S. Sidhu, P.D. Pyla, M.A. Nemeth, M.L. Breeze, and J.D. Astwood, Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That Conventional Corn (*Zea Mays* L.), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2002, p.7235-7243.
- 3 Claassen, M. M., Shaw, R. H. Water deficit effects on corn. II. Grain components. *Agron J.* 1970, 62, p.652-655.
- 4 Boyer, J. S., Westgate, M. E. Grain yields with limited water. *J Exp Bot.* 2004, 55, p.2385-2394.
- 5 Cristofari, G., Darlix, J. L. The ubiquitous nature of RNA chaperone proteins. *Progr Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002, 72, 223-268.
- 6 Graumann, P., Wendrich, T. M., Weber, M. H. W., Schroder, K., Marahiel, M. A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol.* 1997, 25, 741-756.
- 7 Kim, J. S., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y.O., Kim, J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C.-H., Kang, H. Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2007, 35, 506-516.
- 8 Nakaminami, K., Sasaki, K., Kajita, S., Takeda, H., Karlson, D., Ohgi, K., Imai, R. Heat stable ssDNA/RNA-binding activity of a wheat cold shock domain protein. *FEBS Lett.* 2005, 579, 4887-4891.
- 9 Nakaminami, K., Karlson, D. T., Imai, R. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006, 103, 10122-10127.
- 10 Chaikam, V., Karlson, D. Functional characterization of two cold shock domain proteins from *Oryza sativa*. *Plant Cell Environ.* 2008, 31, 995-1006.
- 11 Fusaro, A. F., Bocca, S. N., Ramos, R. L., Barroco, R. M., Magioli, C. Jorge, V. C., Coutinho, T. C., Rangel-Lima, C. M., De Rycke, R., Inze, D., Engler, G., Sachetto-Martins, G. AtGRP2, a cold-induced nucleocytoplasmic RNA-binding protein, has a role in flower and seed development. *Planta.* 2007, 225, 1339-1351.
- 12 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Drought Tolerant Corn MON87460 in 2008. (社内報告書)
- 13 An Assessment of the Effect of Heat Stress on Drought Tolerant Corn MON87460 in 2008. (社内報告書)

- 14 An Assessment of the Effect of Salt Stress on Drought Tolerant Corn MON87460 under Greenhouse Conditions in 2008. (社内報告書)
- 15 Phenotypic Evaluation of Drought Tolerant Corn MON87460 Under Heat Stress in a U.S.Field Trial During 2008. (社内報告書)
- 16 Phenotypic Evaluation of Drought Tolerant Corn MON87460 Under Four Salt Stress Levels in a U.S.Field Trial During 2008. (社内報告書)
- 17 Yield component and physiology data from 2003 Kansas and 2007 California field trials. (社内報告書)
- 18 Phenotypic Evaluations and Ecological Interactions of Drought Tolerant Corn MON87460 Under Well-Watered and Water-Limited Conditions in Chilean Field Trials During 2006-2007. (社内報告書)
- 19 Bioinformatics Evaluation of the CSPB Protein Utilizing the AD8, TOXIN6, and PROTEIN Databases (社内報告書).
- 20 An Acute Toxicity Study of Cold Shock Protein B Administered by the Oral (Gavage) Route to Mice. (社内報告書).
- 21 Updated Bioinformatics Evaluation of the NPTII Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Databases (社内報告書).
- 22 Fuchs, R.L., J.E. Ream, B.G. Hammond, M.W. Naylor, R.M. Leimgruber, S.A. Berich, Safety Assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) Proteins, *Biotechnolgy*, 1993, 11, 1543-1547.
- 23 EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. 2004. http://www.efsa.europ.eu/EFSA/Scientific_Opinion/opinion_gmo_05_en1,0.pdf
- 24 McElroy, D., Zhang, W.,Cao, J., Wu, R. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*. 1990, 2, 163-171.
- 25 Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985, 313, 810-812.
- 26 Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, J., Van Montague, M., Schell, J. Identification of Sequences Involved in Polyadenylation of Higher Plant Nuclear Transcripts Using *Agrobacterium* T-DNA Genes as Models. *Embo J*. 1983, 2, 419-426.
- 27 Bevan, M., Barnes, W., Chilton, M. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucl Acids Res*. 1983, 11, 369-385.
- 28 Molecular Analysis of Corn MON87460. (社内報告書)
- 29 Compositional analysis of grain from imidazolinone tolerant soybean BPS-CV127-9 produced in Brazil in 2006/2007 and comparison with that from

- isoline control and conventional soybean varieties (社内報告書).
- 30 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in Corn MON87460: Assessment of Putative Polypeptides. (社内報告書)
 - 31 Assessment of the CSPB and NPTII Protein Levels in Tissues of Drought Tolerant Corn MON 87460 Produced in a 2006-2007 Chilean Field Trial under Well-Watered and Water-Limited Conditions (社内報告書).
 - 32 厚生労働省、国民健康・栄養の現状 平成 17 年国民健康・栄養調査報告より、第一出版株式会社、2008
 - 33 Characterization of the *Bacillus subtilis* Cold Shock Protein B (CSPB) Purified from the Grain of Drought Tolerant Corn MON 87460 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the MON 87460-Produced and *E.coli*-Produced CSPB proteins (社内報告書).
 - 34 Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Cold Shock Protein B (CSPB) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (社内報告書).
 - 35 Assessment of the physicochemical Equivalent of the Plant-Produced NPTII Protein from the Leaf of MON87460 to the *E.coli*-Produced NPTII Protein. (社内報告書)
 - 36 Immunodetection of the *Bacillus subtilis* Cold Shock Protein B (CSPB) in Corn Grain of MON 87460 Following Heat Treatment (社内報告書).
 - 37 Immuno-detectability of NPTII Protein in the Grain of Insect Protected Corn Event MON 863 After Heat Treatment (社内報告書).
 - 38 Bioinformatics Evaluation of the CSPB Protein Utilizing the AD8, TOXIN6, and PROTEIN Databases. (社内報告書)
 - 39 Updated Bioinformatics Evaluation of the NPTII Protein Utilizing the AD_2009_and TOX_2009 Databases. (社内報告書)
 - 40 Assessment of Insert Segregation for MON 87460 (社内報告書).
 - 41 Assessment of the Presence of CSPB Protein in Grain Samples from Multiple Generations of MON 87460 by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (社内報告書).
 - 42 Herschlag,D., RNA Chaperones and the RNA Folding Problem, The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270, 20871-20874.
 - 43 Jiang, W., Y. Hou, M. Inouye, CspA, the Major Cold-shock Protein of *Escherichia coli*, Is an RNA Chaperone, The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272, 196-202.
 - 44 Schindler, T., P.L. Graumann, D. Perl, S.F. Ma, F.X. Schmid, and M.A. Marahiel. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*-Stability and dynamics *in vitro* and *in vivo*. Journal of Biological Chemistry. 1999, 274,

3407-3413.

- 45 Weber, M.H.W., A.V. Volkov, E. Fricke, M.A. Marahiel, and P.L. Graumann. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in bacillus subtilis depends on active transcription. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183, 6435-6443.
- 46 Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., Miller, G. H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and family relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993, 57, 138-163.
- 47 Price, K. E., Godfrey, J. C. Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv Appl Microbiol* 1974, 18, 191-307.
- 48 Davies, J., Smith, D. I. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu Rev Microbiol*. 1978, 32, 469-518.
- 49 Davies, J. "Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes". *Antibiotics in laboratory medicine*. Lorian, V. Eds. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1980, 474-489.
- 50 Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production (社内報告書)
- 51 Compositional Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON87460 Grown in a 2006 USA Field Production (社内報告書)
- 52 Metabolite Analyses of Forage and Grain Collected from Drought Tolerant Corn MON87460 Grown in a 2006/2007 Chile Field Production (社内報告書)
- 53 Relative Abundance of Lipid Transfer Protein (LTP) in the Grain of Drought Tolerant Corn (MON87460) Under Well-Watered and Water-Limited Conditions (社内報告書)