

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統

2007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名簿	1
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	1
要約	2
チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果	3
はじめに	3
評価対象食品の概要	3
食品健康影響評価	3
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	3
1 宿主及び導入DNAに関する事項	3
2 宿主の食経験に関する事項	4
3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	4
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	4
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	4
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	4
第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
第3 宿主に関する事項	5
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	5
2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	5
3 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
4 アレルギー誘発性に関する事項	5
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	5
6 安全な摂取に関する事項	5
7 近縁の植物種に関する事項	5
第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
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	6
1 挿入DNAの供与体に関する事項	6
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	7
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	8

4	ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	8
5	構築された発現ベクターに関する事項	8
6	DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	10
第6	組換え体に関する事項	10
1	遺伝子導入に関する事項	10
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	11
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	12
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	12
5	組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	14
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	14
7	宿主との差異に関する事項	14
8	諸外国における認可、食用等に関する事項	14
9	栽培方法に関する事項	15
10	種子の製法及び管理方法に関する事項	15
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	15
	食品健康影響評価結果	16
	参考文献	16

## 審議の経緯

平成19年2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、関係書類の受理
平成19年2月22日	第179回食品安全委員会（要請事項説明）
平成19年3月9日	第46回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年7月10日	第50回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年8月2日	第201回食品安全委員会（報告）
平成19年8月2日～8月31日	国民からの意見・情報の募集

## 食品安全委員会委員

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
	廣瀬雅雄 <sup>*1</sup>
	本間清一

\*1:平成19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

座長	早川堯夫	
座長代理	澤田純一	
	五十君静信	手島玲子
	池上幸江	丹生谷博
	今井田克己	室伏きみ子
	宇理須厚雄	山川隆
	小関良宏	山崎壮
	橘田和美	渡邊雄一郎
	澁谷直人	

## 要 約

### 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「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統」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。

### 評価対象食品の概要

名 称 : チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統  
性 質 : チョウ目害虫抵抗性  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : Monsanto Company(米国)

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統」は、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry1Ab* 遺伝子、*cry1Ac* 遺伝子及び *cry1F* 遺伝子を基に作製された *cry1A.105* 遺伝子及び *B. thuringiensis* 由来の改変 *cry2Ab2* 遺伝子を導入して作製されており、チョ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。

### 食品健康影響評価結果

「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 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」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。

## チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果

### 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、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統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。(平成 19 年 2 月 19 日、関係書類を受理)

### 評価対象食品の概要

名称 : チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統  
性質 : チョウ目害虫抵抗性  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : Monsanto Company (米国)

遺伝子組換えトウモロコシ「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 系統」(以下、「トウモロコシ MON89034 系統」という)は、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry1Ab* 遺伝子、*cry1Ac* 遺伝子及び *cry1F* 遺伝子を基に作製された *cry1A.105* 遺伝子及び *B. thuringiensis* 由来の改変 *cry2Ab2* 遺伝子を導入して作製されており、チョ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。

### 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.)のデント種の自殖系統 LH172 である。

##### (2) DNA 供与体の種名及び由来

トウモロコシ MON89034 系統に挿入された *cry1A.105* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* から単離された *cry1Ab* 遺伝子及び *cry1Ac* 遺伝子、*B. thuringiensis* var. *aizawai* から単離された *cry1F* 遺伝子の一部分を基に作製されたものである。また、改変 *cry2Ab2* 遺伝子は *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* から単離された *cry2Ab2* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものである。

##### (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 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、チョ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)を発現させる。これら挿入 DNA は、*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子を含むプラスミド PV-ZMIR245 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である LH172 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。

## 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組成はタンパク質 6-16.1%、脂質 2.5-5.7%、灰分 1.1-6.28%、炭水化物 77.4-88.1%と報告されている(文献値)。

### (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、フィチン酸及びラフィノースなどが知られている。トウモロコシ穀粒中のフィチン酸含有量は0.45-1.00%、ラフィノースは0.21-0.31%である。(参考文献1)

## 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 MON89034 系統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 MON89034 系統の可食部位は、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 MON89034 系統の摂取量は、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 MON89034 系統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 MON89034 系統において、*cry1A.105* 遺伝子カセット及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子カセットの導入により *Cry1A.105* タンパク質及び改変 *Cry2Ab2* 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 MON89034 系統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 MON89034 系統は、そのゲノムに組み込まれた *cry1A.105* 遺伝子が Cry1A.105 タンパク質を、改変 *cry2Ab2* 遺伝子が改変 Cry2Ab2 タンパク質を産生することから、トウモロコシの害虫である European corn borer、Southwestern corn borer、Southern cornstalk borer 等に対し抵抗性を示し、本害虫の影響を受けずに生育できるとされている。

## 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の自殖系統 LH172 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、メキシコ、あるいはグアテマラと考えられている。植物学的には、育種の過程でブタモロコシ (*teosinte*, *Z. mexicana*) から派生したとする説が有力とされている。(参考文献 2,3,4)

### 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、有害生理活性物質の産生性は知られていない。(参考文献 5)

### 4 アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシは重要なアレルギー誘発食品であるとは考えられておらず(参考文献 1) アレルギーの報告例は少なく、数件(参考文献 6,7)が報告されているが、いずれの場合もアレルゲンは特定されておらず、アナフィラキシーの事例も稀であるとされている。

最近になって、Pasterollo らは lipid transfer protein(LTP)が、トウモロコシの主なアレルゲンであると示唆する報告をしている。(参考文献 8,9) この感作は主に南ヨーロッパで認められており、また、トウモロコシの LTP への感作を起こした患者は、LTP を含む他の野菜にもアレルギー反応を起こす可能性が高いと考察されている。

### 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、それらがヒト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。我が国では 2005 年、でん粉製造用としておよそ 348 万トン、その他の製造用原料としておよそ 57 万トンのトウモロコシを輸入している。(参考文献 10)

### 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* 属のブタモロコシがある。トウモロコシと自

然交雑が可能なのはブタモロコシのみで *Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない。(参考文献 11) 我が国では、*Tripsacum* 属の野生種及びブタモロコシの存在は報告されていない。(参考文献 12,13)

#### 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 MON89034 系統の作出に用いられたプラスミド PV-ZMIR245 は、中間プラスミド A~F を用いて作出されている。

これらの中間プラスミド A~F は、非病原性の *Escherichia coli* 又は *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)由来である。

##### 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

それぞれの間中プラスミドの塩基数及び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

それぞれの間中プラスミドの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

それぞれの間中プラスミド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

中間プラスミドには、*E. coli* 又はアグロバクテリウムにおける選抜マーカーとしてスペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対して耐性を付与するために、アデニルトランスファーゼ (AAD) をコードする *aadA* 遺伝子が含まれている。また、形質転換体の選択マーカーとしてカナマイシンに対する耐性を付与する *npt* 遺伝子が含まれているが、組換え体における挿入遺伝子の解析の結果、これらの遺伝子は宿主ゲノムには存在していないことが確認された。

###### (5) 伝達性に関する事項

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

トウモロコシ MON89034 系統に導入された遺伝子のうち、*cry1A.105* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* から単離された *cry1Ab* 遺伝子及び *cry1Ac* 遺伝子、*B. thuringiensis* var. *aizawai* から単離された *cry1F* 遺伝子の一部分を基に作製されたものである。

また、改変 *cry2Ab2* 遺伝子は *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* から単離された *cry2Ab2* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものである。

R0 世代の組換え体の作出においては *npt* 遺伝子が挿入されており、*npt* 遺伝子は *E. coli* のトランスポゾンである Tn5 由来である。

## (2) 安全性に関する事項

*cry1A.105* 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 及び *B. thuringiensis* var. *aizawai* は土壤中に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜に対し病原性等の問題は報告されていない。

改変 *cry2Ab2* 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* は土壤中に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜に対しての病原性は知られていない。

*npt* 遺伝子が由来する *E. coli* は、ヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である。

## 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

*cry1A.105* 遺伝子は、*cry1Ac* 遺伝子中のドメイン 領域を *cry1F* 遺伝子のドメイン 領域に置き換え、得られたキメラ *cry1Ac* 遺伝子のドメイン 及び をさらに *cry1Ab* 遺伝子のドメイン 及び に置き換えることによって作製された。なお、*cry1A.105* 遺伝子のドメイン 領域に相当する *cry1F* 遺伝子のドメイン 領域は、BtEG11751 の配列 ( 参考文献 14 ) 中の *SacI* サイトから *Clal* サイトまでの 872bp の領域を基に作製されているが、単子葉植物中での発現を高めるためにコドンは最適化されており、さらに *Clal* サイトは *XhoI* サイトに変更されている。

改変 *cry2Ab2* 遺伝子は野生型の *cry2Ab2* 遺伝子の塩基配列を基に改変され、単子葉植物中での発現を高めるために最適化されている。

挿入 DNA の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。

### (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 MON89034 系統に導入された T-DNA の挿入部分の塩基数は明らかであり、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

*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、トウモロコシの害虫であるチョウ目昆虫を防除するタンパク質をコードしている。組換えにより両遺伝子産物を共に発現させた場合、それぞれの遺伝子産物が相互に作用し合う可能性が考えられるが、掛け合わせの事例、両遺伝子産物の性質及び人工胃液や人工腸液に対する感受性等を総合的に勘案すると相互作用によりヒトの安全性に影響を与える恐れはないと推測される。なお、念のため両遺伝子産物を共存させたトウモロコシ MON89034 の穀粒を与えたラットにおける亜急性毒性試験 ( 第 7 参照 ) が実施されている。

### (4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

プラスミド PV-ZMIR245 の T-DNA 領域には、*E. coli* のトランスポゾンである Tn5 由来のカナマイシン耐性を付与する *npt* 遺伝子を含んでいるが、R1 世代以降の組換え体には挿入されていないことが、サザンブロット分析及び ELISA 分析により確認されている。

また、プラスミド PV-ZMIR245 の T-DNA 外領域には、*E. coli* のトランスポゾンである Tn5 由来のスペクチノマイシンまたはストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を含んでいるが、宿主には挿入されていないことが、サザンブロット分析により確認されている。

### 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 PV-ZMIR245 の 3 つの遺伝子発現カセットのうち、*cry1A. 105* 遺伝子発現カセット及び *npt* 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 (CaMV) 由来の P-e35S で、植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる機能をもつ。(参考文献 15)

また、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Figwort mosaic virus 由来の P-FMV で(参考文献 16)で、植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる機能をもつ。

#### (2) ターミネーターに関する事項

プラスミド PV-ZMIR245 の 3 つの遺伝子発現カセットのうち、*cry1A. 105* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、コムギ由来の熱ショックタンパク質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域である T-Hsp17 である。

また、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセット及び *npt* 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遺伝子の 3' 末端非翻訳領域である NOS 3' 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 MON89034 系統の作出に用いた DNA 導入用プラスミド PV-ZMIR245 は、中間プラスミドに *cry1A. 105* 遺伝子発現カセット、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセット及び *npt* 遺伝子発現カセットを組込むことにより構築された。

### 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

トウモロコシ MON89034 系統は、プラスミド PV-ZMIR245 を用いて作出された。プラスミド PV-ZMIR245 の塩基数は 17,600bp であり、独立した T-DNA 領域と T-DNA 領域を有する。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、*Cry1A.105* タンパク質、改変 *Cry2Ab2* タンパク質及び NPT 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 MON89034 系統はプラスミド PV-ZMIR245 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。cry1A.105 遺伝子、改変 cry2Ab2 遺伝子及び npt 遺伝子のコード配列  
 及び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に純化されていること  
 プラスミド PV-ZMIR245 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。

・ トウモロコシ MON89034 系統への挿入 DNA

cry1A.105 遺伝子発現カセット	
P-e35S	プロモーター領域 ( 遺伝子の転写に必要な配列 ) 二重エンハンサー領域 ( 参考文献 17 ) を持つ、カリフラワーモザイクウイルス ( CaMV ) の 35S プロモーター ( 参考文献 15 ) と 9bp リーダー配列
L-Cab	コムギ葉緑素 a/b 結合タンパク質の 5' 末端非翻訳リーダ領域。 目的遺伝子の発現を活性化させる。 ( 参考文献 18 )
I-Ract1	イネ・アクチン遺伝子のイントロン ( 参考文献 19 ) 。目的遺伝子の発現を活性化させる。
cry1A.105	Cry1A.105 タンパク質をコードする遺伝子。
T-Hsp17	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 ) コムギ由来の熱ショックタンパク質 17.3 の 3' 末端非翻訳領域
改変 cry2Ab2 遺伝子発現カセット	
P-FMV	プロモーター領域 ( 遺伝子の転写に必要な配列 ) Figwort mosaic virus 由来の 35S プロモーター
I-Hsp70	トウモロコシ熱ショックタンパク質 70 遺伝子の第 1 イントロン ( 参考文献 20 )
TS-SSU-CTP	トウモロコシのリブローズ 1,5-二リン酸カルボキシラーゼの小サブユニットの輸送ペプチドで、第 1 イントロン配列を含む。 ( 参考文献 21 )
改変 cry2Ab2	<i>B. thuringiensis</i> 由来の改変 Cry2Ab2 タンパク質をコードする遺伝子 ( 参考文献 22 )
T-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> ) 由来のノパリン合成酵素コード配列のターミネーター領域

<i>npt</i> 遺伝子発現カセット(R1 世代以降には挿入されていない)	
T-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> )由来のノパリン合成酵素コード配列のタ - ミネーター領域
<i>npt</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(参考文献 23) ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ をコードし植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え植物を選抜するためのマーカーとして用いられる(参考文献 24)
P-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(CaMV)の 35S プロモーター領域

## 6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

プラスミド PV-ZMIR245 をアグロバクテリウム法により、デント種トウモロコシの自殖系統 LH172 に導入した後、再生個体を得た。

得られた再生個体は、カルベニシリンとパロモマイシンを含む培地に移して培養した。パロモマイシンは T-DNA 領域と T-DNA 領域のみが挿入された形質転換体を選抜するために用いられた。

選抜された細胞は選抜培地中で成植物体に再分化するまでに植え継がれ、その後、再分化個体である R0 世代を従来品種である LH172 と交配させた R1 世代から、PCR 分析により T-DNA 領域のみを持つ個体を選抜した。

その後、挿入遺伝子や *Cry1A.105* タンパク質及び改変 *Cry2Ab2* タンパク質の発現量の解析により更に選抜を進め、害虫抵抗性及び農業形質などを確認した。

## 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 PV-ZMIR245 を遺伝子導入して得られたトウモロコシ MON89034 系統のゲノム中に挿入された *cry1A.105* 遺伝子発現カセット、改変 *cry2Ab2* 遺伝子発現カセット及び *npt* 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、サザンプロット分析を行った。また、PCR 分析により挿入遺伝子及び挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端の近傍配列を決定した。

その結果、トウモロコシ MON89034 系統の染色体上の 1 箇所に 1 コピーの *cry1A.105* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry2Ab2* 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、*npt* 遺伝子発現カセット及び外骨格領域 DNA は検出されなかった。

トウモロコシ MON89034 系統における挿入遺伝子及び近傍配列の塩基配列を決定するため、7 つのプライマーセットを設定し、その増幅産物の塩基配列を決定し、これを基に挿入遺伝子の正確な構造を確認した。

挿入遺伝子の 5' 近傍配列の解析結果より、*cry1A.105* 遺伝子発現カセットの P-e35S の 5' 末端領域とそれに隣接する T-DNA 右側境界領域が相同組換えにより、T-DNA 領域内の左側境界領域と *npt* 遺伝子発現カセットの P-35S の 5' 末端領域と置き換わっていることが確認された。

しかしながら、この相同組換えはタンパク質をコードする領域中では起こっておらず、最も近

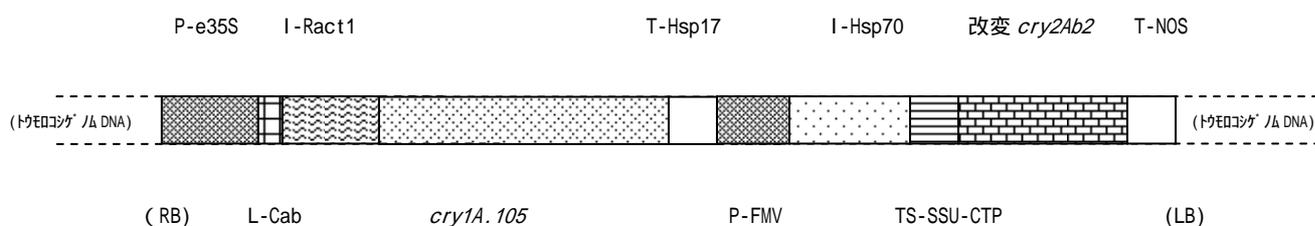
いオープンリーディングフレームである Cry1A.105 タンパク質のコード領域についても、Cry1A.105 タンパク質が、各組織で正常に発現していることが確認されていることから、この相同組換えにより、新たなオープンリーディングフレームは形成されていないと結論された。(参考文献 25)

トウモロコシ MON89034 系統の挿入遺伝子近傍配列が宿主の DNA 由来であることを確認するために、挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端の近傍配列にプライマーを設定し、組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシゲノム DNA を用いて PCR 分析を行った。その結果、組換えトウモロコシ及び非組換えトウモロコシゲノムにおいて 600bp の PCR 産物が検出された。組換えトウモロコシからも 600bp の PCR 産物が検出されたが、これは、分析に用いた組換えトウモロコシの挿入遺伝子がヘテロ接合であるため、挿入遺伝子が組み込まれていない染色体を鋳型として増幅されたものである。

非組換えトウモロコシゲノムから得られた 600bp の PCR 産物の塩基配列をトウモロコシ MON89034 系統の挿入遺伝子の近傍配列と比較したところ、非組換えトウモロコシの PCR 産物の 1-212 番目は、トウモロコシ MON89034 系統の 5' 末端近傍配列の 1,839-2,050 番目と 270-469 番目は、3' 末端近傍配列の 11,378-11,577 番目とそれぞれ一致していた。このことからトウモロコシ MON89034 系統の両末端近傍配列は、非組換えトウモロコシゲノム由来であることが確認された。(参考文献 26)

なお、非組換えトウモロコシの PCR 産物とトウモロコシ MON89034 系統の挿入遺伝子の近傍配列との比較の結果、PCR 産物の DNA 配列の 213-269 番目は形質転換の際に欠失したことが示唆されている。また、トウモロコシ MON89034 系統の 5' 末端に PCR 産物の DNA 配列と一致しない 10bp の配列が隣接していた。

・組換えトウモロコシ「トウモロコシ MON89034 系統」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

挿入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端隣接境界領域において、フレームシフトを考慮に入れたアミノ酸相同性解析を行うことにより、この領域から目的以外の毒素やアレルゲンと相同性のあるタンパク質が生産されることはないことを確認した。(参考文献 27)

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

Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 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。

2005 年に米国で行った栽培試験において、5 箇所の圃場で栽培した試料を供試し、トウモロコシ

MON89034 系統並びに対照の非組換え体の若葉、花粉、絹糸、茎葉、根部、穀粒について、ELISA 法により発現量を測定した。

トウモロコシ MON89034 系統における Cry1A.105 タンパク質の発現量の平均値は、若葉で 85  $\mu\text{g/g}$  生組織重量 (以下「FW」)、花粉で 6.4  $\mu\text{g/g}$ (FW)、絹糸で 3.0  $\mu\text{g/g}$ (FW)、茎葉で 14  $\mu\text{g/g}$ (FW)、根部で 2.2  $\mu\text{g/g}$ (FW)、穀粒で 5.1  $\mu\text{g/g}$ (FW) であった。また、改変 Cry2Ab2 タンパク質の発現量の平均値は、若葉で 29  $\mu\text{g/g}$ (FW)、花粉で 0.34  $\mu\text{g/g}$ (FW)、絹糸で 8.2  $\mu\text{g/g}$ (FW)、茎葉で 12  $\mu\text{g/g}$ (FW)、根部で 4.1  $\mu\text{g/g}$ (FW)、穀粒で 1.1  $\mu\text{g/g}$ (FW) であった。(参考文献 28)

### 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 MON89034 系統の穀粒における Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質の最大発現量は、6.0  $\mu\text{g/g}$ (FW) 及び 1.8  $\mu\text{g/g}$ (FW) であった。

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 0.5g (参考文献 29) をすべてトウモロコシ MON89034 系統に置き換えて計算すると、Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 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 3.0  $\mu\text{g}$  及び 0.9  $\mu\text{g}$  となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 70.8g (参考文献 30) に基づき、Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質が一日タンパク摂取量に占める割合を計算したところ、 $4.2 \times 10^{-6}\%$  及び  $1.3 \times 10^{-6}\%$  となる。

### 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

*cry1A.105* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*、*B. thuringiensis* var. *aizawai* はヒトに対するアレルギー誘発性の報告はない。

また、及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* はヒトに対する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

Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質が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

##### 人工胃液に対する感受性

*E. coli* で発現させた Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質を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、Cry1A.105 タンパク質における SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に検出限界未満 (検出限界値: 0.005  $\mu\text{g}$ ) になるまでに消化されたが、Cry1A.105 タンパク質由来の分解産物は試験開始後 30 秒から 20 分まで低レベルで検出され、30 分後には検出されなくなった。一方、ウエスタンブロット分析では、試験開始後 30 秒以内でその免疫応答反応性が検出限界未満 (検出限界値: 1.0ng) に消失していた。(参考文献 31)

また、改変 Cry2Ab2 タンパク質における SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に検出限界未満 (検出限界値: 0.005  $\mu\text{g}$ ) になるまでに消化されたが、改変 Cry2Ab2 タンパク質由来の分

解産物は試験開始後 30 秒まで低レベルで検出され、2 分後には検出されなくなった。一方、ウエスタンブロット分析では、試験開始後 30 秒以内でその免疫応答反応性が検出限界未満(検出限界値:0.2ng)に消失していた。(参考文献 32)

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。

#### 人工腸液に対する感受性

*E. coli* で発現させた Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質を人工腸液中で処理し、ウエスタンブロット分析を行った。

その結果、Cry1A.105 タンパク質は人工腸液中では試験開始後 5 分以内に、その免疫反応が検出限界未満(検出限界値:0.1ng)に消失していたが、Cry1A.105 タンパク質由来の分解産物が試験開始後 5 分から検出され、24 時間後も分解されなかった。(参考文献 33)

また、改変 Cry2Ab2 タンパク質は、人工腸液中では試験開始後 15 分以内に、その免疫反応が検出限界未満(検出限界値:0.5ng)に消失していたが、改変 Cry2Ab2 タンパク質由来の分解産物が試験開始後 5 分から検出され、24 時間後も分解されなかった。(参考文献 34)

#### 加熱処理に対する感受性

Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質が発現しているトウモロコシ MON89034 系統の穀粒を標準的なトウモロコシ加工条件である約 204 °C で 20 分間加熱処理した後、CAPS(3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid)緩衝液及びNLS(N-laurylsarcosine)緩衝液で個別に抽出した後、それぞれのタンパク質に特異的なポリクロナール抗体を用いてウエスタンブロット分析によって調べたところ、加熱処理後のタンパク質は、検出限界未満(検出限界値:0.25ng)であった。(参考文献 35)

#### (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

Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 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 752 のアレルゲン等からなるデータベース(GenBank, EMBL, PIR, RCSB PDB, SwissProt を含む)を用いて、80 個の連続アミノ酸配列からなる“ウインドウ”を設定し、1 アミノ酸ずつずらしながら相同性を比較した。比較は、データベース検索の標準法である FASTA 型アルゴリズム(参考文献 36,37,38,39,40)を使用した。

また、Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質について、アミノ酸配列中に抗原決定基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。

いずれの検索においても、Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質について、アレルゲン等に関するタンパク質との間に構造相同性がないことが確認された。(参考文献 41,42)

(1) ~ (4)及び前項 3 から総合的に判断し、Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 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 MON89034 系統の挿入遺伝子の後代における安定性を確認するために、7 世代のゲノム DNA をプラスミド中の導入 T-DNA 領域を 1 箇所切断する制限酵素 *Ssp* で切断し、T-DNA 領域をカバーする 6 つの混合プローブを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の各世代において、共通のバンドが確認された。(参考文献 25)

R1 世代以降の組換え体において T-DNA 領域が挿入されていないことを確認するために、T-DNA 領域をカバーする 3 つの混合プローブを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、R1 世代以降の各世代において、T-DNA 領域由来のバンドは検出されなかった。(参考文献 25)

また、トウモロコシ MON89034 系統の発現タンパク質の安定性を確認するために、6 世代についてウエスタンブロット分析を行った。その結果、全ての世代において Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質が発現していることが確認された。(参考文献 43)

更に、トウモロコシ MON89034 系統の挿入遺伝子の後代における発現の安定性と分離様式を確認するために、5 世代について PCR 分析による挿入遺伝子の存在の確認及び ELISA 法によるタンパク質の発現の確認を指標として調査した。その結果、全ての世代において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。(参考文献 43)

## 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

Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質は、他の *B. t.* タンパク質と同様に酵素活性を持たないため、宿主の代謝経路へ影響を及ぼすものでないと考えられる。

## 7 宿主との差異に関する事項

2004 年に米国の 5 圃場で栽培されたトウモロコシ MON89034 系統と非組換え体との間で、穀粒及び茎葉について、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。(参考文献 44)

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）、無機物（カルシウム、リン）を測定したところ、リンで、MON89034 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、平均値は従来商業品種の分析値の範囲内であった。(参考文献 44)

穀粒中の主要構成成分（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）脂肪酸 9 種類、アミノ酸 18 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）、ビタミン類（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）、栄養阻害物質（フィチン酸）、二次代謝産物（*p*-クマル酸、フェルラ酸）を測定したところ、ステアリン酸及びアラキジン酸でトウモロコシ MON89034 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、平均値は従来商業品種の分析値の範囲内であった。(参考文献 44)

## 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、食品医薬品庁（FDA）には 2006 年 10 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、米国農務省（USDA）には、2006 年 10 月に無規制栽培（商業栽培）のための申請を行った。

カナダ保健省(Health Canada)には、2006年11月24日、食品としての安全性審査の申請を行った。カナダ食品検査庁(CFIA)には、2006年11月24日、環境・飼料についての安全性審査の申請を行った。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)には、2006年12月14日に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。

#### 9 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON89034 系統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 MON89034 系統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事項

第2から第6までの事項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及び亜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 Cry1A.105 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たが、最大投与量(2,072mg/kg 体重)でもマウスに有害な影響は認められなかった。(参考文献 45) このタンパク質の投与量は、米国の圃場試験で収穫された当該トウモロコシの穀粒における当該タンパク質の最大発現量 6.0 µg/g(FW)と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 0.5g(参考文献 29)を基に計算すると、Cry1A.105 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 3.0 µg となり、日本人の平均体重(平成 10~12 年度国民栄養調査結果)を 53.3kg とすると、最大投与量は日本人一日に MON89034 系統から摂取することが予想される Cry1A.105 タンパク質量の 3,681 万倍に相当する。

*E. coli* で発現させた改変 Cry2Ab2 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たが、最大投与量(2,198mg/kg 体重)でもマウスに有害な影響は認められなかった。(参考文献 46) このタンパク質の投与量は、米国の圃場試験で収穫された当該トウモロコシの穀粒における当該タンパク質の最大発現量 1.8 µg/g(FW)と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 0.5g(参考文献 29)を基に計算すると、改変 Cry2Ab2 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 0.9 µg となり、日本人の平均体重(平成 10~12 年度国民栄養調査結果)を 53.3kg とすると、最大投与量は日本人一

日に MON89034 系統から摂取することが予想される改変 Cry2Ab2 タンパク質量の 13,017 万倍に相当する。

## 2. 亜急性毒性に関する試験

1 群雌雄 20 匹のラットに対し Cry1A.105 タンパク質及び改変 Cry2Ab2 タンパク質が同時に発現しているトウモロコシ MON89034 系統の穀粒粉末を、0% (W/W), 11% (W/W), 33% (W/W) の割合で混合した飼料を用いて 90 日間連続混餌投与試験を実施した。その結果、当該トウモロコシの穀粒を給餌したことに起因する死亡あるいは臨床症状、体重、摂餌量、血液学、血液生化学、尿検査値及び臓器重量の変動、臓器の肉眼的あるいは組織学的病変は認められなかった。(参考文献 47)

### 食品健康影響評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ「チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON89034 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」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。

### 参考文献

1. OECD. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites. (Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France) *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, No.6. ENV/JM/MONO(2002)25.
2. Aldrich SR, Scott WO, Hoeft RG. Modern Corn Production, Third Edition. A&L Publication, Inc., Champaign, Illinois, USA.(1986)
3. Galinat WC. The Origin of Corn. In Sprague, G.F. and Dudley, J.W., eds. Corn and Corn Improvement, Third Edition. #18 in the series Agronomy. American Society of Agronomy. Madison, WI. (1988):1-31.
4. Jugenheimer RW. Corns for special purposes and uses. *In* Corn : Improvement, Seed Production and Uses. John Wiley & Sons, New York (1976):215-233.
5. White PJ, Pollak LM. Corn as a Food Source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. *Cereal Food World*. (1995)40:756-761.
6. Tanaka LG, El-Dahr JM, Lehrer SB. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*. (2001)107:744.
7. Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Peruffo AD, 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.
8. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C, Giuffrida MG, 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.
9. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, 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.
10. 財務省貿易統計(2006) <http://customs.go.org>
  11. OECD. Consensus Document on the Biology of Zea Mays Subsp. Mays(Maize). (Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France) *Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology*, No 27. ENV/JM/MONO(2003)11.
  12. 長田武正. 日本イネ科植物図譜. 平凡社.(1989)
  13. 畑作全書 雑穀編. 農文協.(1981).
  14. Gilmer AJ, Malvar T. Broad-spectrum endotoxins. US patent 6110464, issued on August 29, 2000.
  15. Odell JT, Nagy F, Chua NH. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* (1985)313:810-812.
  16. Rogers SG. Promoter for transgenic plants. 2000. United States Patent No. 6,018,100.
  17. Kay R, Chan M, Daly M, McPherson J. Duplication of CaMV 35S promoter sequences created a strong enhancer for plant genes. *Science* (1987)236:1299-1302.
  18. Lamma G, Morelli G, Chua N. Structure and developmental regulation of a wheat gene encoding the major chlorophyll a/b-binding polypeptide. *Mol.Cell.Biol.* (1985)5:1370-1378.
  19. McElroy D, Blowers AD, Jenes B, Wu R. Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol.Gen.Genet.* (1991)231:150-160.
  20. Brown SM, Santino CG. Enhanced expression in plants. 1995. United States Patent No. 5,424,412.
  21. Matsuoka M, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Yamamoto N. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from maize. *J.Biochem.* (1987)102:673-676.
  22. Widner WR, Whitely HR. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* possess different host range specificities. *J.Bacteriol.* (1989)171:965-974.
  23. Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*19.(1982):327-336.
  24. Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* (1983)80:4803-4807.
  25. Amended Report for MSL-20072: Molecular Analysis of Corn MON89034. (*Monsanto Company*). (2006).
  26. Amended Report for MSL-20330: PCR and DNA Sequence Analysis of Conventional Corn to Examine

- the MON89034 Insertion Site. (*Monsanto Company*). (2007).
27. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in Corn MON89034: Assessment of Putative Polypeptides. (*Monsanto Company*). (2006).
  28. Assessment of the Cry1A.105 and Cry2Ab2 Protein Levels in Tissues of Insect-Protected Corn MON89034 Produced in 2005 U.S. Field Trials. (*Monsanto Company*). (2006).
  29. 厚生労働省平成 15 年国民健康・栄養調査報告. 第一出版 (2006).
  30. 平成 16 年国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省. (2006).
  31. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Cry1A.105 Protein in Simulated Gastric Fluid. (*Monsanto Company*). (2005).
  32. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Cry2Ab2 Protein in Simulated Gastric Fluid. (*Monsanto Company*). (2006).
  33. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Cry1A.105 Protein in Simulated Intestinal Fluid. (*Monsanto Company*). (2005).
  34. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Cry2Ab2 Protein in Simulated Intestinal Fluid. (*Monsanto Company*). (2006).
  35. Immunodetection of Cry2Ab2 and Cry1A.105 Proteins in Corn Grain from MON89034 Following Heat Treatment. (*Monsanto Company*). (2005).
  36. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. (1988)85:2440-2448.
  37. Wilbur WJ, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. (1983)80:726-730.
  38. Pearson WR. Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth.Enzymol*. (1990)183:63-98.
  39. Gibskov M, Devereux J. Sequence Analysis Primer. W.H. Freeman and Co., New York. (1992).
  40. Doolittle RF. Searching Through Sequence Databases. *Methods in Enzymology*. (1990)183:99-110.
  41. Bioinformatics Evaluation of the *in planta* Cry1A.105 Protein Coding Sequence in Corn MON89034: Assessment of Putative Polypeptides. (*Monsanto Company*). (2006).
  42. Bioinformatics Evaluation of the *in planta* Cry2Ab2 Protein Coding Sequence in Corn MON89034: Assessment of Putative Polypeptides. (*Monsanto Company*). (2006).
  43. Assessment of the Presence of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Proteins in Leaf and Seed Samples from Multiple Generations of MON89034 by Western Blot Analysis. (*Monsanto Company*). (2006).
  44. Amended Report for MSL-20097: Compositional Analyses of Corn Forage and Grain Collected from MON89034 Grown in 2004 U.S. Field Trials. (*Monsanto Company*). (2006).
  45. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with Cry1A.105 Protein. (*Monsanto Company*). (2005).
  46. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with Cry2Ab2 Protein. (*Monsanto Company*). (2006).
  47. A 90-day feeding study in rats with MON 89034. (*Monsanto Company*). (2007).