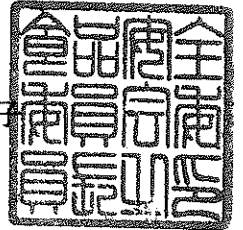




府食第267号  
平成22年4月1日

厚生労働大臣  
長妻 昭 殿

食品安全委員会  
委員長 小泉 直子



食品健康影響評価の結果の通知について

平成19年12月10日付け厚生労働省発食安第1210001号をもって貴省から当委員会に意見を求められた食品「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ3272系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ3272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ものと判断した。

# 遺伝子組換え食品等評価書

耐熱性  $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ  
3272 系統

2010年4月

食品安全委員会

## 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.....	14
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.....	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.....	16
7. 宿主との差異に関する事項.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	17
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
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	18
<参照>.....	18

### <審議の経緯>

2007年12月10日	厚生労働大臣より遺伝子組換え食品の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安第1210001号）、関係書類の接受
2007年12月13日	第219回食品安全委員会（要請事項説明）
2008年1月21日	第56回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年1月27日	第67回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年2月8日	第79回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年2月18日	第320回食品安全委員会（報告）
2010年2月18日～3月19日	国民からの御意見・情報の募集
2010年3月30日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2010年4月1日	第326回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

### <食品安全委員会委員名簿>

2009年6月30日まで

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

2009年7月1日から

小泉直子（委員長）  
見上 彪（委員長代理\*）  
長尾 拓  
野村一正  
畑江敬子  
廣瀬雅雄  
村田容常

\*：2009年7月9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名簿>

2009年9月30日まで

澤田純一（座長）  
鎌田 博（座長代理）  
五十君静信 丹生谷博  
石見佳子 飯 哲夫  
宇理須厚雄 山川 隆  
小関良宏 山崎 壮  
橘田和美 和久井信  
澁谷直人 渡邊雄一郎  
手島玲子

2009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 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

「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 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。

「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統」は、古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子に由来する改変 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子及び *Escherichia coli* K-12 株に由来するマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子を導入して作製されている。本品種は、種子中で耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼを発現することから、従来のトウモロコシ種子に混合して用いることで、従来のトウモロコシ種子のみを原料としたエタノール製造において必要とされる耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ等の添加を不要にできるとされている。

評価に供した試験成績等は、「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、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性やアレルギー誘発性、遺伝子の導入後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、植物の栄養成分や有害成分等の比較、動物を用いた毒性試験結果等に関するものである。

特に、本品種で発現する耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼのアレルギー誘発性について、構造解析の結果、一部のアミノ酸配列にアレルギー物質との構造相同性が確認されたが、IgE 結合試験により IgE 結合能を有さないことが確認された。また、遺伝子の由来である細菌に関するこれまでの知見や *in vitro* による消化性試験の結果からもアレルギー誘発性を示唆するデータがないことが確認された。

以上の結果において、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。

これらのことから「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統」については、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

## I. 評価対象食品の概要

名称：耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統  
性質：耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生性  
申請者：シンジェンタシード株式会社  
開発者：Syngenta Seeds, Inc. (米国)

「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統」(以下「トウモロコシ 3272」という。)は、古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子に由来する改変 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (*amy797E* 遺伝子) を導入して作製されており、種子中で耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ (AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ) を発現する。本品種は、トウモロコシ種子を利用したエタノールの製造を主目的として開発された品種で、従来のトウモロコシ種子に混合して用いることで、従来のトウモロコシ種子のみを原料とした場合に必要とされる $\alpha$ -アミラーゼの添加を不要にできるとされている。

なお、トウモロコシ 3272 には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子 (*pmi* 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 3272 に導入された遺伝子のうち、*amy797E* 遺伝子の供与体は、古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌である (参照 1)。また、*pmi* 遺伝子の供与体は、*E. coli* K-12 株である。

##### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

トウモロコシ 3272 に挿入された *amy797E* 遺伝子は、耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼである AMY797E  $\alpha$ -アミラーゼを発現する。また、*pmi* 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 (参照 2)、マンノースリン酸イソメラーゼ (PMI タンパク質) を発現する。

挿入 DNA は、導入用ベクター pNOV7013 を用いてアグロバクテリウム法により宿主に導入した。

#### 2. 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシは、世界的に古くから食品として利用された歴史がある。今日、トウモロコシから食用油、コーンスターチ、コーングリッツ等が製造され、広く

食品として利用・摂取されている（参照 3）。

### 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

トウモロコシの種子中の主要栄養素の含有組成量（対乾燥重量）は、タンパク質 6.0～15.0%、脂質 1.7～5.8%、総食物繊維 11.1～25.6%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 74.3～89.5%である（参照 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

トウモロコシの種子中の栄養阻害物質組成（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.29～1.29%、ラフィノース 0.04～0.31%、トリプシンインヒビター 1.1～7.18TIU<sup>a</sup>/mg である（参照 8）。

### 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 3272 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 3272 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 3272 は、トウモロコシ種子を利用したエタノールの製造において、 $\alpha$ -アミラーゼの添加を不要にするために開発された品種である。また、従来のトウモロコシ種子と同様な用途に利用されることも想定されるが、いずれにおいても、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

(3) に記載の用途に利用される場合においても、トウモロコシ 3272 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 3272 は、*amy797E* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の導入により、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI タンパク質が発現することが、宿主との相違

---

<sup>a</sup> TIU : Trypsine Inhibitor Unit



点である。

## 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 3272 は、導入された *amy797E* 遺伝子により種子中に耐熱性  $\alpha$ -アミラーゼである AMY797E $\alpha$ -アミラーゼが発現する。本品種は、トウモロコシ種子を利用したエタノールの製造を主目的として開発された品種で、従来のトウモロコシ種子にトウモロコシ 3272 を混合して用いることで、従来のトウモロコシ種子のみを原料とした場合に必要とされる耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ等の添加を不要に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

宿主は、イネ科トウモロコシ属トウモロコシ (*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

トウモロコシの遺伝的先祖についての決定的な説はないが、育種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 9）。トウモロコシは、アメリカ大陸から世界各地へと普及し、世界各地で栽培されている（参照 10）。

### 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、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 11）。

### 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わずかであり、トウモロコシが主要なアレルギー誘発性食品とは考えられていない（参照 12）。

### 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（参照 13）、これらのウイルス等のヒトへの病原性は知られていない。

### 6. 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは、食用油、コーンスターチ、コーングリッツ等、広く食品として利用され、摂取されている（参照 3）。

### 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プサクム属があるが、これらについての有害生理活性物質の報告はない（参照 7,9）。

## 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 3272 の作出に使用した導入用ベクター pNOV7013 の構築には、プラスミド pNOV2114 を用いた。

### 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

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

プラスミド pNOV2114 の制限酵素による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、*E. coli* のトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が含まれており、この遺伝子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 14）。なお、*aadA* 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、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 3272 に導入された遺伝子のうち、*amy797E* 遺伝子は、古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌の 3 個の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子 (BD5031、BD5064 及び BD5063) を基にキメラ的改変により作製した改変  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子である。なお、BD5031 及び BD5064 は、*Thermococcales* 目 *Thermococcus* 属の細菌から構築した DNA ライブラリーより単離したものである。また、BD5063 は、深海の集積培養物から構築した DNA ライブラリーより単離したものであり、既知の  $\alpha$ -アミラーゼとのアミノ酸配列相同性より *Thermococcales* 目の *Pyrococcus* 属又は *Thermococcus* 属の細菌由来であることが確認されている。

*pmi* 遺伝子は、*E. coli* K-12 株のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子である。

(2) 安全性に関する事項

*amy797E* 遺伝子の供与体である古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌は、ヒトに対する食経験はないが、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼと相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされていない（参照 15 及び 2. (3)）。

*pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* は、自然界やヒトの消化器官に広く存在してい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 株が原因の病害は報告されていない。

**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

*amy797E* 遺伝子は、古細菌 *Thermococcales* 目の好熱菌の3個の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子（BD5031、BD5063、BD5064）から、それぞれ約150bpの9つの領域断片を調製し、 $\alpha$ -アミラーゼ活性が高まるように各領域断片を組み合わせ、さらにトウモロコシ由来の $\gamma$ -ゼインシグナル配列及び小胞体残留シグナル配列をそれぞれN-末端とC-末端に付加することにより構築されたものである。

*pmi* 遺伝子は、*E. coli* K-12株からクローニングされたPMIタンパク質を発現する遺伝子である。

(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DNA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

・ *amy797E* 遺伝子

*amy797E* 遺伝子が発現する AMY797E $\alpha$ -アミラーゼは、高温で高い活性を示すことが確認されている（参照 16）。 $\alpha$ -アミラーゼは、デンプンの構成成分であるアミロース及びアミロペクチンの 1,4- $\alpha$ -グリコシド結合を不規則に開裂し、デンプンからデキストリン、マルトース及びグルコースへの加水分解を触媒する酵素であり（参照 17）、多くの植物や動物を含めた真核生物や原核生物に幅広く存在が認められている。

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼと既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースを用いて blastp 検索を行ったところ、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 15）。

また、トウモロコシ 3272 から抽出した AMY797E $\alpha$ -アミラーゼを用いてマウス（1群雌雄各5匹）における急性毒性試験（投与量：1,511mg/kg 体重）を行った結果、投与に関連した異常は認められなかった（参照 45 及び第 7）。

なお、さまざまな細菌に由来する $\alpha$ -アミラーゼが広く食用として利用されており、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼのアミノ酸配列と 93%の相同性を有する $\alpha$ -

アミラーゼが米国において安全性が確認されている。

・ *pmi* 遺伝子

*pmi* 遺伝子は PMI タンパク質を発現する性質を利用して、トウモロコシ 3272 の作出において形質転換体の選択マーカー（参照 2）として用いられた。トウモロコシを含む多くの植物細胞は、マンノースを炭素源として利用して生育することはできないが、*pmi* 遺伝子の導入によって PMI タンパク質を産生する細胞は、マンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換して生長することができるため、炭素源としてマンノースを培地に添加することによって、形質転換体の選抜が可能となる。

PMI 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について確認するために、NCBI データベースを用いて blastp 検索を行ったところ、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 18）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用ベクター pNOV7013 の T-DNA 領域の外骨格領域には、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 *aadA* 遺伝子が含まれているが、トウモロコシ 3272 のゲノムには挿入されていない。

### 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

*amy797E* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシの貯蔵タンパク質 (*zein*) 遺伝子由来のプロモーター配列（参照 19）である。

*pmi* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第一イントロン領域までを含むプロモーター配列（参照 20）である。

(2) ターミネーターに関する事項

*amy797E* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA 由来のポリアデニル化シグナルを含む配列（参照 21）である。

*pmi* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のポリアデニル化配列（参照 22）である。

(3) その他

*amy797E* 遺伝子発現カセットには、トウモロコシ 3272 種子における AMY797E $\alpha$ -アミラーゼの発現を安定的に高めるため、*amy797E* 遺伝子の下流にトウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン #9 配列（参照 23）が挿入されている。

#### 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pNOV2114 に *pmi* 遺伝子発現カセットを導入し、次いで *amy797E* 遺伝子発現カセットを導入することにより、導入用ベクター pNOV7013 を得た (参照 24)。

#### 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

導入用ベクター pNOV7013 の塩基数は 11,439bp であり、その塩基配列及び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導入用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

導入用ベクター pNOV7013 の T-DNA 領域に、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、導入用ベクター pNOV7013 の右側境界 (RB) から左側境界 (LB) までの T-DNA 領域である。

##### (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

導入用ベクター pNOV7013 の T-DNA 領域内の各要素はすべて純化されており、目的外の遺伝子の混入はない。

表1 トウモロコシ 3272 系統への挿入 DNA

<i>amy797E</i> 遺伝子発現カセット	
Right Border	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン由来の T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片
GZein プロモーター	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) トウモロコシの貯蔵タンパク質 ( <i>zein</i> ) 遺伝子由来のプロモーター配列
<i>amy797E</i> 遺伝子	古細菌 <i>Thermococcales</i> 目の好熱菌の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を基にキメラ的改変により作製した AMY797E $\alpha$ -アミラーゼをコードする遺伝子
PEPC イントロン #9	(遺伝子の発現を高める配列) トウモロコシのホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ遺伝子由来のイントロン #9 配列

35S ターミネーター	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） カリフラワーモザイクウイルスの 35SRNA 由来のポリアデニル化シグナルを含む配列
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
Zm UbiInt プロモーター	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） トウモロコシのポリユビキチン遺伝子由来の第 1 イントロン領域を含むプロモーター配列
<i>pmi</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> K-12 株由来の PMI タンパク質をコードする遺伝子
NOS ターミネーター	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> 由来のノパリンシンターゼ遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む配列
Left Border	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) のノパリン由来の T-DNA 領域の左側境界配列を含む DNA 断片

## 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を用いて *amy797E* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域を宿主トウモロコシの未熟胚に導入した後（参照 2）、マンノースを添加した培地で再生個体を得た。得られた再生個体について PCR 分析を行い、挿入遺伝子が導入されていることを確認した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスにしたがってトウモロコシ 3272 を得た。

### 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 3272 のゲノムに挿入された *amy797E* 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットのコピー数及び完全性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、それぞれの遺伝子発現カセットが完全な形で 1 コピー挿入されていることが確認された（参照 25）。

また、トウモロコシ 3272 に挿入された DNA 領域の塩基配列を決定し、導入用ベクター pNOV7013 の T-DNA 領域と塩基配列を比較した。その結果、5' 末端境界領域側の 23bp 及び 3' 末端境界領域の 7bp を欠失していたが、2 つの遺伝子発現カセットは完全であることが確認された（参照 25）。

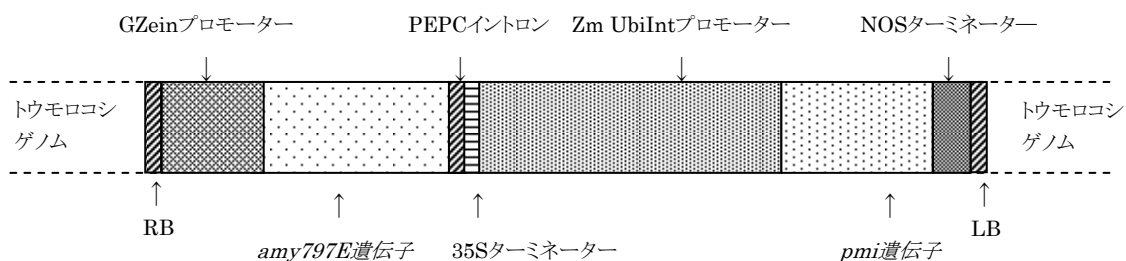
導入用ベクター pNOV7013 の外骨格領域が導入されていないことを確認するために、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は導入されていないことが確認された（参照 25）。

挿入 DNA の近傍配列がトウモロコシゲノム由来であることを確認するため、トウモロコシ 3272 の塩基配列に基づいて、5' 末端近傍配列、挿入遺伝子及び 3' 末端近傍配列にプライマーを設計し、トウモロコシ 3272 及び非組換えトウモロコシを用いて PCR 分析を行った。その結果、挿入遺伝子及び 3' 末端近傍配列

のプライマー対を用いた PCR では、トウモロコシ 3272 のみに特異的な PCR 産物が増幅された。一方、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列のプライマー対を用いた PCR では、非組換えトウモロコシ及び挿入遺伝子がヘテロ接合型のトウモロコシ 3272 に特異的な PCR 産物が増幅されたことから、近傍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 26）。

また、遺伝子挿入によってトウモロコシ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 (1,000bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000bp) について、それぞれ NCBI (nr) データベースを対象に blastx 分析による相同性検索を行った結果、トウモロコシのタンパク質は見いだされなかったことから、既存のトウモロコシ内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた（参照 27）。

・トウモロコシ 3272 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 DNA と 5'末端近傍配列 (1,000bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000bp) 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、InforMax の Vector NTI (version 9.0) ソフトウェアを用いて、6つの読み枠において、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF について分析した結果、7 個の ORF が検出された（参照 27）。

検出された ORF について、NCBI (nr) データベースを用いて、blastp 検索を行った結果、既知の毒性タンパク質やアレルゲンと相同性を示すものは見いだされなかった。さらに、Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) を用いて、80 個以上の連続するアミノ酸配列を有する 1 個の ORF については 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンとの相同性及び抗原決定基の存在の可能性を確認するために、すべての ORF について連続する 8 アミノ酸との相同性について検索を行った結果、相同性を示すものは見いだされなかった（参照 27）。

5'末端近傍配列 (1,000bp) 及び隣接する挿入領域 (90bp) 並びに 3'末端近傍配列 (1,000bp) 及び隣接する挿入領域 (90bp) について、それぞれ NCBI (nr) データベースを対象に blastx 検索を行った結果、既知のアレルゲンや毒性タン

パク質と相同性を示すものは見いだされなかった（参照 27 及び（1））。

## 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 3272 の葉、根、種子、花粉及び全植物体における AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI タンパク質の発現量を ELISA 法により分析した。結果は表 2 のとおりである（参照 28）。

表 2 トウモロコシ 3272 における AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI タンパク質の発現量（単位は $\mu\text{g/g}$  乾燥重）

分析組織*	AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ	PMI タンパク質
葉	定量限界以下	定量限界以下～17.1
根	定量限界以下	1.0～5.3
種子	1,004～3,365	0.5～1.8
花粉	検出限界以下	17.0～18.2
全植物体	検出限界以下～668	2.2～8.8

\* 葉、根及び全植物体は生育期から収穫期、種子は乳熟期から収穫期、花粉は開花期の値を示した。

\* AMY797E $\alpha$ -アミラーゼの定量限界は 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、検出限界は 0.02 $\mu\text{g/g}$ 、PMI タンパク質の定量限界は 0.30 $\mu\text{g/g}$

## 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 0.5g（参照 29）をすべてトウモロコシ 3272 に置き換えて AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ 1,683 $\mu\text{g}$ 、0.9 $\mu\text{g}$  となり、1 人 1 日当たりのタンパク質平均摂取量 70.8g（参照 29）に占める割合は、それぞれ  $2.0 \times 10^{-5}$ 、 $1.0 \times 10^{-8}$  となる。したがって、一日タンパク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

*amy797E* 遺伝子の供与体である *Thermococcales* 目の *Thermococcus* 属及び *Pyrococcus* 属の細菌がアレルギー誘発性のあるタンパク質を生産することは知られていない。また、*pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株は、細菌であり、今日、細菌にアレルギー誘発性があるとは考えられていない（参照 30, 31）。

### (2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI 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



- ・ AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ

トウモロコシ 3272 から抽出した AMY797E $\alpha$ -アミラーゼの人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った結果、いずれの方法においても試験開始後 5 分以内に消化された(参照 32)。

- ・ PMI タンパク質

*E. coli* で発現させた PMI タンパク質の人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 法により分析を行った結果、試験開始直後から 2 分以内に消化された(参照 33)。

② 人工腸液に対する感受性

- ・ AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ

トウモロコシ 3272 から抽出した AMY797E $\alpha$ -アミラーゼの人工腸液中での消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った結果、いずれの方法においても試験開始後 60 分を経過しても消化されなかった(参照 34)。

- ・ PMI タンパク質

*E. coli* で発現させた PMI タンパク質の人工腸液中における消化性を SDS-PAGE 法により分析を行った。その結果、10 分の 1 のパンクレアチン濃度では、試験開始後 30 分以内に消化された(参照 33)。

③ 加熱処理に対する感受性

- ・ AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼは耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼであり、高温条件下で高い活性を示すことが確認されているため(参照 16)、加熱処理に対する感受性の確認は行われていない。

- ・ PMI タンパク質

*E. coli* で発現させた PMI タンパク質の加熱処理に対する感受性について、ELISA 法により分析した結果、95°C、30 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 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

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI タンパク質のアミノ酸配列について、アレルゲンとの構造相同性を確認するために、SBI Allergen Database を用いて相同性検索を行った。その結果、80 個以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を有するアミノ酸配列は見いだされなかった(参照 36, 37)。

また、抗原決定基の存在を確認するために、SBI Allergen Database を用いて 8 個の連続アミノ酸との相同性検索を行った。その結果、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼと相同性のある配列がワモンゴキブリ(*Periplaneta Americana*)の Per a 3.01 に見いだされ、PMI タンパク質と相同性のある配列がカエルの一種

(*Rana species* CH2001)の $\alpha$ -パルブアルブミンに見いだされた(参照 36, 37)。

#### (5) 遺伝子産物 (タンパク質) の IgE 結合能の検討

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼとワモンゴキブリ由来の Per a 3.01 感受性患者の血清中 IgE との結合能の検討を行った結果、酵母で発現させた Per a 3.01 との交叉反応は認められなかった(参照 38)。

PMI タンパク質と *Rana species* CH2001 由来の $\alpha$ -パルブアルブミン感受性患者の血清中 IgE との結合能の検討を行った結果、交叉反応は認められなかった(参照 37)。

上記、(1)～(5)及び前項3から総合的に判断し、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼ及び PMI 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 3272 における挿入遺伝子の分離様式を確認するために、4 世代のトウモロコシ 3272 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、挿入遺伝子は、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 26)。

また、後代における挿入遺伝子の安定性を確認するために、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 39)。

### 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

AMY797E $\alpha$ -アミラーゼは、種子で産生されて小胞体中に蓄積される。一方、種子中のデンプンは、小胞体とは異なる細胞内器官であるアミロプラスト中で合成・蓄積される(参照 40,41,42,43)ことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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 44)ことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

### 7. 宿主との差異に関する事項

2003 年及び 2004 年に米国の 6 カ所の圃場で栽培されたトウモロコシ 3272 と非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、ミネラル、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、2 次代謝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 8)。

#### (1) 主要構成成分

種子及び茎葉の主要構成成分(水分、タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、

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、デンプン（種子のみ））について分析したところ、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の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル成分

種子及び茎葉のミネラル成分（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、セレン（種子のみ））について分析したところ、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の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(3) ビタミン類

種子のビタミン類 10 種類について分析したところ、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の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(4) アミノ酸組成

種子のアミノ酸 18 種類について分析したところ、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の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(5) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 5 種類について分析したところ、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かった。

(6) 2 次代謝産物及び栄養阻害物質

種子の 2 次代謝物及び栄養阻害物質（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、フェルラ酸、p-クマル酸）について分析したところ、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の分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

## 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、米国食品医薬品庁（FDA）に食品・飼料としての安全性確認の申請を行い、2007 年 8 月に問題がないことが確認された。また、2005 年 10 月に米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請を行った。

カナダにおいては、カナダ保健省（HC）に食品としての安全性審査の申請を行い、2008 年 3 月に承認を得た。

EU においては、2006 年 2 月に欧州食品安全機関（EFSA）に対して食品・飼料としての輸入のための申請を行った。

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

ーランド食品基準機関(FSANZ)に対して食品としての安全性審査の申請を行い、2008年3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 3272 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 3272 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5の2(3)に係る安全性の確認のため、AMY797E $\alpha$ -アミラーゼの急性毒性試験の確認を行った(参照45)。

マウス(1群雌雄各5匹)にトウモロコシ3272から抽出したAMY797E $\alpha$ -アミラーゼを1,511mg/kg体重の用量で単回強制経口投与し、その後15日間観察した。その結果、臨床観察、体重、摂餌量、血液、器官重量、剖検及び病理組織学的検査において、披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

「耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼ産生トウモロコシ3272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ものと判断した。

#### <参照>

- 1 Richardson, T.H., X. Tan, G. Frey, W.Callen, M. Cabell, D. Lam, J. Macomber, J.M. Short, D.E. Robertson and C. Miller, A novel, high performance enzyme for starch liquefaction. Discovery and optimization of a low pH, thermostable alpha-amylase. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277:26501-26507.
- 2 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A.R.Wenck and G. Hansen. The use of phosphomannose isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Rep.*, 2000; 19: 798-803.
- 3 菊池一徳. トウモロコシの生産と利用. 光琳. 1987.
- 4 OECD Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Publication No.6, 2002. ENV/JM/MONO (2002) 25.

- 5 ILSI. International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 2.0. 2004. <http://www.cropcomposition.org>.
- 6 USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16-1. , 2004. [http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list\\_nut\\_edit.pl](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl).
- 7 Watson, S.A. Structure and Composition. In Corn: Chemistry and Technology. S.A. Watson and P.E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota, 1987.
- 8 Compositional Analysis of Grain and Forage from Transgenic Maize 3272 with an Introduced Alpha-Amylase (AMY797E) Enzyme. (社内報告書)
- 9 Galinat, W.C. The origin of corn. In: Corn and corn improvement. G.F Sprague and J.W. Dudley, Eds. Agronomy Monographs, American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin, 1988; 18: 1-31.
- 10 農学大事典. 野口弥吉, 川田信一郎監修. 養賢堂, 1994.
- 11 White, P.J. and L.M. Pollak. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Product, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World*, 1995; 40: 756-762.
- 12 Frisner, H., A. Rosendal and V. Barkholt. Identification of immunogenic maize proteins in a casein hydrolysate formula. *Pediatric Allergy Immunol.*, 2000; 11: 106-110.
- 13 OECD (2003) CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF ZEA MAYS SUBSP. MAYS (MAIZE). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.27. [Env/JM/MONO\(2003\)11](#).
- 14 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 1985; 13: 7095-7106.
- 15 AMY797E: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 16 Characterization of the Temperature Optimum of AMY797E  $\alpha$ -Amylase for Dry Grind Fuel Ethanol Production. (社内報告書)
- 17 Van der Maarel, M.J.E.C., B. van der Veen, J.C.M. Uitdehaag, H. Leemhuis and L. Dijkhuizen Properties and application of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J. Biotechnol.*, 2002; 94: 137-155.
- 18 Phosphomannose Isomerase Protain: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社内報告書)
- 19 Das, O., K. Ward, S. Ray and J. Messing. Sequence variation between alleles reveals two types of copy correction at the 27-kDa zein locus of maize. *Genomics*, 1991; 11: 849-856.
- 20 Christensen, A.H., R.A. Sharrock and P.H. Quail. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.*, 1992; 18:675-689.

- 21 Franck, A., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards and L. Hirth Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 1980; 21: 285-294.
- 22 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genetics*, 1982; 1: 561-573.
- 23 Matsuoka, M. and E. Minami. Complete structure for the gene phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. *Eur. J. Biochem.*, 1989; 181: 593-598.
- 24 Description of the Vector Lineage Leading to the Final Vector, pNOV7013, Used in the Transformation Resulting in Maize Event 3272. (社内報告書)
- 25 Additional Molecular Characterization of Event 3272 Maize by Southern Analyses. (社内報告書)
- 26 Protocol for PCR Assay for the Determination of Zygosity of the Transgenic Corn Event 3272. (社内報告書)
- 27 Sequence Found between Stop Codons spanning the Maize Genomic Sequence and Transgenic Insert Junction in Event 3272 Maize: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known and Putative Allergens and BLASTX Analysis of Maize Genomic Flanking Sequence. (社内報告書)
- 28 Quantification of AMY797E and PMI Proteins in Transgenic Maize (Corn) Tissues and Whole Plants Derived from Event 3272. (社内報告書)
- 29 厚生労働省 平成 16 年国民健康・栄養調査報告. 健康・栄養情報研究会編. 第一出版. 2006.
- 30 Taylor, S.L. and S. Hefle Will genetically modified foods be allergenic? *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001; 107: 765-771.
- 31 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.
- 32 *In vitro* Digestibility of AMY797E  $\alpha$ -Amylase (Test Substance AMY797E - 0104) Under Simulated Mammalian Gastric Condition. (社内報告書)
- 33 *In vitro* Digestibility of PMI Protein under Simulated Mammalian Gastric and Intestinal Conditions. (社内報告書)
- 34 *In vitro* Digestibility of AMY797E  $\alpha$ -Amylase (Test Substance AMY797E-0104) Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
- 35 Effects of Temperature on the Stability of Phosphomannose Isomerase (PMI) from Test Substance PMI-0198. (社内報告書)
- 36 AMY797E Protein as Expressed in Transgenic Maize Event 3272: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内

- 報告書)
- 37 Phosphomannose Isomerase: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Allergens. (社内報告書)
  - 38 Specific serum IgE screening of AMY797E  $\alpha$ -Amylase using sera from cockroach allergic patients. (社内報告書)
  - 39 Pedigree Southern Analysis of Grain and Forage from Transgenic Maize Event 3272 with an Introduced Alpha-Amylase (AMY797E) Enzyme. (社内報告書)
  - 40 Galili1, G.,C. Sengupta-Gopalan and A. Ceriotti. The endoplasmic reticulum of plant cells and its role in protein maturation and biogenesis of oil bodies. *Plant Mol. Biol.*, 1998; 38: 1-29.
  - 41 French, D. Organization of Starch Granules. In: Starch Chemistry and Technology. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Paschall, E.F. Eds; Academic Press, Orlando, Florida, 1984; 183-247.
  - 42 Martin, C. and Smith, A.M. Starch Biosynthesis. *Plants Cell*, 1995; 7: 971-985.
  - 43 生化学辞典第3版. 今堀和友, 山川民夫監修. 東京化学同人. 1998; 887.
  - 44 Freeze, H.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.
  - 45 AMY797E-0104: Single Dose Oral Toxicity Study in the Mouse. (社内報告書)