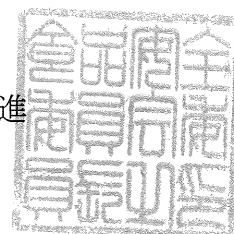




府食第67号
平成25年1月28日

厚生労働大臣
田村 憲久 殿

食品安全委員会
委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成23年7月12日付け厚生労働省発食安0712第1号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 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。また、本件に関して行った国民からの御意見・情報の募集において、貴省に関する御意見・情報が別添のとおり寄せられましたのでお伝えします。

記

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 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。

遺伝子組換え食品等評価書

コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ
Event5307 系統

2013年1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.....	8
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	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	17
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項	17
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＞

- 2011年7月12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0712第1号）、関係書類の接受
- 2011年7月14日 第390回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2011年7月27日 第93回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2012年9月19日 第108回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2012年10月29日 第451回食品安全委員会（報告）
- 2012年10月30日から11月28日まで 国民からの御意見・情報の募集
- 2013年1月24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に報告
- 2013年1月28日 第461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＞

2012年6月30日まで	2012年7月1日から
小泉直子（委員長）	熊谷 進（委員長）
熊谷 進（委員長代理）	佐藤 洋（委員長代理）
長尾 拓	山添 康（委員長代理）
野村一正	三森国敏（委員長代理）
畑江敬子	石井克枝
廣瀬雅雄	上安平冽子
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＞

2011年9月30日まで		2011年10月1日から	
澤田純一（座長）		澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）		鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	澁谷直人	五十君静信	手島玲子
石見佳子	手島玲子	宇理須厚雄	中島春紫
海老澤元宏	中島春紫	橘田和美	飯 哲夫
小関良宏	飯 哲夫	児玉浩明	和久井信
橘田和美	山崎 壮	澁谷直人	
児玉浩明	和久井信		

要 約

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 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実施した。

本系統は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列を基に作製されたキメラ遺伝子である改変 *cry3.1Ab* 遺伝子を導入して作出されており、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統には、選択マーカーとして *Escherichia coli* K-12 株に由来するマンノースリン酸イソメラーゼ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、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、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、植物の栄養成分及び有害成分等の比較の結果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、「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 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：コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統

性質：コウチュウ目害虫抵抗性

申請者：シンジェンタジャパン株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates (スイス)

「コウチュウ目害虫抵抗性トウモロコシ Event5307 系統」（以下「トウモロコシ Event5307」という。）は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* 遺伝子 (*mcry3A* 遺伝子) 及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列を基に作製したキメラ遺伝子である改変 *cry3.1Ab* 遺伝子 (*ecry3.1Ab* 遺伝子) を導入して作出されており、eCry3.1Ab タンパク質を発現することで、コウチュウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。なお、トウモロコシ Event5307 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

ecry3.1Ab 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* であり、*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

ecry3.1Ab 遺伝子は eCry3.1Ab タンパク質を発現し、コウチュウ目害虫に対して殺虫活性を示す。また、*pmi* 遺伝子はマンノースリン酸イソメラーゼ (PMI タンパク質) を発現し、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられた。

ecry3.1Ab 遺伝子及び *pmi* 遺伝子は、導入用プラスミド pSYN12274 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てきた歴史がある。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。

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）穀粒中の主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 6.2～17.3%、総脂質 1.7～5.9%、総食物繊維 9.0～35.3%、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（デント種）穀粒中の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.111～1.57%、ラフィノース 0.020～0.320%、フルフラール 0.0003～0.000634%、*p*-クマル酸 0.0053～0.0576%、フェルラ酸 0.0292～0.3886%、トリプシンインヒビター 1.09～7.18 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 Event5307 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 Event5307 の可食部位は、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 Event5307 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 Event5307 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

宿主と従来品種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 Event5307 は、*ecry3.1Ab* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子の導入により、eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質を発現することが宿主との相違点で

^a TIU : Trypsin Inhibitor Unit

ある。

以上、1～6により、トウモロコシ Event5307 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

トウモロコシ Event5307 は、導入された *ecry3.1Ab* 遺伝子が eCry3.1Ab タンパク質を発現することにより、コウチュウ目害虫の影響を受けずに成育することができることとされている。

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、育種過程で近縁野生種であるブタモロコシから派生した説が有力とされている。トウモロコシはその後の新大陸の発見に伴い、アメリカ大陸からヨーロッパ、アジア及びアフリカへと普及し、現在、世界的に栽培されている。

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、ヒトの健康に悪影響を与えるレベルの有害生理活性物質の産生は知られていない（参照 3）。

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、トウモロコシは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 4）。

トウモロコシの Lipid Transfer Protein (LTP) と呼ばれる分子量 9 kDa の膜輸送タンパク質及び 50kDa のタンパク質がアレルゲンとして作用することを示唆する報告がある（参照 5,6）。

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、細菌及び糸状菌が原因の各種病害が知られているが（参照 7）、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、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。

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、いずれも野生種であり食用にされることはなく、また、これらについて有害生理活性物質の報告もない（参照 8,9）。

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

導入用プラスミド pSYN12274 の構築には、プラスミド pNOV2114 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

プラスミド pNOV2114 の全塩基数は 5,760 bp であり、その塩基配列は明らかとなっている（参照 10）。

(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* 由来の *spec* (*aadA*) 遺伝子が含まれている。この遺伝子によって、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対する耐性が付与される（参照 11）。なお、*spec* 遺伝子は、宿主ゲノムには挿入されていない。

(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

ecry3.1Ab 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* 及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* であり、*pmi* 遺伝子の供与体は、*E. coli* K-12 株である。

(2) 安全性に関する事項

ecry3.1Ab 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* 及び *B.*

thuringiensis ssp. *kurstaki* が属する *B. thuringiensis* は、微生物農薬の基材として長期にわたり安全に利用されており、ヒトや動物に対する病原性は報告されていない。

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 株にはヒトに影響を与えるような量の毒性物質を生産する能力はないことが報告されていることから（参照 12）、ヒトや動物に対して病原性を持たないと考えられる。

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

ecry3.1Ab 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* に由来する改変 *cry3A* (*mcry3A*) 遺伝子及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する *cry1Ab* 遺伝子を基に作製されたキメラ遺伝子である。*mcry3A* 遺伝子は、標的害虫に対する抵抗性を高めるために、Cry3A タンパク質の N 末端から 155～157 番目のバリン-セリン-セリンに相当する 3 個のアミノ酸配列が、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 個のアミノ酸となるように、塩基配列が改変されている。*ecry3.1Ab* 遺伝子は、*mcry3A* 遺伝子のドメイン I 領域、ドメイン II 領域及びドメイン III の一部領域と *cry1Ab* 遺伝子のドメイン III 領域以降を融合することにより作製された。

pmi 遺伝子は、*E. coli* K-12 株からクローニングされたマンノースリン酸イソメラーゼを発現する *manA* 遺伝子である（参照 13）。

挿入 DNA の構成要素は表 1 のとおりである。

(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

・ *ecry3.1Ab* 遺伝子

ecry3.1Ab 遺伝子がコードする eCry3.1Ab タンパク質は、mCry3A タンパク質及び Cry1Ab タンパク質から作製されたタンパク質である。eCry3.1Ab タンパク質は mCry3A タンパク質と同様に、標的のコウチュウ目昆虫に摂取されると、昆虫の中腸に作用し、中腸上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されている。

eCry3.1Ab 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 検索を行った結果、*B. thuringiensis* 由来の δ -エンドトキシン及びパラスポリンに分類されるタ

ンパク質を除き相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 14）。パラスポリンは *in vitro* でがん細胞に対して細胞死活性を持つが、ヒトやほ乳類に毒性を持つという報告はない（参照 15, 16, 17）。また、eCry3.1Ab タンパク質の細胞毒性試験を行った結果、ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞に対する毒性は認められなかった（参照 18 及び第 7）。

・ *pmi* 遺伝子

pmi 遺伝子がコードする PMI タンパク質は、トウモロコシ Event5307 の作出において形質転換体の選択マーカーとして用いられている（参照 19）。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 タンパク質を産生し、マンノースを生育に利用可能なフルクトース-6-リン酸に変換することができることから、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、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 20）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pSYN12274 には、選抜のために抗生物質耐性マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子が組み込まれているが、トウモロコシ Event5307 には導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（参照 21）。

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

ecry3.1Ab 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーターである（参照 22）。*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プロモーターである（参照 23）。

(2) ターミネーターに関する事項

ecry3.1Ab 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、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーターである（参照 24）。

(3) その他

上記のプロモーター及びターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は導入されていない。

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 *ecry3.1Ab* 遺伝子発現カセットを導入することにより、導入用プラスミド pSYN12274 を得た（参照 25）。

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 pSYN12274 の塩基数は 11,769 bp 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（参照 25）。

(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 pSYN12274 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 (参照 25)。

(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、プラスミド pSYN12274 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

導入用プラスミド pSYN12274 は、その T-DNA の外骨格領域に選択マーカー遺伝子として *spec* 遺伝子を有しており、ベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

表 1 トウモロコシ Event5307 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
RB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 領域の右側境界配列を含む DNA 断片
<i>ecry3.1Ab</i> 遺伝子発現カセット	
CMP プロモーター	プロモーター領域 Cestrum yellow leaf curing virus 由来のプロモーター
<i>ecry3.1Ab</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の <i>mcry3A</i> 遺伝子及び <i>cry1Ab</i> 遺伝子から作製され、eCry3.1Ab 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 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーター

<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	プロモーター領域 トウモロコシのポリキュビキチン遺伝子由来のプロモーター
<i>pmi</i> NOS ターミネーター	<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 ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリンシンターゼ遺伝子由来のターミネーター
LB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 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

ecry3.1Ab 遺伝子発現カセット及び *pmi* 遺伝子発現カセットを、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入した後、マンノースを添加した培地で選抜して再生個体を得た。得られた個体について PCR 分析を行い、挿入遺伝子の存在を確認した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスに従って、既存の優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配又は自殖を行い、トウモロコシ Event5307 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 Event5307 のゲノムに挿入された *ecry3.1Ab* 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、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 1 コピー挿入されていることが確認された (参照 21)。

導入用プラスミド pSYN12274 の外骨格領域が導入されていないことを確認するため、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 21)。

トウモロコシ Event5307 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pSYN12274 の T-DNA 領域と比較した結果、5'末端側の 28 bp 及び 3'末端側の 8 bp の欠損並びに CMP プロモーター上流の非翻訳領域の 1 か所に塩基置換が確認された (参照 26)。

挿入遺伝子の近傍配列がトウモロコシ由来であることを確認するため、5'末端近傍配列 (1,000 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) の塩基配列を決定し、宿主ゲノムの塩基配列と比較した。その結果、遺伝子の挿入に伴う 33 bp の欠失を除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主のゲノムの塩基配列は一致していたことから、挿入遺伝子の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 27)。

遺伝子挿入によりトウモロコシ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 (1,000 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,000 bp) について、公的に利用できるタンパク質データベース (NCBI データベース)

を用いて *blastx* 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 28）。

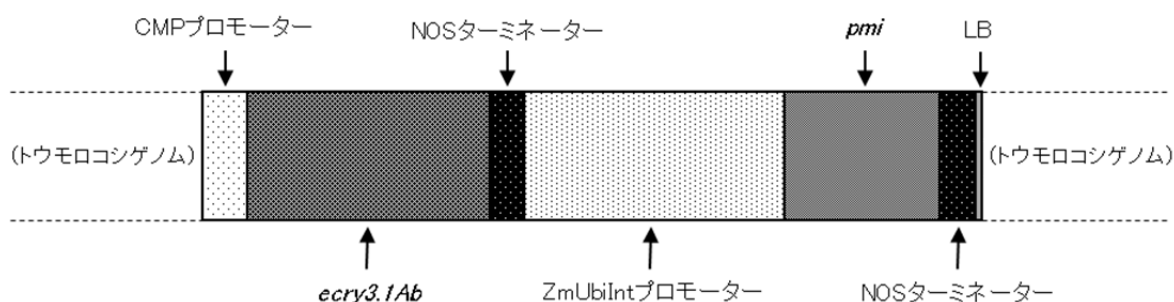


図1 トウモロコシ Event5307 に挿入された DNA（模式図）

(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（1,000 bp）及び 3'末端近傍配列（1,000 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、InforMax の Vector NTI (version 10.3.0) ソフトウェアを用いて、六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、6 個の ORF が検出された（参照 29）。

検出された ORF について、NCBI 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（参照 29）。さらに、これらの ORF について Food Allergy Research and Resource program (FARRP) を用いて FASTA 検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見いだされなかった。また、抗原決定基の有無を確認するため、連続する 8 アミノ酸について相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸が既知のアレルゲン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

米国の 4 箇所の圃場から採取したトウモロコシ Event5307 の葉、根、穀粒及び全植物体における eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 2 のとおりである。

表2 トウモロコシ Event5307 における eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	eCry3.1Ab タンパク質	PMI タンパク質
葉	49.04~142.96	2.91~4.83
根	9.13~42.72	1.69~2.11
全植物体	8.27~111.08	0.97~4.38
穀粒	4.45~6.19	1.11~2.08

* 葉、根及び全植物体は生育期から収穫期、穀粒は成熟期から収穫期の値を示した。

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

日本人一人が一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 31) を全てトウモロコシ Event5307 に置き換えて eCry3.1Ab タンパク質及び PMI タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ 3.095 μg 及び 1.04 μg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.8 g (参照 31) に占める割合はそれぞれ 4.4×10^{-8} 及び 1.5×10^{-8} 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

ecry3.1Ab 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* 及び *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* K-12 株は共に細菌であり、これまで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 32,33)。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

eCry3.1Ab タンパク質及び 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

・ eCry3.1Ab タンパク質

E. coli で発現させた eCry3.1Ab タンパク質の人工胃液中における消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に完全長タンパク質は検出されなくなり、また試験開始後 15 秒以降にみられた約 4 kDa 及び 5 kDa のポリペプチド断片も 10 分以内に消化されることが確認された。また、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 (参照 34)。

・ PMI タンパク質

E. coli で発現させた PMI タンパク質の人工胃液中における消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では試験開始後 1 分以内で完全長タンパク質は検出されなくなり、また試験開始 1 分後にみられた約 4 kDa のバンドも 5 分後には検出されなかった。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 35）。

② 人工腸液に対する感受性

・ eCry3.1Ab タンパク質

E. coli で発現させた eCry3.1Ab タンパク質の人工腸液中における消化性を SDS-PAGE 法及びウェスタンブロット法により分析を行った。その結果、SDS-PAGE 法では試験開始後 1 分以内で完全長タンパク質は検出されなくなった。ウェスタンブロット法において、完全長 eCry3.1Ab タンパク質は試験開始後 1 分以内に複数のポリペプチド断片に分解され、試験開始 48 時間後においても完全には消化されないことが確認された（参照 36）。

・ 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 法及びウェスタンブロット法により分析を行った結果、速やかに消化されることが確認された（参照 37）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた eCry3.1Ab タンパク質及び 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。その結果、eCry3.1Ab タンパク質は 65℃、30 分間の加熱で、PMI タンパク質は 95℃、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 38,39）。

(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

トウモロコシ Event 5307 で発現する eCry3.1Ab 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に、FARRP Allergen Online database, version 10.0（参照 40）を用いて相同性検索を行った。その結果、80 残基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 41,42）。

また、抗原決定基の有無を確認するため、FARRP AllergenOnline database を用いて連続する 8 アミノ酸について相同性検索を行った。その結果、PMI タンパク質と既知アレルゲンである *Rana species* CH2001（カエルの一種）由来の α -パルブアルブミンと一致する配列が見いだされた（参照 41,42）。eCry3.1Ab タンパク質については、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 41）。

(5) 遺伝子産物（タンパク質）の IgE 結合能の検討

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結果、交叉反応は認められなかった（参照 42）。

上記、(1)～(5) 及び前項 3 から総合的に判断し、eCry3.1Ab タンパク質及び 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 Event5307 における挿入遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のトウモロコシ Event5307 についてリアルタイム 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 43）。

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、2 世代のゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照 44）。

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

eCry3.1Ab 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、宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

また、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、他の天然基質は知られていない（参照 45）。

7. 宿主との差異に関する事項

米国の圃場で栽培されたトウモロコシ Event5307 と非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成並びに二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 46）。

(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（穀粒のみ）、デンプン（穀粒のみ））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は認められなかった。

(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、セレン、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は認められなかった。

（3）ビタミン類

穀粒のビタミン類（ β -カロテン、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ナイアシン、ビタミン B₆、葉酸、 α -トコフェロール）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

穀粒のアミノ酸 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は認められなかった。

（5）脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 9 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。

（6）二次代謝産物及び栄養阻害物質

穀粒のフェルラ酸、*p*-クマル酸、イノシトール、フィチン酸、トリプシンインヒビター、フルフラール及びラフィノース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は認められなかった。

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）に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2012年2月に承認を得た。また、2010年12月に米国農務省（USDA）に対して無規制栽培のための申請が行われた。米国環境保護庁（EPA）に対して PMI タンパク質の許容値設定免除の申請が行われ、2004年5月に承認を得た。また、2011年4月に eCry3.1Ab タンパク質の許容値設定免除の申請を行った。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ Event5307 の栽培方法については、従来のトウモロコシと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ Event5307 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. 2 (3) の安全性を確認するため、eCry3.1Ab タンパク質の細胞毒性試験の確認を行った。

ヒト結腸がん由来の Caco-2 細胞に *E. coli* で発現させた eCry3.1Ab タンパク質を暴露し、ニュートラルレッド取り込み量及び乳酸脱水素酵素活性を測定した。その結果、細胞に対する毒性は認められなかった（参照 18）。

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 Event5307 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 Version 4.1. International Life Sciences Institute, 2010. <http://www.cropcomposition.org>.
2. 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.
3. White, P. J. and L. M. Pollak. Corn as a food source in the United States: Part II Processes, Products, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World*. 1995, 40, 756-762.
4. Frisner, H., A. Rosendal, and V. Barkholt. Identification of immunogenic maize proteins in a casein hydrolysate formula. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2000, 11, 106-110.
5. Pastorello EA, Robino AM. Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol. Nutr. Food. Res*. 2004, 48, 356-362.
6. 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.
7. OECD. Consensus document on the biology of *Zea mays* subsp. *mays* (maize). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 27, 2003, Env/JM/MONO(2003)11.
8. Galinat, W. C. "The origin of corn". Corn and corn improvement. *Agronomy Monographs No.18*, G. F Sprague and J. W. Dudley, Eds. Madison, Wisconsin,

- American Society of Agronomy, 1998, 1-31.
9. Watson, S.A. "Structure and Composition". Corn: Chemistry and Technology. S. A. Watson and P.E. Ranstead eds. American Association of Cereal Chemists, Minnesota. 1987.
 10. ベクターpNOV2114 の塩基配列 (社内報告書)
 11. 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.
 12. US EPA. Escherichia coli K-12 Derivatives Final Risk Assessment. 1997, http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm
 13. Miles, J. S. and J. R. Guest. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. Gene. 1984, 32, 41-48.
 14. eCry3.1Ab (Entrez® Database Accession Number ADC30135): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. (社内報告書)
 15. Mizuki, E., Park, Y.S., Saitoh, H., Yamashita, S., Akao, T., Higuchi, K. and Ohba, M. Parasporin, a human leukemic cell-recognizing parasporal protein of *Bacillus thuringiensis*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000, 7: 625-634.
 16. Katayama, H., Yokota, H., Akao, T., Nakamura, O., Ohba, M., Mekada, E. and Mizuki, E. Parasporin-1, a novel cytotoxic protein to human cells from non-insecticidal parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis*. J. Biochem. 2005, 137: 17-25.
 17. Yamashita, S., Katayama, H., Saitoh, H., Akao, T., Park, Y.S., Mizuki, E., Ohba, M. and Ito, A. Typical three-domain Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* strain A1462 exhibit cytotoxic activity on limited human cancer cells. J. Biochem., 2005, 138: 663-672.
 18. Cytotoxicity testing of the eCry3.1Ab protein as contained in test substance. (社内報告書)
 19. 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 Reports. 2000, 19: 798-803.
 20. PMI (Entrez® Database Accession Number AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. (社内報告書)
 21. Event 5307 Maize: Copy Number Functional Element Southern Blot Analysis. (社内報告書)
 22. Hohn, T., L. Stavolone, P. De Haan, H. Ligon and M. Kononova. Cestrum yellow leaf curling virus promoters. U.S. Patent No.7, 166,700. Washington DC: U.S. Patent Office, 2007.
 23. 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.
24. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman. Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Molecular Applied Genetics.* 1982, 1: 561-573.
 25. Plasmid pSYN12274: Plasmid Lineage Analysis and Sequence. (社内報告書)
 26. Event 5307 Maize: Insert Sequence Analysis. (社内報告書)
 27. Event 5307 Maize: Genomic Insertion Site Analysis. (社内報告書)
 28. Event 5307 Maize: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analysis of Maize Genomic Sequences Flanking the Insert. (社内報告書)
 29. Event 5307 Maize: Genome to Insert Junction Analysis for Translated Reading Frames with a Minimum Size of 30 Amino Acids: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins. (社内報告書)
 30. Event 5307 Maize: Genome to Insert Junction Analysis for Translated Reading Frames with a Minimum Size of 30 Amino Acids: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. (社内報告書)
 31. 平成 19 年国民健康・栄養の現状。第一出版、2010.
 32. Taylor, S. L. and S. Hefle. Will genetically modified foods be allergenic? *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001, 107(5), 765-771.
 33. 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.
 34. *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 35. *In vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 36. *In vitro* Digestibility of eCry3.1Ab Protein as Contained in Test Substance ECRY3.1Ab-0208 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 37. *In vitro* Digestibility of Phosphomannose Isomerase (PMI) as Contained in Test Substance PMI-0105 Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 38. Effect of Temperature on the Immunoreactivity of eCry3.1Ab Protein. (社内報告書)
 39. Effect of Temperature on Phosphomannose Isomerase as Contained in Test Substance PMI-0105 as Assessed by Immunoreactivity. (社内報告書)
 40. FARRP, 2010. Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen

- Database, version 10.0. www.allergenonline.com, updated January 2010.
41. eCry3.1Ab (Entrez® Database Accession Number ADC30135): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. (社内報告書)
 42. PMI (Entrez® Database Accession Number AAA24109): Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. (社内報告書)
 43. Event 5307 Maize: Mendelian Inheritance Analysis. (社内報告書)
 44. Event 5307 Maize: Southern Blot Analysis of ●●●×●●● Maize. (社内報告書)
 45. Freeze, H. H. “Phosphomannose isomerase”. 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.
 46. Compositional Analysis of Forage and Grain from Event 5307 Hybrid Maize Grown During 2008 in the USA. (社内報告書)