

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

パイヤリングスポットウイルス抵抗性  
パイヤ 55-1 系統

2009年5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 .	8
6. 安全な摂取に関する事項 .....	8
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 .....	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 .....	9
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 .....	16
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 .....	16
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 .....	16
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項 .....	18
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 .....	18
7. 宿主との差異に関する事項 .....	19
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項 .....	20
9. 栽培方法に関する事項 .....	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項 .....	20
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 .....	20
III. 食品健康影響評価結果 .....	20
<参照> .....	21

### <審議の経緯>

2006年1月26日	厚生労働大臣より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（厚生労働省発食安第0126001号）、関係書類の接受
2006年2月2日	第129回食品安全委員会（要請事項説明）
2006年2月27日	第37回遺伝子組換え食品等専門調査会
2008年3月17日	第60回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年5月19日	第70回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年5月28日	第287回食品安全委員会（報告）

### <食品安全委員会委員名簿>

(2006年6月30日まで)	(2006年12月20日まで)	(2006年12月21日から)
寺田雅昭（委員長）	寺田雅昭（委員長）	見上 彪（委員長）
寺尾允男（委員長代理）	見上 彪（委員長代理）	小泉直子（委員長代理*）
小泉直子	小泉直子	長尾 拓
坂本元子	長尾 拓	野村一正
中村靖彦	野村一正	畑江敬子
本間清一	畑江敬子	廣瀬雅雄**
見上 彪	本間清一	本間清一

\*：2007年2月1日から

\*\*：2007年4月1日から

### <食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

(2007年9月30日まで)	(2007年10月1日から)	
早川堯夫（座長）	澤田純一（座長）	
澤田純一（座長代理）	鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	五十君静信	丹生谷博
池上幸江	丹生谷博	飯 哲夫
今井田克己	石見佳子	山川 隆
宇理須厚雄	宇理須厚雄	山崎 壮
小関良宏	小関良宏	和久井信
橘田和美**	橘田和美	渡邊雄一郎
澁谷直人	澁谷直人	
	手島玲子	

\*：2006年7月31日まで

\*\*：2006年10月1日から

## 要 約

「パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 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。

「パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統」は、パパイヤリングスポットウイルス (PRSV) HA5-1 株に由来する *PRSV CP* 遺伝子を導入して作製されており、PRSV の感染による影響を受けずに生育できるとされている。なお、本品種には選択マーカーとして、*Escherichia coli* に由来するカナマイシン耐性遺伝子及び $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子が導入されている。

PRSV は、多くのパパイヤに自然感染しており、また、強毒の PRSV の感染を防ぐために、弱毒化した PRSV を人工感染させたパパイヤが販売されている。導入した *PRSV CP* 遺伝子は、感染した PRSV の *PRSV CP* 遺伝子との相互作用により、双方の *PRSV CP* 遺伝子の発現が抑制されるという現象 (転写後遺伝子サイレンシング) により、PRSV に抵抗性を有する。

「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) に基づき評価した結果、「パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統」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 : パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統  
性質 : パパイヤリングスポットウイルス抵抗性  
申請者 : ハワイパパイヤ産業協会  
開発者 : コーネル大学、ハワイ大学、アップジョン社

「パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 系統」(以下、「パパイヤ 55-1」という。)は、弱毒化したパパイヤリングスポットウイルス (PRSV) HA5-1 株に由来する *PRSV CP* 遺伝子を導入して作製されており、PRSV の感染による影響を受けずに生育できるとされている。なお、パパイヤ 55-1 には選択マーカーとして *Escherichia coli* に由来するカナマイシン耐性遺伝子 (*npt II* 遺伝子) 及びβ-グルクロニダーゼ遺伝子 (*uidA* 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、スミレ目 (Violales)、パパイヤ科 (Caricaceae) に属するパパイヤ (*Carica papaya* L.) の栽培品種 Sunset である。

##### (2) DNA 供与体の種名及び由来

*PRSV CP* 遺伝子の供与体は、弱毒化した PRSV HA5-1 株であり、*npt II* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子の供与体は *E. coli* である。

##### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*PRSV CP* 遺伝子は、転写後遺伝子サイレンシングの働きによりパパイヤに PRSV 抵抗性を付与する。選択マーカー遺伝子である *npt II* 遺伝子はネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ (NPT II タンパク質) を発現し、カナマイシン等の抗生物質に対する耐性を付与し、*uidA* 遺伝子は酵素β-グルクロニダーゼ (GUS タンパク質) を発現し、インドール誘導体とβ-グルクロン酸の配糖体 (X-GlcA) を加水分解し、色素を生成する。

これらの挿入 DNA を含む発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 をパーティクルガン法により宿主に導入した。

#### 2. 宿主の食経験に関する事項

パパイヤは中南米を原産とする熱帯果樹であり (参照 1)、1,500 年代にフィリピンやインドへ運ばれ、その後、熱帯アジア、アフリカ、南太平洋地域に普及したとされている。現在、中南米、東南アジアなどの多くの熱帯及び亜熱帯地域

で栽培されており、重要な商業作物とされ、長期にわたり食品として摂取されている（参照 2, 3, 4）。我が国においても沖縄県を中心に商業栽培されている（参照 5）。

### 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

完熟パパイヤの果実の主要構成成分はタンパク質約 0.6%、脂質約 0.2%、灰分約 0.5%、炭水化物約 13%、水分約 86%と報告されている（参照 4）。

(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

パパイヤには、毒性物質・栄養阻害物質等として、ベンジルイソチオシアン酸塩 (BITC)、パパイン及びカルパインが含まれる。果実中の含有率は、BITC は 0.4~1.4ppm、パパインは 50.9~67.4 $\mu$ g/g 生重であり、カルパインは葉に存在し、果実からは検出されていない（参照 6, 7）

### 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

パパイヤ 55-1 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のパパイヤと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

パパイヤ 55-1 の可食部位は、従来のパパイヤと変わらない。

(3) 摂取量

パパイヤ 55-1 の摂取量は、従来のパパイヤと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

パパイヤ 55-1 の調理及び加工方法は、従来のパパイヤと変わらない。

### 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

パパイヤ 55-1 は、*PRSV CP* 遺伝子発現カセット、*npt II* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットの導入により、*PRSV CP* mRNA、NPT II タンパク質及び GUS タンパク質を発現することが、宿主との相違点である。

以上、1~6により、パパイヤ 55-1 の安全性評価においては、既存のパパイヤ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

パパイヤ 55-1 は、挿入された *PRSV CP* 遺伝子による転写後遺伝子サイレンシングの働きにより、PRSV の感染による影響を受けずに生育することが可能であるとされている。

## 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、スミレ目 (Violales) パパイヤ科 (Caricaceae) に属するパパイヤ (*C. papaya* L.) の栽培品種 Sunset 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

パパイヤの原産地は、熱帯アメリカの熱帯果樹であり、比較的早い時期に近縁とされている南アメリカの *Vasconcellea* 種と分岐し、中央アメリカで独自に進化していったと考えられている (参照 8)。その後、南部メキシコと北部ホンジュラス間の地域で、長期間にわたる選抜の繰り返しにより栽培種になったとされている (参照 2)。

### 3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

パパイヤには、毒性物質・栄養阻害物質等として、BITC、パパイン及びカルパインが含まれている。

このうち BITC は、哺乳類の様々な器官の機能障害を引き起こすとされており (参照 11)、酵素のミロシナーゼが基質のグルコシノレートに触媒することにより産生される。ミロシナーゼは種子を覆う肉質種子に含まれており、グルコシノレートは内胚乳に含まれているため、種子が砕かれるか、傷をつけられない限り、多量の BITC が産生されることはない (参照 9)。また、基質のグルコシノレートは、植物体の乳液にも含まれているが、乳液成分は成熟と共に減少するため、果実における BITC の濃度も減少することが知られている (参照 10)。

パパインはタンパク質分解酵素であり、妊娠中の胎児への影響や皮膚の炎症が懸念されている (参照 12, 13)。しかし、パパインを含む乳液成分は、成熟と共に減少するため、完熟果実におけるパパイン濃度は極めて低いとされている (参照 14)。

アルカロイドの一種であるカルパインは、生理活性を有するとの報告があるが (参照 15, 16)、この成分はパパイヤの葉に存在するものであり、果実からは検出されていない (参照 15, 17, 18)。

パパイヤ果実中の BITC 含有量は 0.4~1.4ppm、パパインの含有量は 50.9~67.4µg/g 生重、カルパイン含有量は検出限界 (20ng/g 生重) 以下である (参照 6, 7)。

### 4. アレルギー誘発性に関する事項

パパイヤの果肉及びその果汁によってアレルギーが発症すると報告されている。



このアレルギーは、パパイン等のシステインタンパク質分解酵素によって引き起こされるとされている（参照 19）。

## 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

パパイヤには、PRSV 等の各種病害が知られているが（参照 20）、それらが人や動物に感染することは知られていない。

## 6. 安全な摂取に関する事項

パパイヤは中南米を原産とする熱帯果樹であり（参照 1）、1,500 年代にフィリピンやインドへ運ばれ、その後、熱帯アジア、アフリカ、南太平洋地域に普及したとされている。現在、中南米、東南アジアなどの多くの熱帯及び亜熱帯地域で栽培されており、重要な商業作物とされ、長期にわたり食品として摂取されている（参照 2, 3, 4）。我が国においても沖縄県を中心に商業栽培されている（参照 5）。

成熟パパイヤは主に生食用として利用され、また、未熟なパパイヤの乳液から抽出したパパインは、食肉軟化剤や消化薬としても利用されている（参照 20）。

パパイヤは、2007 年では約 700 万トンが生産されており（参照 21）、我が国でも 2007 年度には約 4 千トンが輸入されている（参照 22）。

## 7. 近縁の植物種に関する事項

パパイヤは、パパイヤ属に属する唯一の種であるため、同じ属の近縁種は存在しない。

## 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

パパイヤ 55-1 の作出に用いた発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 は、プラスミド pGA482GG を用いて作成された（参照 23, 24）。

### 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 pGA482GG の塩基数は 17.5kb 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 pGA482GG 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

プラスミド pGA482GG 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 pGA482GG には、*nptII* 遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA* 遺伝子) 及びゲンタマイシン耐性遺伝子 (*aacC3* 遺伝子) が含まれている。

これら遺伝子の宿主ゲノムへの挿入の有無及び発現を確認するため、サザンブロット分析及びノーザンブロット分析を行った。その結果、*tetA* 遺伝子の断片が挿入されていたが発現は認められず、また、*aacC3* 遺伝子は挿入されていないことが確認された (参照 25, 26, 27)。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pGA482GG 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

*PRSV CP* 遺伝子の由来は *Potyvirus* 科 *Potyvirus* 属に属するパパイヤリングスポットウイルス (PRSV) HA5-1 株である。また、*nptII* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子の由来は *E. coli* である。

(2) 安全性に関する事項

*PRSV CP* 遺伝子の供与体である PRSV は、多くのパパイヤに自然感染しており、これまで病徴があまり現れていない個体は食用に供されており、また、強毒の PRSV の感染を防ぐために、弱毒化した PRSV を人工感染させたパパイヤが販売されている。これまでこれらのパパイヤによる健康被害は報告されておらず、また、PRSV がヒトに対して病原性等を示す報告はない。

*nptII* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子の供与体である *E. coli* は、ヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である (参照 28)。

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

・ *PRSV CP* 遺伝子

PRSV の強毒株である PRSV HA 株を亜硝酸処理し、弱毒化した PRSV HA5-1 株よりクローニングした。

・ *nptII* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子

*nptII* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子は、いずれも *E. coli* に由来し、プラスミド pGA482GG に含まれている。

挿入 DNA の構成要素は表のとおりである。

(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

パパイヤ55-1に導入された挿入DNAの塩基数及び塩基配列は明らかであり、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

・ *PRSV CP* 遺伝子

*PRSV CP* 遺伝子は、感染した *PRSV* の *PRSV CP* 遺伝子との相互作用により、双方の *PRSV CP* 遺伝子の発現が抑制されるという現象（転写後遺伝子サイレンシング）が起きる。その結果、パパイヤ 55-1 は *PRSV* に抵抗性を有することとなる（参考 29）。

・ *npt II* 遺伝子

*npt II* 遺伝子がコードする NPT II タンパク質は、カナマイシンやネオマイシン等の抗生物質のリン酸化を触媒する酵素である。このリン酸化により、これらの抗生物質によるミトコンドリアや葉緑体のリボソームサブユニットへの作用を抑制することができることから（参照 30）、選択マーカーとして使用された。

・ *uidA* 遺伝子

*uidA* 遺伝子がコードする GUS タンパク質は、インドール誘導体とβ-グルクロン酸の配糖体（X-GlcA）を加水分解し、青色色素を生成することから、選択マーカーとして使用された。

*PRSV* タンパク質、NPT II タンパク質及び GUS タンパク質が既知の毒性タンパク質との間に構造相同性がないことを確認するため、NCBI の ORF finder を用いてオープンリーディングフレーム（ORF）検索を行い、検出された ORF について、NCBI データベースに対し、blastp を用いてアミノ酸相同検索を行った。その結果、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 32）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

パパイヤ 55-1 には、抗生物質耐性マーカーである *npt II* 遺伝子が挿入されている。*npt II* 遺伝子が発現する NPT II タンパク質は、哺乳動物の胃で消化されること、酵素活性に不可欠な補助因子であるアデノシン-3-リン酸（ATP）は酸性下では不安定なこと、ATP の濃度は NPT II タンパク質の酵素活性に必要とされる濃度より低いこと、また、マウスを用いた急性毒性試験の結果、有害な影響は認められていないことから、安全性に問題ないことが示されている（参考 33）。

### 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

*PRSV CP* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、CaMV 由来の 35S プロモーターであり、*npt II* 遺伝子発現カセットのプ

ロモーターは、*Agrobacterium tumefaciens* Ti プラスミド由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター領域である（参照 34, 35, 36）。

(2) ターミネーターに関する事項

*PRSV CP* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、CaMV 由来の 35S ターミネーターである。*npt II* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*A. tumefaciens* Ti プラスミド由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域である（参照 34, 36）。

(3) その他

上記のプロモーター及びターミネーター以外、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は組み込まれていない。

#### 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 は、*npt II* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットを含むプラスミド pGA482GG に、*PRSV CP* 遺伝子発現カセットを挿入して構築した。

#### 5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の塩基数は 19,567bp であり、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

発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の各構成要素の機能は既に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（参照 32）。

(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、発現ベクターの *npt II* 遺伝子発現カセットの *nos* プロモーターから *uidA* 遺伝子発現カセットの *nos* ターミネーターまでの領域で、*npt II* 遺伝子発現カセット、*PRSV CP* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットが含まれる。

(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

意図する挿入領域内には、目的外の遺伝子の混入はない。

表 パパイヤ 55-1 への挿入 DNA

<i>npt II</i> 遺伝子発現カセット	
<i>nos</i> 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） <i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター
<i>npt II</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 由来の NPT II タンパク質をコードする遺伝子
<i>nos</i> 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>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター
<i>PRSV CP</i> 遺伝子発現カセット	
CaMV 35S 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） CaMV 由来の 35S プロモーター
<i>PRSV CP</i> 遺伝子	PRSV HA5-1 株から得られた PRSV の外被タンパク質をコードする遺伝子。なお、 <i>PRSV CP</i> 遺伝子の N 末端には、CMV の外被タンパク質をコードするアミノ酸の最初の 16 個が融合している。
CaMV 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） CaMV 由来の 35S ターミネーター
<i>uidA</i> 遺伝子発現カセット	
CaMV 35S 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） CaMV 由来の 35S プロモーター
<i>uidA</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> 由来の GUS タンパク質をコードする遺伝子
<i>nos</i> 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>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター

## 6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 をパーティクルガン法により、宿主に導入した後、カナマイシン添加培地で選択培養し、GUS 活性を指標に選抜した個体を植物体に分化させた。得られた個体について挿入遺伝子及びタンパク質の発現を確認し、PRSV HA 株の接種試験により、PRSV 抵抗性の個体を選抜した（参照 38）。選抜個体の自殖を重ね、また、その後の交配によりパパイヤ 55-1 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

パパイヤ 55-1 のゲノムに挿入されたそれぞれの遺伝子発現カセットのコピー数及び完全性並びに発現ベクターの外骨格配列が挿入されているかを明らかにするため、サザンブロット分析、塩基配列の解析及び PCR 分析等を行った。その結果、次の 3 つの DNA 領域が 1 コピーずつ宿主ゲノムに挿入されていることが確認された。

- *bla* 遺伝子断片、*oriColE1*、*uidA* 遺伝子発現カセット、*PRSV CP* 遺伝子発現カセット、*npt II* 遺伝子発現カセット及び *oriV* 断片から構成される領域(挿入領域 A)
- *npt II* 遺伝子断片領域 (挿入領域 B)
- *tetA* 遺伝子断片及び発現ベクターの外骨格より構成される領域(挿入領域 C)

① 挿入領域 A

目的の挿入領域(*uidA* 遺伝子発現カセット、*PRSV CP* 遺伝子発現カセット、*npt II* 遺伝子発現カセット)に加え、発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 において目的の挿入領域と隣接する *bla* 遺伝子断片、*oriColE1* 及び *oriV* 断片が挿入されていることが確認された。(図 1 参照)

挿入領域 A の全塩基配列を解析した結果、*PRSV CP* 遺伝子発現カセットを含む領域で塩基の変異が認められたが(参照 37)、*PRSV CP* 遺伝子のコード領域中では変異は起こっておらず、*PRSV CP* タンパク質の発現に影響を及ぼすものではないことが確認された。また、*npt II* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットはそれぞれ完全な形で挿入されていた。

挿入領域 A の近傍配列がそれぞれパパイヤゲノム由来であることを確認するため、パパイヤ 55-1 の配列に基づいて、5'末端近傍配列、挿入領域 A 及び 3'末端近傍配列にプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、近傍配列内のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 及び非組換えパパイヤの両方で同じ大きさの PCR 産物が増幅された。一方、近傍配列及び挿入領域 A のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 のみに特異的な PCR 産物が増幅された(参照 43, 44, 45)。これらのことから、挿入領域 A の近傍配列はパパイヤゲノム由来であると考えられた。

挿入領域 A の挿入により、既知の内在性の遺伝子が損なわれていないことを確認するために、挿入領域 A の 5'末端近傍配列 (1,501bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,500bp) について、NCBI データベースを用いて blastn 検索を行った(参照 37, 46)。その結果、パパイヤの葉緑体ゲノムに由来する遺伝子 (*trnS* 遺伝子、*trnL* 遺伝子、*trnF* 遺伝子及び *ycf3* 遺伝子) と高い相同性を示した。しかし、核ゲノムに存在する葉緑体ゲノムの遺伝子は、今日の葉緑体と植物核ゲノムが形成された DNA 移入の過程で残ったものと考えられていること(参照 39, 40)、葉緑体ゲノムの遺伝子は、葉緑体に特有の転写・翻訳システムにより発現するため、葉緑体のみで機能すること(参照 41, 42)、挿入領域 A は葉緑体ゲノムには挿入されていないこと、パパイヤの成分分析や生育特性にお

いて非組換えパパイヤとの間で生物学的に意味のある差異は認められていないことから、相同性が認められた遺伝子は機能を有している可能性は低いと考えられた（参照 43）。これらのことから、挿入領域 A の挿入により、機能を有する既知の内在性の遺伝子を破壊している可能性は低いと考えられた。

## ② 挿入領域 B

*nptII* 遺伝子の断片 290bp が挿入されていることが確認された。（図 2 参照）

挿入領域 B の近傍配列がそれぞれパパイヤゲノム由来であることを確認するため、パパイヤ 55-1 の配列に基づいて、5'末端近傍配列、挿入領域 B 及び 3'末端近傍配列にプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、近傍配列内のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 及び非組換えパパイヤの両方で同じ大きさの PCR 産物が増幅された。一方、近傍配列及び挿入領域 B のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 のみに特異的な PCR 産物が増幅された（参照 43, 44, 45）。これらのことから、挿入領域 B の近傍配列はパパイヤゲノム由来であると考えられた。

挿入領域 B の挿入により、既知の内在性の遺伝子が損なわれていないことを確認するために、挿入領域 B の 5'末端近傍配列（363bp）及び 3'末端近傍配列（828bp）について、NCBI データベースを用いて blastn 検索を行った。その結果、パパイヤの葉緑体ゲノムに由来する遺伝子（*ndhG* 遺伝子、*atpB* 遺伝子及び *atpE* 遺伝子）と高い相同性を示した（参照 46, 47）。しかし、核ゲノムで相同性が認められたこれらの葉緑体ゲノムの遺伝子は、前述の①のとおり、機能を有している可能性は低いと考えられた（参照 44）。これらのことから、挿入領域 B の挿入により、機能を有する既知の内在性の遺伝子を破壊している可能性は低いと考えられた。

## ③ 挿入領域 C

*tetA* 遺伝子の断片 222bp が発現ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の外骨格配列に挟まれた形で挿入されていることが確認された（図 3 参照）。

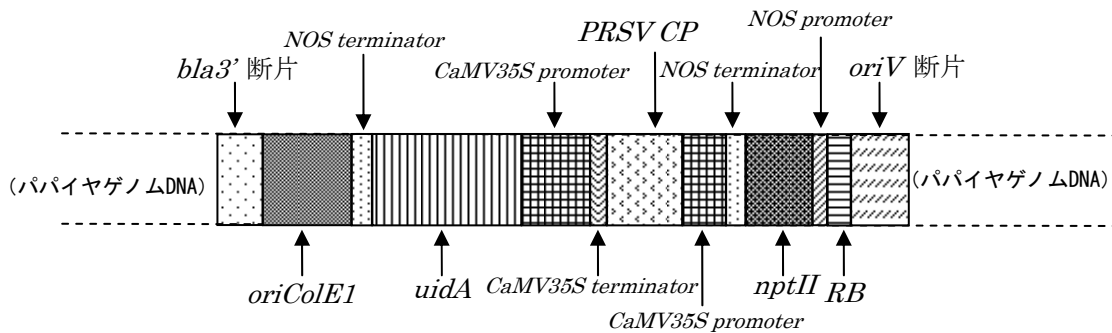
*tetA* 遺伝子断片が発現しているかをノーザンブロット分析により確認した結果、*tetA* 遺伝子断片は発現していないことが確認された。

挿入領域 C の近傍配列がそれぞれパパイヤゲノム由来であることを確認するため、パパイヤ 55-1 の配列に基づいて、5'末端近傍配列、挿入領域 C 及び 3'末端近傍配列にプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、近傍配列内のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 及び非組換えパパイヤの両方で同じ大きさの PCR 産物が増幅された。一方、近傍配列及び挿入領域 C のプライマー対を用いた PCR では、パパイヤ 55-1 のみに特異的な PCR 産物が増幅された（参照 43, 44, 45）。これらのことから、挿入領域 C の近傍配列はパパイヤゲノム由来であると考えられた。

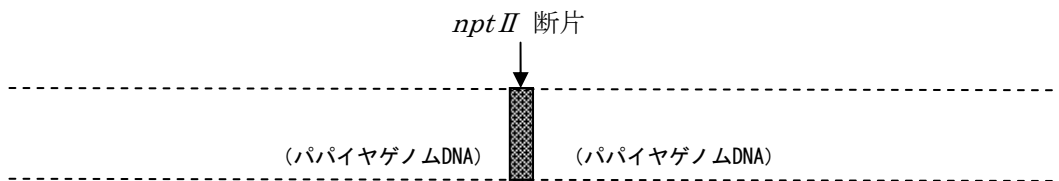
挿入領域 C の挿入により、既知の内在性の遺伝子が損なわれていないことを確認するために、挿入領域 C の 5'末端近傍配列（1,372bp）及び 3'末端近傍配

列 (1,706bp) について、NCBI データベースを用いて *blastn* 検索を行った (参照 46, 48)。その結果、パパイヤの葉緑体ゲノムに由来する遺伝子 (*ycf2* 遺伝子) と高い相同性を示した。しかし、核ゲノムで相同性が認められたこの遺伝子は、前述の①のとおり、機能を有している可能性は低いと考えられた (参照 45)。これらのことから、挿入領域 C の挿入により、機能を有する既知の内在性の遺伝子を破壊している可能性は低いと考えられた。

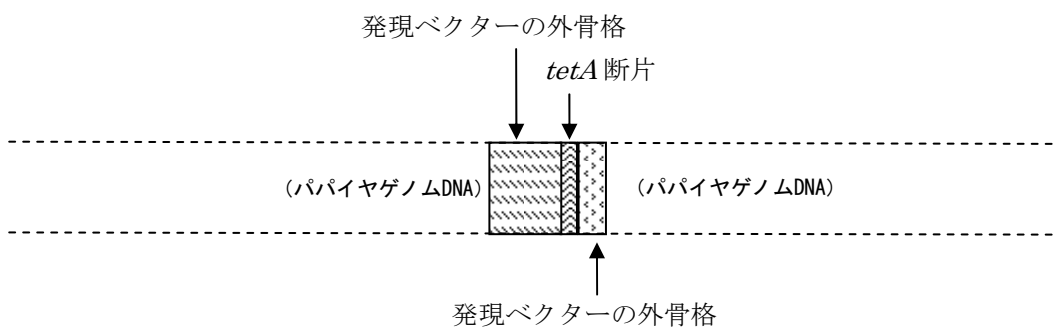
- ・ 組換えパパイヤ「パパイヤ 55-1」に挿入された DNA (模式図)  
(図 1 : 挿入領域 A)



- (図 2 : 挿入領域 B)



- (図 3 : 挿入領域 C)



- (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

挿入領域 A と 5'末端近傍配列 (1,501bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,500bp) との接合部において、挿入領域 B と 5'末端近傍配列 (363bp) 及び 3'末端近傍配列 (828bp) との接合部において、挿入領域 C と 5'末端近傍配列 (1,372bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,706bp) 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、6つの読み枠について ORF を分析した結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった (参照



32, 49, 50)。

## 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

パパイヤ 55-1 の果実における PRSV CP タンパク質、NPT II タンパク質及び GUS タンパク質の発現量を ELISA 法により測定した。

その結果、PRSV CP タンパク質の平均発現量は、Rainbow 品種で約 6.3 µg/g 生重、SunUp 品種では検出されなかった。なお、PRSV に感染した非組換えパパイヤでは 48.5µg/g 生重であった (参照 51)。

NPT II タンパク質の平均発現量は、Rainbow 品種で約 72 ng/g 生重、Sunup 品種で 396ng/g 生重だった (参照 52)。GUS タンパク質の発現量の範囲は、Rainbow 品種で 8.43~890.30ng/g 生重だった (参照 53)。

## 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 日に摂取するパパイヤの摂取量を 1 個 (平均果実重量 567.0g) と仮定し、全てをパパイヤ 55-1 として計算すると、1 人 1 日当たりの PRSV CP タンパク質、NPT II タンパク質及び GUS タンパク質の摂取量はそれぞれ、3.57 mg、40.82µg 及び 504.80µg となり、日本人 1 人が 1 日に摂取するタンパク質量 70.8 g (参照 54) に占める割合はそれぞれ、 $5.0 \times 10^{-3}\%$ 、 $5.74 \times 10^{-5}\%$  及び  $7.1 \times 10^{-4}\%$  となる。したがって、これらのタンパク質が一日蛋白摂取量の有意な量を占めないと判断される。

## 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

PRSV CP 遺伝子の供与体である PRSV 並びに *uidA* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子の供与体である *E.coli* について、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

PRSV CP タンパク質、NPT II タンパク質及び GUS タンパク質がアレルギー誘発性を持つという知見は報告されていない。

なお、PRSV は多くのパパイヤに自然感染しており、病徴があまり現れていない個体は食用に供されており、また、強毒の PRSV の感染を防ぐために、弱毒化した PRSV を人工感染させたパパイヤが販売されていることから、PRSV CP タンパク質はパパイヤとともに食されていると考えられており、これまでこれらのパパイヤによる健康被害は報告されていない。

### (3) 遺伝子産物 (タンパク質) の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

#### ① 人工胃液に対する感受性

##### ・ PRSV CP タンパク質

*E. coli* で発現させた PRSV CP タンパク質を人工胃液中で処理し、

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 秒以内に消化された（参照 55）。

- NPT II タンパク質

NPT II タンパク質は、人工胃液との反応開始後 10 秒以内に消化されたこと、人工胃液中において NPT II タンパク質の酵素活性は 2 分後に消失することが報告されている（参照 33, 56）。

- GUS タンパク質

GUS タンパク質は、人工胃液中で 15 秒以内に消化されることが報告されている（参照 57）。

② 人工腸液に対する感受性

- PRSV CP タンパク質

*E. coli* で発現させた PRSV CP タンパク質を人工腸液中で処理し、ウェスタンブロット法により分析を行った結果、試験開始後 10 分以降から分解産物が認められ、15 分後には当該タンパク質の 50%以上が分解された（参照 55）。

- NPT II タンパク質

NPT II タンパク質は、人工腸液との反応開始後 2 分から 5 分後に 50%が消化されること、人工腸液中において NPT II タンパク質の酵素活性は 15 分後に消失することが報告されている（参照 33, 56）。

- GUS タンパク質

GUS タンパク質を発現する *uidA* 遺伝子は、これまで我が国で安全性が確認された遺伝子組換え作物においても挿入されており、人工腸液中で GUS タンパク質の免疫反応性は、240 分後にほぼ検出されなくなり、その酵素活性の約 90%が消失するとされている（参照 58）。

(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

- PRSV CP タンパク質

PRSV CP タンパク質について、既知アレルゲンとの構造相同性を確認するため、アレルゲンデータベース<sup>1,2</sup>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。また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在の可能性を確認するため、連続する 8 つのアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、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 32, 61）。

- NPT II タンパク質

---

<sup>1</sup> The Protein Information Resource (PIR)、the Central Science Laboratory (UK)、the National Center for Food Safety and Technology database 及び Allergen Online

<sup>2</sup> Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)

NPTⅡタンパク質について、既知アレルゲンとの構造相同性を確認するため、アレルゲンデータベース<sup>2</sup>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。また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在の可能性を確認するため、連続する8つのアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、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 32）。

・ GUS タンパク質

GUS タンパク質について、既知アレルゲンとの構造相同性を確認するため、アレルゲンデータベース<sup>2</sup>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。また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在の可能性を確認するため、連続する8つのアミノ酸配列の相同性検索を行った結果、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 32）。

上記、（1）～（4）及び前項3から総合的に判断し、PRSV CP タンパク質、NPTⅡタンパク質及びGUS 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

パパイヤ55-1の挿入遺伝子について、後代における安定性を確認するために、4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確認された（参照 27）。

また、PRSV CP タンパク質、NPTⅡタンパク質及びGUS タンパク質が安定して発現していることを確認するために、ELISA法及び呈色反応による分析を行った結果、複数世代にわたって安定して発現していることが確認された（参照 66）。

## 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

・ PRSV CP タンパク質

PRSV CP タンパク質は、ウイルスの核酸を包み込み、保護するための構造タンパク質である（参照 67, 68）。これまでにPRSV CP タンパク質が何らかの酵素活性を有することは報告されていないことから、PRSV CP タンパク質が宿主の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

・ NPTⅡタンパク質

NPTⅡタンパク質は、アミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖分子の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である（参照 69）。NPTⅡタンパク質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシン等のアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与することが報告されており（参照 70, 71）、NPTⅡタンパク質は高い基質特異性を持つことが示唆されている（参照 70）。これまで、パパイヤには、アミノグリコシド系抗生物質に構造的に類似した化合物が含まれているという報告がないことか

ら、NPT II タンパク質の発現が宿主の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

・ GUS タンパク質

GUS タンパク質は $\beta$ -グルクロニドを加水分解する酵素である。植物における $\beta$ -グルクロニドの生理活性は明らかではないが、グルクロニドは水に易溶性の二次代謝物として液胞やアポプラストへ移送されることが知られている（参照 72）。このことから、GUS タンパク質の発現が宿主の代謝経路へ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

## 7. 宿主との差異に関する事項

1996年から2005年にかけて米国ハワイ州の圃場で栽培されたパパイヤ 55-1 と非組換えパパイヤの果実について、主要構成成分、アミノ酸組成、無機物、ビタミン類、BITC、カルパイン及びパパインの分析を行い、パパイヤ 55-1 と非組換えパパイヤとの間で比較を行った（参照 6）。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（水分、灰分、タンパク質、総脂質、炭水化物、粗繊維）の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(2) アミノ酸組成

遊離アミノ酸 18 種類の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(3) 無機物

無機物（リン、カリウム、カルシウム、マグネシウム、ナトリウム、鉄、銅、亜鉛）の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えパパイヤとの間に差は見られなかった。

(4) ビタミン類

ビタミン A の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えパパイヤとの間では、果肉が赤色種か黄色種かという栽培種の影響と果実の熟し方の程度による影響が見られたものの、これまでに報告されている文献値（参照 73, 74, 75, 76, 77）の範囲内であった。

また、ビタミン C の分析を行ったところ、同じ遺伝子型の果実でも含量に個体差が大きく、対照に用いた非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(5) BITC

BITC の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えパパイヤとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(6) カルパイン

カルパイン（カルパイン、ジデヒドロカルパイン、テトラデヒドロカルパイン）の分析を行ったところ、分析値はいずれも検出限界（20 ng/g 生重）以下であった。

(7) パパイン

パパインの分析を行ったところ、一部の組換え品種と非組換え品種との間で統計学的有意差が認められたものの、対照に用いた全ての非組換えパパイヤの品種における測定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、1996年9月に米国農務省（USDA）より無規制裁培の許可を受け、1997年9月に食品医薬品局（FDA）より食品としての安全性認可を受けている。

カナダでは、2003年1月にカナダ保健省（Health Canada）より食品としての安全性認可を受けている。

1998年5月よりパパイヤ 55-1 の栽培が開始され、1999年5月以降、米国内で販売されている。

**9. 栽培方法に関する事項**

パパイヤ 55-1 の栽培方法については、従来のパパイヤ品種と同じである。

**10. 種子の製法及び管理方法に関する事項**

パパイヤ 55-1 の種子の製法及び管理方法については、従来のパパイヤ品種と同じである。

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

第2から第6まで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。

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）

**Ⅲ. 食品健康影響評価結果**

「パパイヤリングスポットウイルス抵抗性パパイヤ 55-1 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された。

## <参照>

- 1 久保 祐雄. 農学大事典. 養賢堂,1987.
- 2 Singh, I.D. Papaya. Oxford and IBH Publishing, New Delhi. 1990, 224
- 3 Ferrão, J.E.M. A ventura das Plantas e os Descobrimentos Portugueses. Tropical, Lisbon, Portugal, Instituto de Investigação Científica Comissão Nacional para as Comemorações dos Descobrimentos Portugueses, and Fundação Berardo, 1992, 247
- 4 土橋 豊. 熱帯の有用果実. トンボ出版, 2003.
- 5 沖縄県農林水産部農林水産企画科統計資料,  
<http://www3.pref.okinawa.jp/site/view/contview.jsp?cateid=108&id=9477&page=1>
- 6 Data comparing transgenic line 55-1 and nontransgenic papaya (社内報告書)
- 7 Papain levels in GM and non-GM papaya fruits at different stages of ripening (社内報告書)
- 8 Aradhya, KM, RM Manshardt, F Zee, and CW Morden. A phylogenetic analysis of the genus *Carica* L. (*Caricaceae*) based on restriction fragment length variation in a cpDNA intergenic spacer region. Gen. Resour. Crop Evol. 1999, 46, 579-586
- 9 Kermanshai R, McCarry BE, Rosenfeld J, Summers PS, Weretilnyk EA, Sorger GJ. Benzyl isothiocyanate is the chief or sole anthelmintic in papaya seed extracts. Phytochemistry. 2001, 57, 3, 427-435
- 10 Tang CS. Localization of benzyl glucosinolate and thioglucosidase in *Carica papaya* fruit. Phytochemistry. 1973, 12, 769-773
- 11 Adebiyi A, Ganesan Adaikan P, Prasad RN. Tocolytic and toxic activity of papaya seed extract on isolated rat uterus. Life Sci. 2003, 19, 74(5), 581-592
- 12 Adebiyi A, Adaikan PG, Prasad RN. Papaya (*Carica papaya*) consumption is unsafe in pregnancy: fact or fable? Scientific evaluation of a common belief in some parts of Asia using a rat model. Br J Nutr. 2002, 88(2), 199-203
- 13 Samson, JA. Tropical fruits. 2nd ed., Essex, UK. Longman Scientific & Technological, 1986.
- 14 Thomas and Beckly (1923) cited in Traub, H.P., T.R. Robinson and H.E. Stevens. Latex test for maturity of papaya fruits. Science. 1935, 2137(82), 569-570
- 15 Burdick E. Carpaine: An alkaloid of *Carica papaya*-Its chemistry and pharmacology. Economic Botany. 1971, 24, 363-5
- 16 Hornick CA, Sanders LI, Lin YC. Effect of carpaine, a papaya alkaloid, on the circulatory function in the rat. Res Commun Chem Pathol Pharmacol.

- 1978, 22(2), 277-289
- 17 Tang CS. New macrocyclic delta1-piperideine alkaloids from papaya leaves: dehydrocarpaine I and II. *Phytochemistry*. 1979, 18, 651-652
  - 18 Tang CS. Macrocyclic piperideine and piperideine alkaloids in *Carica papaya* In: *Tropical Foods, Chemistry and Nutrition*. Academic Press NY, 1979, 1, 55-68
  - 19 Gall, H., K.J.: Kalveram, G. Forck and U. Tuemmers. Cross-allergenicity between kiwi fruit and thiol proteinases, pollen and foodstuffs. *Allergologie*. 1990, 13, 447-451
  - 20 H.Y. Nakasone and R.E. Paull. *Tropical Fruits*, Oxford University Press, 2009, (Crop Production Science in Horticulture Series), 239-269
  - 21 FAO. 統計資料, 2007,  
<http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>
  - 22 財務省貿易統計. 2006, <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
  - 23 Reconstructed genealogical history of plant transformation vector pGA482GG, and its predicted transmissibility (社内報告書)
  - 24 55-1 系統パパイヤの形質転換に用いたプラスミド・ベクター pGA482GG/cpPRV-4 の構築手順 (社内報告書)
  - 25 Southern blot analysis to show T-DNA and non T-DNA binary sequences integrated into papaya lines 55-1 and 63-1 (社内報告書)
  - 26 Tetracycline resistance gene (*tetA*) expression in transgenic Rainbow and SunUp papayas resistant to *Papaya ringspot virus* (社内報告書)
  - 27 Southern analysis of papaya line 55-1 (社内報告書)
  - 28 Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W.: Bevan.  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986, 83, 8447-8451
  - 29 Tennant, P., G. Fermin, M.M. Fitch, R.M. Manshardt, J.L. Slightom and D. Gonsalves. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *European Journal of Plant Pathology*. 2001, 107, 645-653
  - 30 Dickie, P., L.E. Bryan and M.A.: Pickard. Affect of enzymatic adenylation on dihydrostreptomycin accumulation in *Escherichia coli* carrying an R-factor: model explaining aminoglycoside resistance by inactivating mechanisms. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1978, 14, 569-580
  - 31 Davis, B.D. The lethal action of aminoglycosides. *J. Antimicrob. Chemother*. 1988, 22, 1-3
  - 32 Analysis for potential expression of toxic or allergenic proteins from the functional insertion region of 55-1. (社内報告書)
  - 33 Safety assessment of the neomycin phosphotransferase II (NPTII) protein. (社内報告書)

- 34 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1982, 1, 561-573
- 35 Benfey and Chua 1990 Benfey, P.N. and N-H. Chua. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 1990, 250, 959-966
- 36 Franck, A., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards and L. Hirth. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell.* 1980, 21, 285-294
- 37 DNA sequence determination of the coat protein (functional transgene) insertion site and flanking papaya genomic DNA in hemizygous 55-1 line, Rainbow. (社内報告書)
- 38 Maureen M. M. Fitch<sup>1</sup>, Richard M. Manshardt<sup>1</sup>, Dennis Gonsalves, Jerry L. Slightom and John C. Sanford. Virus resistant papaya plants derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus. *Nature Bio Technology.* 1992, 10, 1466 – 1472
- 39 Timmis, J.N., M.A. Ayliffe, C.Y. Huang and W. Martin. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic genomes. *Nature Rev. Genet.* 2004, 5, 123-135
- 40 Ayliffe, M.A., N.S. Scott and J.N. Timmis. Analysis of plastid DNA-like sequences within the nuclear genomes of higher plants. *Mol. Biol. Evol.* 1998, 15, 738-745
- 41 Toyoshima, Y., Y. Onda, T. Shiina and Y. Nakahira. Plastid transcription in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2005, 24, 59-81
- 42 Sugiura, M., T. Hirose and M. Sugita. Evolution and mechanism of translation in chloroplasts. *Annu. Rev. Genetics.* 1998, 32, 437-459
- 43 PCR analysis for characterization of the functional transgene insertion and flanking papaya genomic DNA in homozygous and hemizygous 55-1. (社内報告書)
- 44 Protein Determination Report. (社内報告書)
- 45 PCR analysis for characterization of the *tetA* fragment/vector insertion and flanking papaya genomic DNA in homozygous 55-1 line, SunUp. (社内報告書)
- 46 Ming R, Hou S, Feng Y, Yu Q, Dionne-Laporte A, Saw JH, et al., The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya Linnaeus*). *Nature.* 2008, 452(7190), 991-996
- 47 DNA sequence determination of the non functional *NPTII* fragment insertion site and flanking papaya genomic DNA of 55-1 line, SunUp. (社内報告書)
- 48 DNA sequence determination of the *tetA* insertion fragment and flanking papaya genomic DNA in hemizygous 55-1 line, Rainbow. (社内報告書)



- 49 Analysis for potential expression from the *tetA* fragment insertion region of 55-1 and its derivatives. (社内報告書)
- 50 Analysis for potential expression of toxic or allergenic proteins from the nonfunctional *nptII* fragment insertion region of 55-1. (社内報告書)
- 51 PRSV coat protein levels of homozygous and hemizygous and line 55-1 transgenic papayas in Hawaii. (社内報告書)
- 52 Expression of NPTII in Transgenic Papaya. (社内報告書)
- 53 Quantification of expressed GUS protein in two generations (R7 & R8) of 55-1 line, transgenic papaya. (社内報告書)
- 54 健康・栄養情報研究会 編,国民健康・栄養の現状~平成 17 年構成労働省国民健康・栄養調査報告より~, 第一出版, 2008.
- 55 Susceptibility of *Papaya ringspot virus* coat protein expressed in transgenic papaya 55-1 to enzymatic digestion in simulated gastric (SGF) and intestinal (SIF) fluids. (社内報告書)
- 56 Nap, J.P., J. Bijvoet and W.J. Stikema. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants: an overview. *Transgenic Crops*. 1992, 1, 239-249.
- 57 Fuchs RL, Astwood JD. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technol*. 1996, 50, 83-88
- 58 Ream, J.E. "Assessment of the *In vitro* digestive fate of  $\beta$ -glucuronidase." Monsanto of Technical Report: MLS-14607, St. Louis, MO, 1996.
- 59 PRSV coat protein heat stability in papaya. (社内報告書)
- 60 Jefferson, R.A. and K.J. Wilson: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Manual B*. 1991, 14, 1-33
- 61 Homology analysis of recombinant PRSV HA CP to predict its potential allergenicity in transgenic 'Rainbow' papaya. (社内報告書)
- 62 Kleter GA, Peijnenburg AA. Screening of transgenic proteins expressed in transgenic food crops for the presence of short amino acid sequences identical to potential, IgE binding linear epitopes of allergens. *BMC Struct. Biol*. 2002, 12(2), 8
- 63 Segal, D. M., J. D. Taurog and H. Metzger. Dimeric immunoglobulin E serves as a unit signal for mast cell degranulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1977, 74, 2993-2997
- 64 Aalberse RC. Structural biology of allergens. *J Allergy Clin. Immunol*. 2000, 106(2), 228-238
- 65 Paterson JC, Garside P, Kennedy MW, Lawrence CE. Modulation of a heterologous immune response by the products of *Ascaris sum*. *Infect Immun*. 2002, 70(11), 6058-6067
- 66 Stability of transgene expression in transgenic 55-1 papaya. (社内報告書)
- 67 Hull R. *Matthew's Plant Virology*. 4th Edition. Academic Press. 2002, 1001
- 68 Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC.

- Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 1994, 15, 13(6), 1482-1491
- 69 Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993, 57(1), 138-163
- 70 Price KE, Godfrey JC. Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. *Adv Appl Microbiol.* 1974, 18(0), 191-307
- 71 Davies J, Smith DI. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. *Annu Rev Microbiol.* 1978, 32, 469-518
- 72 Luckner M. *Secondary Metabolism in Plants and Animals.* London, UK, Chapman and Hall.
- 73 Wilberg, V. C. and D.B. Rodriguez-Amaya. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed Guava, Mango and Papaya. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 1995, 28, 474-480
- 74 Mutsuga, M., H. Ohta, M. Toyoda and Y. Goda. Comparison of carotenoid components between GM and non-GM papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2001, 42(6), 367-73
- 75 Chandrika, U.G., E.R. Jansz, S.M.D.N. Wickramasinghe and N.D. Warnasuriya.: Carotenoids in yellow- and red-fleshed papaya (*Carica papaya L.*). *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 2003, 83(12) 1279-1282
- 76 Yano, M., M. Kato, Y. Ikoma, A. Kawasaki, Y. Fukazawa, M. Sugiura, H. Matsumoto, Y. Oohara, A. Nagao and K. Ogawa. Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan. *Food Science and Technology Research* 2005, 11, 13-18
- 77 Wall, M.M.: Ascorbic acid, vitamin A, and mineral composition of banana (*Musa sp.*) and papaya (*Carica papaya*) cultivars grown in Hawaii. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2006, 19, 434-445