

「耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統」に係る安全性確認(案)

I はじめに

耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名：耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統

性質：耐熱性 α -アミラーゼ産生性

申請者：シンジェンタシート株式会社

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

耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統(以下、「3272 トウモロコシ」という。)は、古細菌 Thermococcales 目の好熱菌の 3 個の α -アミラーゼ遺伝子に由来するキメラ的改変 α -アミラーゼ遺伝子(以下「*amy797E* 遺伝子」という。)と、大腸菌のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子(以下「*pmi* 遺伝子」という。)を導入したものである。産生される耐熱性 α -アミラーゼは、産業利用におけるデンプンの液化工程での高温条件下でも活性を示す。一般に、トウモロコシは主にその穀粒が家畜等の飼料として使用されるほか、エタノール蒸留工程後の残渣も飼料として使用される。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

宿主に用いられた植物は、イネ科トウモロコシ (*Zea*) 属のトウモロコシ (*Zea mays* L.) でありデント種に属する。3272 トウモロコシに導入された *amy797E* 遺伝子は、古細菌 Thermococcales 目の好熱菌の 3 個の α -アミラーゼ遺伝子(参考文献 1)に由来し、*pmi* 遺伝子は、大腸菌 (*Escherichia coli*) のマンノースリン酸イソメラーゼ遺伝子に由来する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるトウモロコシは、世界各国において飼料として長期にわたり利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

宿主であるトウモロコシ及び 3272 トウモロコシの穀粒や茎葉における主要構成成分(タンパク質、脂質、食物繊維、灰分、炭水化物)、2 次代謝産物(フェルラ酸、*p*-クマル酸、フルフラール、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)の量は明らかになっている。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

3272 トウモロコシは主にエタノール生産に使用される予定であり、エタノール蒸留工程後の残渣(DDGS)は、家畜等の飼料として使用される。既存のトウモロコシもエタノール蒸

42 留工程後の残渣が家畜の飼料として使用されている。①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂
43 取（可食）部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について既存のトウモロコシと相
44 違はない。

45
46 以上（１）～（４）により、3272 トウモロコシの飼料としての安全性を評価するために、
47 既存のトウモロコシを比較対象として用いる方法が適用できると判断された。

48 49 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

50 3272 トウモロコシは主に穀粒からのエタノール生産に使用されるが、エタノール蒸留工程
51 後の残渣(DDGS)はタンパク質、繊維及び脂肪分に富むため、家畜等の飼料として使用される。

52 53 3 宿主に関する事項

54 (1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

55 宿主は、イネ科トウモロコシ (*Zea*) 属のトウモロコシ (*Zea mays* L.) でありデント種
56 に属する。

57 58 (2) 遺伝的先祖に関する事項

59 一般には、紀元前 5000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられ、育種過程
60 において近縁野生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（参考文
61 献 2）。

62 63 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

64 トウモロコシには、栄養学的に有害と考えられる有害生理活性物質の生産は知られていな
65 い（参考文献 3）。

66 67 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

68 トウモロコシが家畜等に寄生又は定着するという報告はされていない。

69 70 (5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

71 トウモロコシに感染する病原体は知られているが（参考文献 4）、家畜等に対する病原
72 性は報告されていない（参考文献 5）。

73 74 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

75 トウモロコシは栽培作物であり、自然環境で生存又は繁殖したという報告はされていない。

76 77 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

78 トウモロコシの栽培時期は品種、地域及び栽培形態によって異なるが、主に春に播種され
79 て秋に収穫される（参考文献 6）。

80 トウモロコシの近縁種はブタモロコシとトリプサカム属であるが、トウモロコシと自然
81 交雑可能なのはブタモロコシのみである（参考文献 4）。我が国ではテオシントは自生し
82 ていないので 3272 トウモロコシとの交雑性は考えられない。

- 83
- 84 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項
- 85 トウモロコシの栽培起源は、およそ紀元前 5000 年のメキシコあるいはグアテマラと考え
- 86 られ、現在、北緯 58 度から南緯 40 度に至る範囲で世界的に栽培されている（参考文献
- 87 7）。このような栽培の歴史を通じて、トウモロコシは世界的に飼料として利用されている。
- 88
- 89 (9) 飼料の安全な利用に関する事項
- 90 上記（8）のとおり、トウモロコシは飼料として安全に利用されている。
- 91
- 92 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項
- 93 トウモロコシは、栽培作物として適するよう人為的に高度に改良された作物であり、人為
- 94 的介入がなければ、生存、増殖することはできない（参考文献 4、6、8、9）。
- 95
- 96 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項
- 97 トウモロコシと交雑可能な近縁種はブタモロコシとトリプサカム属であるが、いずれも有
- 98 害生理活性物質の生産は報告されていない（参考文献 8、10）。
- 99
- 100 4 ベクターに関する事項
- 101 (1) 名称及び由来に関する事項
- 102 3272 トウモロコシの作出に用いたベクター pNOV7013 は、Danisco Biotechnology 社の
- 103 バイナリー・ベクター pVictor に由来する。
- 104
- 105 (2) 性質に関する事項
- 106 pNOV7013 の全塩基数は 11,439bp であり、その塩基配列は明らかにされている。既知
- 107 の有害塩基配列を含まない（参考文献 11）。
- 108
- 109 (3) 薬剤耐性に関する事項
- 110 pNOV7013 には、抗生物質耐性マーカーとして *E. coli* Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が含まれ
- 111 ているが、3272 トウモロコシには、*aadA* 遺伝子は含まれていないことが確認されている。
- 112
- 113 (4) 伝達性に関する事項
- 114 PmNOV7013 には、伝達性に関与する *Pseudomonas* 由来の VS1ori（参考文献 12）、*E.*
- 115 *coli* 由来の ColE1ori（参考文献 13）及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium*
- 116 *tumefaciens*)由来の *virG*（参考文献 14）が含まれる。
- 117
- 118 (5) 宿主依存性に関する事項
- 119 pNOV7013 の伝達可能な宿主域は、*Pseudomonas* 属菌、*R. radiobacter* (*A.*
- 120 *tumefaciens*)、*R. leguminosarum* とそれらの近縁細菌種及び単・双子葉植物種であり、家
- 121 畜等が宿主となることはないと考えられる。
- 122
- 123 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

124 Danisco Biotechnology 社のバイナリー・ベクターpVictor を基に、*pmi* 遺伝子発現カセ
125 ット断片 ([ZmUbiInt プロモーター]-[*pmi* 遺伝子]-[NOS ターミネーター]) を導入し、さ
126 らに、*amy797E* 遺伝子発現カセット断片 ([GZein プロモーター]-[*amy797E* 遺伝子]-
127 [PEPC intron#9]-[35S ターミネーター]) を導入し、pNOV7013 を作成した (参考文献
128 15)。

129

130 (7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

131 pNOV7013 の宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられた。

132

133 5 挿入遺伝子に関する事項

134 (1) 供与体に関する事項

135 ①名称、由来及び分類に関する事項

136 *amy797E* 遺伝子は、古細菌 Thermococcales 目の好熱菌の 3 個の α -アミラーゼ遺伝
137 子(BD5031、BD5063 及び BD5064)に由来するキメラ的改変遺伝子(参考文献 1)である。
138 3 個の遺伝子のうち、BD5031 と BD5064 は浅い海洋熱水系の 95°C で pH7.0 の場所と
139 85°C で pH6.0 の場所から、それぞれ採取された *Thermococcus* 種の DNA ライブラリー
140 から単離された。また、BD5063 は、深海太平洋の 90°C で pH6.5 の場所から単離された
141 未同定の好熱菌の DNA ライブラリーから単離されたもので、その配列比較から
142 Thermococcales 目に属する *Pyrococcus* 種か、または *Thermococcus* 種のどちらかと考
143 えられている(参考文献 1)。

144 *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
145 コードする *manA* 遺伝子である(参考文献 16)。

146

147 ② 安全性に関する事項

148 *amy797E* 遺伝子の供与体である古細菌 Thermococcales 目の好熱菌に対する家畜等の
149 食経験は知られていない。しかし、 α -アミラーゼは、多くの植物(参考文献 17)や動物を
150 含め、自然界において真核生物や原核生物に幅広く存在しており、家畜等は飼料を通じて
151 多くの微生物及び動植物由来の多様な α -アミラーゼとその遺伝子を摂取している。

152 *pmi* 遺伝子の供与体である *E. coli* は自然界や動物の消化器官に広く存在していること
153 が知られており、これまで家畜等は飼料を通じて間接的に摂取している。また、*pmi* 遺
154 伝子の供与体である *E. coli* K-12 株について、動物に対する毒性は否定されている(参考
155 文献 18、19、20、21)。

156

157 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

158 pNOV7013 は、バイナリー・ベクターpVictor に、*pmi* 遺伝子発現カセット断片及び
159 *amy797E* 遺伝子発現カセット断片を導入して作成された。宿主への導入方法にはアグロ
160 バクテリウム法が用いられ、導入後はマンノースを添加した培地で形質転換体を選抜した。

161

162 (3) 構造に関する事項

163 *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 27 kDa 貯蔵タンパ

164 ク質遺伝子由来の GZein プロモーター (参考文献 22)である。 *pmi* 遺伝子発現カセットの
 165 プロモーターは、トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域までを
 166 含む ZmUbiInt プロモーター(参考文献 23)である。

167 *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
 168 35S RNA 由来のポリアデニル化シグナルを含む 35S ターミネーター(参考文献 24)であり、
 169 *pmi* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、 *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) の
 170 nopaline synthase 遺伝子由来のポリアデニル化シグナルを含む NOS ターミネーター(参
 171 考文献 25)である。

172 pNOV7013 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害な塩基
 173 配列を含んでいない。

174
 175 (4) 性質に関する事項
 176 表 1 にまとめた。

177
 178 表 1 発現ベクター pNOV7013 の各構成 DNA の由来及び機能

構成 DNA	由来及び機能
<i>amy797E</i> 遺伝子発現カセット	
GZein プロモーター	トウモロコシの 27 kDa 貯蔵タンパク質(<i>zein</i>)遺伝子由来の胚乳特異的プロモーター配列(参考文献 22)。
<i>amy797E</i>	古細菌 Thermococcales 目の好熱菌の 3 個の α -アミラーゼ遺伝子に由来するキメラ的改変遺伝子で、耐熱性の AMY797E α -アミラーゼをコードしている(参考文献 1)。なお、発現タンパク質が小胞体に輸送・蓄積されるように、トウモロコシ由来の 19 個のアミノ酸から成る γ -ゼインシグナル配列(GZein ss)と、6 個のアミノ酸から成る小胞体残留シグナル配列(ER rs)が、その N-末端と C-末端にそれぞれ付加されている(参考文献 26、48)。
PEPC intron #9	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(参考文献 27)で、種子(穀粒)における目的遺伝子の発現を高めるために用いた。
35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルスの 35S RNA 由来の転写終結を指令するポリアデニル化シグナルを含む配列(参考文献 24)。
<i>pmi</i> 遺伝子発現カセット	
ZmUbiInt プロモーター	トウモロコシの polyubiquitin 遺伝子由来の第一イントロン領域(1,010 bp)までを含む単子葉植物用プロモーター配列 (参考文献 23)。
<i>pmi</i>	<i>E. coli</i> K-12 株由来の <i>manA</i> 遺伝子で(参考文献 16)、形質転換体の選抜マーカーであるマンノースリン酸イソメラーゼをコードする(参考文献 28)。 <i>pmi</i> 遺伝子が導入されて PMI タンパク質を産生する細胞では、マンノースを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ので、マンノースを組織培養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。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) の nopaline synthase 遺伝子由来の転写終結を指令するポリアデニル化シグナルを含む配列(参考文献 25)。

179
 180 (5) 純度に関する事項
 181 pNOV7013 は、その T-DNA の外骨格領域に細菌選抜マーカー遺伝子として *spec* (*aadA*
 182 遺伝子)を有しており、細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223

(6) 安定性に関する事項

3272 トウモロコシの 4 つの世代を用いて、各戻し交雑世代における挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した結果、挿入遺伝子はメンデルの分離法則に基づいて遺伝していることが示された(参考文献 29)。

また、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の結果、挿入遺伝子は後代世代に安定して遺伝していることが示された(参考文献 30)。

(7) コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、3272 トウモロコシのゲノムには、発現ベクター pNOV7013 由来の 1 コピーの完全な *amy797E* 遺伝子発現カセットと *pmi* 遺伝子発現カセットから成る挿入遺伝子が組み込まれており、発現ベクター pNOV7013 の T-DNA 領域外の外骨格領域は存在しないことが示された(参考文献 31)。

また、PCR分析の結果より、挿入遺伝子の両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(参考文献32)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

ELISA 法による分析の結果、AMY797E α -アミラーゼの乳熟期から収穫期までの穀粒における発現量の平均分析値の範囲は、838~1,627 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重(1,004~3,365 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)であったが、葉、根及び花粉ではいずれも発現はほぼ認められなかった。したがって、AMY797E α -アミラーゼの発現が穀粒特異的であることが確認された(参考文献 33)。

また、PMI タンパク質の発現量の平均分析値の範囲は、生育期から収穫期までの葉で定量限界値(LOQ)以下~5.0 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重(<LOQ~17.1 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、生育期から収穫期までの根で<0.1~0.8 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重(<0.6~5.3 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、開花期の花粉で 8.0~8.5 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重(17.0~18.2 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)、乳熟期から収穫期までの穀粒で<0.4~0.8 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重(<0.5~1.8 $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)であった(参考文献 33)。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

3272 トウモロコシに抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことは、サザンブロット分析によって確認されている(参考文献 31)。

(10) 外来の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

InforMax の VNTi(Ver9.0)を用いた解析の結果から、導入遺伝子と両近傍配列の接合部に計 7 個のオープンリーディングフレームが検出された(参考文献 34)。このオープンリーディングフレームの翻訳アミノ酸配列について、既知毒素及び既知アレルゲンとの相同性検索を行い、有意な相同性がないことを確認した。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

3272 トウモロコシでは、挿入された *amy797E* 遺伝子と *pmi* 遺伝子によって、

224 AMY797E α -アミラーゼと PMI タンパク質が発現している。

225

226 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

227 ①AMY797E α -アミラーゼ

228 AMY797E α -アミラーゼと既知毒性タンパク質との構造相同性を確認するため、
229 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (参考
230 文献 35)及び blastp search program (version 2.2.6) (参考文献 36)を用いて検索を行った
231 (参考文献 37)。その結果、AMY797E α -アミラーゼと有意な構造相同性を持つ既知毒素
232 はないことが示された。

233 加えて、マウスを用いた単回投与毒性試験も行われているが、AMY797E α -アミラー
234 ゼ(正味投与量：1,511 mg/kg)に起因する毒性影響は認められなかった(参考文献 38)。

235

236 ②PMI タンパク質

237 PMI タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性について、AMY797E α -アミ
238 ラーゼと同様の手法を用いて評価した(参考文献 39)。その結果、PMI タンパク質と有意
239 な構造相同性を持つ既知毒素はないことが示された。

240 加えて、マウスを用いた単回投与毒性試験も行っているが、PMI タンパク質(正味投与
241 量：3,030mg/kg)に起因する毒性影響は認められなかった(参考文献 40)。

242

243 (3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

244 3272 トウモロコシ穀粒中の AMY797E α -アミラーゼの産生量は高く、穀粒からの抽出
245 が容易であったため、AMY797E α -アミラーゼは 3272 トウモロコシの穀粒から直接抽出
246 した。

247 一方、PMI タンパク質は 3272 トウモロコシにおける産生量は極めて微量で、以下の物理
248 化学的処理に対する感受性評価試験等に必要な量を 3272 トウモロコシから抽出することが
249 極めて困難であったため、*E. coli* 過剰発現系で産生・抽出したものをを用いた

250 *E. coli* 過剰発現系由来の PMI タンパク質は、3272 トウモロコシで発現する PMI タンパ
251 ク質と同様の酵素活性、免疫学的反応を有していた(参考文献 41)。したがって、以下の物理
252 化学的処理に対する感受性評価試験や単回投与毒性試験に、*E. coli* 過剰発現系由来の PMI
253 タンパク質を用いても、結果に影響を及ぼすことはないと判断した。

254

255 ①人工胃液に対する感受性

256 (i) AMY797E α -アミラーゼ

257 AMY797E α -アミラーゼ標品の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析
258 とウエスタンブロット分析で評価した(参考文献 42)。その結果、反応開始 1 分後には
259 完全な AMY797E α -アミラーゼのバンドは検出されなくなり、新たに AMY797E α
260 -アミラーゼの分解産物である 2 本のペプチド断片のバンドが検出された。さらに、
261 反応開始 5 分後にはペプチド断片のバンドも検出されなくなり、ウエスタンブロット
262 分析でも反応開始 5 分後で AMY797E α -アミラーゼと免疫応答性を示すバンドは検
263 出されなかった。

264

265 (ii) PMI タンパク質
266 PMI タンパク質の人工胃液(SGF)中での消化性を SDS-PAGE 分析によって評価した
267 (参考文献 43)。その結果、PMI タンパク質は、反応開始直後から容易に分解され、標
268 準よりも 1/1000 倍低いペプシン濃度の SGF 中でも 2 分間の反応で小さな断片に分解
269 された。また、1/10000 倍希釈のペプシン濃度の SGF を用いた経時的な消化実験にお
270 いても、反応開始 10 分後には小さな断片に分解され、反応開始 60 分後にはそれらの
271 断片も検出されなかった。

272
273 ②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

274 (i) AMY797E α -アミラーゼ
275 AMY797E α -アミラーゼ標品の人工腸液(SIF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析と
276 ウェスタンブロット分析で評価した(参考文献 44)。その結果、AMY797E α -アミラー
277 ゼは反応開始後 60 分では分解されなかった。

278
279 (ii) PMI タンパク質
280 PMI タンパク質の人工腸液(SIF)中での消化性を SDS-PAGE 分析とウェスタンブ
281 ット分析で評価した(参考文献 43、45)。その結果、PMI タンパク質は標準の SIF にお
282 いて、2 分間の反応で容易に分解することが示された。さらに 1/10 倍の SIF 反応開始
283 において、30 分後には、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析の両方で、
284 PMI タンパク質に由来するバンドは検出されなくなり、1/100 倍の SIF 反応開始にお
285 いて経時的(反応開始 0~30 分)に分解することが示された。

286
287 ③加熱処理

288 (i) AMY797E α -アミラーゼ
289 3272 トウモロコシで産生される AMY797E α -アミラーゼは耐熱性 α -アミラーゼ
290 であり、高温条件下で最大活性を示すことが確認されているため(参考文献 46)、本評価
291 は行わなかった。

292
293 (ii) PMI タンパク質
294 酵素活性検定及び ELISA 分析による加熱処理感受性の評価の結果、PMI タンパク
295 質は 95°C で 30 分間の静置で完全に酵素活性及び免疫応答活性を失うことが確認された
296 (参考文献 47)。

297
298 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

299 ①AMY797E α -アミラーゼ
300 3272 トウモロコシにおける AMY797E α -アミラーゼは種子で特異的に産生されて小
301 胞体中に蓄積されるようになっている(参考文献 26、48)。一方、種子中のデンプンは非
302 水溶性顆粒として異なる細胞内器官であるアミロプラスト中で合成・貯蔵される(参考文
303 献 49、50、51)。

304 以上のことから、3272 トウモロコシにおける AMY797E α -アミラーゼの発現が、宿
305 主植物の代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345

②PMI タンパク質

pmi 遺伝子によって発現する 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(参考文献 52)。

以上のことから、3272 トウモロコシにおける PMI タンパク質の発現が、宿主植物の代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

2003 年及び 2004 年に、3272 トウモロコシと対照の非組換えトウモロコシについて成分分析が行われた(参考文献 53)。2003 年の栽培試験には、3272 トウモロコシのハイブリッド 2 系統(以下「ハイブリッド A1」及び「ハイブリッド B1」と記す。)と、非組換えトウモロコシのハイブリッド 2 系統を用いた。2004 年の栽培試験には、3272 トウモロコシのハイブリッド(以下「ハイブリッド B3」と記す。)と、非組換えトウモロコシのハイブリッドを用いた。

また、3272 トウモロコシを用いた DDGS の成分量について報告(参考文献 54)をもとに考察を行った。

①穀粒、茎葉における主要構成成分及びミネラル成分の分析結果

穀粒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)及びミネラル成分(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、セレンウム)の分析を行った。

その結果、穀粒の主要構成成分では、ハイブリッド A1 では灰分で、ハイブリッド B1 ではタンパク質、炭水化物、総食物繊維(TDF)及びデンプンで、ハイブリッド B3 では酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)及び総食物繊維(TDF)で、非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であり、また供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した整合性は見られなかった。

茎葉の主要構成成分では、ハイブリッド B1 ではタンパク質と ADF で、ハイブリッド B3 では炭水化物で、非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であり、また供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した整合性は見られなかった。

穀粒のミネラル成分では、ハイブリッド B1 のマンガンを非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の範囲内であり、また供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した整合性は見られなかった。

茎葉のミネラル成分では、ハイブリッド B1 の鉄で非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した整合性

346 は見られなかった。

347

348 ②穀粒におけるビタミン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析結果

349 穀粒のビタミン類 (β -カロテン、クリプトキサンチン、葉酸、ビタミン B1 (チアミン)、
350 ビタミン B2 (リボフラビン)、ナイアシン、ビタミン B6 (ピリドキシン)、ビタミン C、ビ
351 タミン E (トコフェロール))、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析を行った。

352 穀粒のビタミン類では、ハイブリッド A1 ではビタミン B6 で、ハイブリッド B1 では
353 ビタミン B1 で、ハイブリッド B3 ではビタミン B6 で、非組換えトウモロコシとの間で
354 統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、一般の商業トウモロコシ品種で報告されてい
355 る文献値の範囲内であり、また供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した整合性は見られ
356 なかった。

357 穀粒のアミノ酸組成では、ハイブリッド B1 ではメチオニンとチロシンを除いた残り
358 16 種類のアミノ酸の全てで、ハイブリッド B3 ではトリプトファンで、非組換えトウモ
359 ロコシとの間で統計学的有意差($p<5.0\%$)が認められたが、一般の商業トウモロコシ品種
360 で報告されている文献値の範囲内であり、また供試材料間あるいは栽培年度間で一貫した
361 整合性は見られなかった。

362 穀粒の脂肪酸組成では、3272 トウモロコシと非組換えトウモロコシとの間で統計学的
363 有意差は認められなかった。

364

365 ③穀粒における 2 次代謝産物及び抗栄養素の分析結果

366 穀粒の 2 次代謝産物及び抗栄養素 (イノシトール、フィチン酸、ラフィノース、トリ
367 プシンインヒビター、フェルラ酸、 p -クマル酸、フルフラール) の分析を行ったところ、
368 ハイブリッド B3 のイノシトールとフェルラ酸で、非組換えトウモロコシとの間で統計学
369 的有意差($p<5.0\%$)が認められた。ハイブリッド A1 と B1 では、いずれもイノシトールと
370 フェルラ酸に統計学的有意差は認められず、供試材料間で一貫した整合性は見られなかつ
371 た。また、フェルラ酸に関しては一般の商業トウモロコシ品種で報告されている文献値の
372 範囲内であった。

373

374 ④DDGSの成分量

375 従来の特ウモロコシ穀粒に3272トウモロコシ穀粒を3%の割合で混合し、DDGSの主要
376 構成成分である、粗タンパク質、粗脂質、粗繊維及び灰分を分析した報告 (参考文献
377 54) によれば、いずれの成分分析値も、市販されているDDGSの範囲内であった。なお、
378 3272トウモロコシの混合サンプルと比較対照のどちらにおいても、DDGSでの残留アミ
379 ラーゼ活性は検出されなかった。

380

381 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

382 米国で行われた野外ほ場試験を通じて、3272 トウモロコシの生存・増殖能力(種子休眠性、
383 生育初期の低温耐性、成体の越冬性及び種子の生産量・脱粒性)は、非組換えトウモロコシ
384 と同程度であった。

385

- 386 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
387 3272 トウモロコシの生殖・増殖能力は従来の非組換えトウモロコシと同様であると考え
388 られる。
389
390 (8) 不活化法に関する事項
391 3272 トウモロコシも従来の非組換えトウモロコシと同様に、物理的防除(耕転)や化学的
392 防除(感受性を示す除草剤の使用)等、トウモロコシを枯死させる従来の方法で不活化される。
393
394 (9) 外国における認可等に関する事項
395 米国食品医薬品庁(FDA)より 2007 年 8 月に、食品・飼料としての安全性が確認された。
396 カナダ食品検査庁 (CFIA) より 2008 年 3 月に飼料としての安全性が確認された。
397 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ) より 2008 年 3 月に、食品と
398 しての安全性が確認された。欧州連合(European Union) へは 2006 年 2 月に、食品・飼料
399 としての輸入のための申請を行った。
400
401 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
402 栽培方法に関して従来のトウモロコシとの相違はない。
403
404 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項
405 3272 トウモロコシにおける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
406 相違はない。
407
408 7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次
409 に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項
410 該当しない。
411

412 IV 審議結果

413 耐熱性 α -アミラーゼ産生トウモロコシ 3272 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及
414 び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確
415 認を行って差し支えないと判断された。
416

417 V 提出資料で引用された参考文献

- 418 1 Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J.
419 Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database
420 search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.
421 2 *Bacillus thuringiensis* Toxin Nomenclature Committee. 2007.
422 http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/
423 3 Chen, B. Y., W. K. Heneen and V. Simonsen (1989) Comparative and genetic studies of
424 isozymes in resynthesized and cultivated *Brassica napus* L., *B. campestris* L. and *B.*
425 *alboglabra* Bailey. *Theoret. Appl. Genet.*, 77: 673-679.
426 4 Christensen, A. H., R. A. Sharrock and P. H. Quail (1992). Maize polyubiquitin genes:

- 427 structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter
428 activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18:
429 675-689.
- 430 5 Deacon, A., Y. Ni, W.G. Coleman Jr., and S.E. Ealick (2000). The crystal structure of
431 ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase: catalysis with a twist. *Structure*, 8: 453-462.
- 432 6 Davis, J. A., X. H. Wu, L. Wang, C. DeRossi, V. Westphal, R. Wu, G. Alton, G. Srikrishna
433 and H. H. Freeze (2002) Molecular cloning, gene organization, and expression of mouse
434 Mpi encoding phosphomannose isomerase. *Glycobiology.*, 12: 435-442
- 435 7 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman (1982) Nopaline
436 synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Molecular Applied Genetics*, 1:
437 561-573.
- 438 8 Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G.
439 (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide
440 spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5389-
441 5394.
- 442 9 FAO (2007) Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
443 <http://faostat.fao.org/>.
- 444 10 FAO/WHO (2001) Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a
445 joint Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO) expert
446 consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. January 22 – 25, 2001.
447 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- 448 11 FARRP (2001) Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Database,
449 version 1.02, www.allergenonline.com, last updated Feb. 12, 2002.
- 450 12 Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7
451 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase.
452 *Nucleic Acids Research*, 13: 7095-7106.
- 453 13 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide
454 sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21, 285-294.
- 455 14 Freeze, H. H. (2002) Phosphomannose isomerase. *In*: Handbook of glycosyltransferases
456 and related genes. Edition 1. Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Eds; Springer-
457 Verlag, Tokyo and New York, pp. 595-599.
- 458 15 Fujiki, Y., Y. Yoshikawa, T. Sato, N. Inada, M. Ito, I. Nishida and A. Watanabe (2001)
459 Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and
460 repressed by sugars. *Physiol. Plantarum*, 111: 345-352.
- 461 16 Galinat, W. C. (1988) The origin of corn. *In*: Corn and corn improvement. G.F Sprague and
462 J.W. Dudley, Eds. Agronomy Monographs No.18; pp. 1-31. American Society of Agronomy:
463 Madison, Wisconsin.
- 464 17 Goldsworthy, A. and H. E. Street (1965) The carbohydrate nutrition of tomato roots VIII.
465 The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Ann.*
466 *Bot.*, 29: 45-58.
- 467 18 配合飼料供給安定機構 (2006) <http://mf-kikou.lin.go.jp/seisan/seisan.htm>

- 468 19 畑作全書 (1981) 農文協会編. 農村漁村文化協会.
- 469 20 Herold, A. and D. H. Lewis (1977) Mannose and green plants: occurrence, physiology and
470 metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate. *New Phytol.*, 79: 1-40.
- 471 21 Hileman, R. E., A. Silvanovich, R. E. Goodman, E. A. Rice, G. Holleschak, J. D. Astwood
472 and S. L. Hefle (2002) Bioinformatic methods of allergenicity assessment using a
473 comprehensive allergen database. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 128: 280-291.
- 474 22 Hilger, C., F. Grigioni, L. Thill, L. Mertens and F. Hentges. (2002) Severe IgE-mediated
475 anaphylaxis following consumption of fried frog legs: Definition of alpha-parvalbumin as
476 the allergen in cause. *Allergy*, 57: 1053-1058.
- 477 23 Hudspeth, R.L. and Grula, J.W. (1989). Structure and expression of the maize gene
478 encoding the phosphoenolpyruvate carboxylase isozyme involved in C4 photosynthesis.
479 *Plant Molecular Biology*, 12, 579-589.
- 480 24 ILSI (2006) International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 3.0.
481 <http://www.cropcomposition.org>.
- 482 25 International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee
483 (2001) <http://www.allergen.org/List.htm>.
- 484 26 Itoh, T. and J. Tomizawa (1978) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA
485 polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. Cold Spring Harbor Symposium on
486 Quantitative Biology, 43: 409-418.
- 487 27 Jang, J. C. and J. Sheen (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, 6: 1665-1679.
- 488 28 Jang, J. C. and J. Sheen (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 2: 208-
489 214.
- 490 29 Joersbo, M., J. Brunsttdt and S. G. Peterson (1997) Sequence 1 from Patent WO09720937.
491 GenBank Accesion No. A63583; *Cyamopsis tetragono loba* (guar).
- 492 30 Joersbo, M., S. G. Petersen and F. T. Okkels (1999) Parameters interacting with mannose
493 selection employed for the production of transgenic sugar beet. *Physiol. Plant.*, 105: 109-
494 115.
- 495 31 Joersbo, M. (2001) Advances in the selection of transgenic plants using non-antibiotic
496 resistance marker genes. *Physiol. Plant.*, 111: 269-272.
- 497 32 Kara, N., L. Korol, K. Isik and G. Schiller (1997) Genetic diversity in *Pinus brutia* Ten.:
498 altitudinal variation. *Silvae Genetica*, 46: 155-161.
- 499 33 菊池一徳 (1987) トウモロコシの生産と利用. 光琳.
- 500 34 Kneidinger, B., C. Marolda, M. Graninger, A. Zamyatina, F. McArthur, P. Kosma, M.
501 Valvano, and P. Messner (2002). Biosynthesis pathway of ADP-L-glycerol- β -D-manno
502 Heptose in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184(2): 363-369.
- 503 35 Komari T, Y. Hiei, Y. Saito, N. Murai and Kumashiro T. (1996). Vectors carrying two
504 separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium*
505 *tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.* 10:
506 165-174.
- 507 36 Lee, B. T. and N. K. Matheson (1984) Phosphomannoisomerase and phosphogluco-
508 isomerase in seeds of *Cassia coluteoides* and some other legumes that synthesize

- 509 galactomannan. *Phytochem.*, 23: 983-987.
- 510 37 Lee, M., F. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J. Chen (2003). The mode of action of the
511 *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -
512 endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4648-4657.
- 513 38 Levy, S. B., Marshall, B., Rowse-Eagel, D. and Onderdonk, A. (1980) Survival of
514 *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*, 209:391-394.
- 515 39 Lucca, P., X. D. Ye and I. Potrykus (2001) Effective selection and regeneration of
516 transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molec. Breeding*; 7: 43-49.
- 517 40 Malvolti, M. E., M. Paciucci, F. Cannata and S. Fineschi (1993) Genetic variation in Italian
518 populations of *Juglans regia* L. *Acta Hort.*, 311: 86-94.
- 519 41 Markovitz, A., R. J. Sydiskis and M. Lieberman (1967) Genetic and biochemical studies on
520 mannose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in
521 *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 94: 1492-1496.
- 522 42 Martelli, G.P. (2001) Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J.*
523 *Plant Pathol.* 82:37-46.
- 524 43 Miles, J. S. and J. R. Guest (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of
525 the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.
- 526 44 Miller, W. B. (1989) Identification of free mannose and partial characterization of a
527 mannose-6-phosphate isomerase from *Lilium longiflorum* bulbs. *Physiologia Plantarum*,
528 77: 123-128.
- 529 45 Morgan, D. R. and H. E. Street (1959) The carbohydrate nutrition of tomato roots. VII.
530 Sugars, sugar phosphates and sugar alcohols as respiratory substrates for excised roots.
531 *Ann. Bot.*, 23: 89-105.
- 532 46 Muhldorfer, I. and Hacker, J. (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence.
533 *Microbial Pathogenesis*, 16:171-81.
- 534 47 Murray, E. E., J. Lotzer and M. Eberle (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids*
535 *Research*, 17: 477-498.
- 536 48 Naczk, M., Amarowicz, R. and F. Shahidi (1997) α -Galactosides of Sucrose in Foods:
537 Composition, Flatulence-Causing Effects, and Removal. *In: Antinutrients and*
538 *Phytochemicals in Foods.* Shahidi, F., Ed; American Chemical Society, Washington D.C.
- 539 49 NCBI (2003) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein
540 Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- 541 50 NCBI (2007) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein
542 Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)
- 543 51 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen (2000) The use of
544 phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea*
545 *mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803.
- 546 52 農学大辞典 (1994) 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 養賢堂.
- 547 53 OECD (2002) Consensus document on compositional considerations for new varieties of
548 maize (*Zea mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant
549 metabolites. Publication No. 6, 2002. ENV/JM/MONO(2002)25.

- 550 54 OECD (2003) CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF *ZEA MAYS* SUBSP.
551 *MAYS* (MAIZE). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.
552 27. Env/JM/MONO(2003)11.
- 553 55 Pearson, W. R. and D. J. Lipman (1988) Improved tools for biological sequence
554 comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 2444-8.
- 555 56 Proudfoot, A. E. I., M. A. Payton and T. N. C. Wells (1994a) Purification and
556 characterization of fungal and mammalian phosphomannose isomerases. *J. Protein*
557 *Chem.*, 13: 619-627.
- 558 57 Proudfoot, A. E. I., G. Turcatti, T. N. C. Wells, M. A. Payton and D. J. Smith (1994b)
559 Purification, cDNA cloning and heterologous expression of human phosphomannose
560 isomerase. *Eur. J. Biochem.*, 219: 415-423.
- 561 58 Reed, J., L. Privalle, M. L. Powell, M. Meghji, J. Dawson, E. Dunder, J. Suttie, A. Wenck, K.
562 Launis, C. Kramer, Y.-F. Change, G. Hansen and M. Wright (2001) Phosphomannose
563 isomerase: An efficient selectable marker for plant transformation. *In Vitro Cell. Dev.*
564 *Biol. - Plant*, 37: 127-132.
- 565 59 Rickard, S.E. and L. U. Thompson (1997) Interactions and Biological Effects of Phytic
566 Acid. *In: Antinutrients and Phytochemicals in Foods.* Shahidi, F., Ed; American
567 Chemical Society, Washington D.C.
- 568 60 Sanger, F., Coulson, A. R., Hong, G. F., Hill, D. F., and Petersen, G. B. (1982).
569 Nucleotide Sequence of Bacteriophage λ DNA. *Journal of Molecular Biology*, 162, 729-773.
- 570 61 Shahidi, F. (1997) Beneficial Health Effects and Drawbacks of Antinutrients and
571 Phytochemicals in Foods. *In: Antinutrients and Phytochemicals in Foods.* Shahidi, F.,
572 Ed; American Chemical Society, Washington D.C.
- 573 62 Shen, W., Das, S., and Hohn, B. (1992). Mechanism of *Ds1* excision from the genome of
574 maize streak virus. *Molecular and General Genetics*, 233, 388-394.
- 575 63 Smith, H. W. (1975) Survival of orally administered *E. coli* K-12 in alimentary tract of man.
576 *Nature*, 255:500-502.
- 577 64 Sprague, G. F. and J.W. Dudley. (1988) The Origin of Corn pp.1-31: Corn and Corn
578 Improvement Third Edition. Agronomy No.18 American Society of Agronomy, Madison,
579 Wisconsin
- 580 65 Stein, J. C. and G. Hansen (1999) Mannose induces an endonuclease responsible for DNA
581 laddering in plant cells. *Plant Physiol.*, 121: 71-79.
- 582 66 Stenlid, G. (1954) Toxic effects of D-mannose, 2-desoxy- D-glucose and D-glucosamine upon
583 respiration and ion absorption in wheat root. *Physiol. Plant.*, 7: 173-181.
- 584 67 Stothard, P. (2000). The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for
585 analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*, 28: 1102-1104.
- 586 68 Strickberger, M. W. (1976) Probability and statistical testing. Genetics. (2nd ed., pp. 140-
587 163). New York: Macmillan Publishing Company.
- 588 69 SWISS-PROT Protein Knowledgebase (2001). Nomenclature and index of allergen
589 sequences. <http://us.expasy.org/cgi-bin/lists?allergen.txt>. (2002) Swiss Institute of
590 Bioinformatics; Geneva, Switzerland and European Bioinformatics Institute; Hinxton,

- 591 United Kingdom.
- 592 70 Szybalski, E.H. and Szybalski, W. (1979). A Comprehensive Molecular Map of
593 Bacteriophage Lambda. *Gene*, 7, 217-270.
- 594 71 Thomas, M.R., Matsumoto, S., Cain, P. & Scott, N.S. (1993) Repetitive DNA of grapevine:
595 classes present and sequences suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied*
596 *Genetics*, 86: 173-180.
- 597 72 Todd, R. and B. W. Tague (2001) Phosphomannose isomerase: a versatile selectable
598 marker for *Arabidopsis thaliana* germ-line transformation. *Plant Mol. Biol. Reporter.*,
599 19: 307-319.
- 600 73 US EPA (1997) *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment.
601 www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm
- 602 74 US EPA (2004) Phosphomannose Isomerase and the Genetic Material Necessary for its
603 Production in All Plants; Exemption from the Requirement of a Tolerance. 40 CFR Part
604 180. *Fed. Reg.* 69(94): 26770–26775, May 14, 2004.
- 605 75 United States Pharmacopoeia, The National Formulary (1990) USP XXII, NF XVII, U.S.
606 Pharmacopoeial Convention, Inc., Mack Printing Co., Easton, PA, p. 1788.
- 607 76 Valvano, M.A., P. Messner, and P. Kosma (2002). Novel pathways for biosynthesis of
608 nucleotide-activated *glycerol-manno*-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell
609 surface polysaccharides. *Microbiology*, 148: 1979-1989.
- 610 77 Watson, S.A. (1987) Structure and Composition. *In* Corn: Chemistry and Technology. S.
611 A. Watson and P.E. Ranstead (eds). American Association of Cereal Chemists, Minnesota.
- 612 78 White, P. J. and L. M. Pollak (1995) Corn as a food source in the United States: Part II.
613 Processes, Products, Composition and Nutritive values. *Cereal Foods World*, 40: 756-762.
- 614 79 Wright, M., J. Dawson, E. Dunder, J. Suttie, J. Reed, C. Kramer, Y. Chang, R. Novitzky, H.
615 Wang and L. Artim-Moore (2001) Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.)
616 and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, *pmi*, as the
617 selectable marker. *Plant Cell Rep.*, 20: 429-436.
- 618 80 Zhang, P., I. Potrykus and J. Puonti-Kuerlas (2000) Efficient production of transgenic
619 cassava using negative and positive selection. *Transgenic Research*, 9: 405-415.
- 620 81 財務省貿易統計 (2007) <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>.