

「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

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

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違はない。

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、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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

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。

3 宿主に関する事項

（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

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

（２）遺伝的先祖に関する事項

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（参考文献 2）。

（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、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い（参考文献 3）。

（４）寄生性及び定着性に関する事項

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。

（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

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性は報告されていない（参考文献 5）。

（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

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。

（７）有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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、主に春に播種されて秋に収穫される（参考文献 6）。

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。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

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 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。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

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。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

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）。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

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）。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

3272 トウモロコシの作出に用いたベクター pNOV7013 は、Danisco Biotechnology 社のバイナリー・ベクター pVictor に由来する。

(2) 性質に関する事項

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。既知の有害塩基配列を含まない（参考文献 11）。

(3) 薬剤耐性に関する事項

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。

(4) 伝達性に関する事項

PmNOV7013 には、伝達性に関与する *Pseudomonas* 由来の VS1ori（参考文献 12）、*E. coli* 由来の ColE1ori（参考文献 13）及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来の *virG*（参考文献 14）が含まれる。

(5) 宿主依存性に関する事項

pNOV7013 の伝達可能な宿主域は、*Pseudomonas* 属菌、*R. radiobacter* (*A. 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、家畜等が宿主となることはないと考えられる。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

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]-[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 15)。

(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

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。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

①名称、由来及び分類に関する事項

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(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。3 個の遺伝子のうち、BD5031 と BD5064 は浅い海洋熱水系の 95℃で pH7.0 の場所と 85℃で pH6.0 の場所から、それぞれ採取された *Thermococcus* 種の DNA ライブラリーから単離された。また、BD5063 は、深海太平洋の 90℃で pH6.5 の場所から単離された未同定の好熱菌の 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 Thermococcales 目に属する *Pyrococcus* 種か、または *Thermococcus* 種のどちらかと考えられている(参考文献 1)。

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コードする *manA* 遺伝子である(参考文献 16)。

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 目の好熱菌に対する家畜等の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。

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(参考文献 18、19、20、21)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

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 *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。

(3) 構造に関する事項

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 27 kDa 貯蔵タンパ

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含む ZmUbiInt プロモーター(参考文献 23)である。

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 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、 *pmi* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、 *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) の 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(参考文献 25)である。

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、既知の有害な塩基配列を含んでいない。

(4) 性質に関する事項

表 1 にまとめた。

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 <i>Thermococcales</i> 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)。

(5) 純度に関する事項

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* 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。

(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、

AMY797E α －アミラーゼと PMI タンパク質が発現している。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

①AMY797E α －アミラーゼ

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、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (参考文献 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(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はないことが示された。

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)。

②PMI タンパク質

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 タンパク質と有意な構造相同性を持つ既知毒素はないことが示された。

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)。

(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

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した。

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

*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 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。

①人工胃液に対する感受性

(i) AMY797E α －アミラーゼ

AMY797E α －アミラーゼ標品の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウェ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 －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、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、ウェスタンブロット分析でも反応開始 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出されなかった。

(ii) PMI タンパク質

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(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 分後にはそれらの断片も検出されなかった。

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

(i) AMY797E α -アミラーゼ

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 -アミラーゼは反応開始後 60 分では分解されなかった。

(ii) PMI タンパク質

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ロ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、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 反応開始において経時的(反応開始 0~30 分)に分解することが示された。

③加熱処理

(i) AMY797E α -アミラーゼ

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)、本評価は行わなかった。

(ii) PMI タンパク質

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(参考文献 47)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

①AMY797E α -アミラーゼ

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(参考文献 49、50、51)。

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。

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

は見られなかった。

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

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）、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。

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 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有意差は認められなかった。

③穀粒における 2 次代謝産物及び抗栄養素の分析結果

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、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った。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範囲内であった。

④DDGSの成分量

従来のトウモロコシ穀粒に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 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、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での残留アミラーゼ活性は検出されなかった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

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、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と同程度であった。

- 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(耕耘)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:

- structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology*, 18: 675-689.
- 5 Deacon, A., Y. Ni, W.G. Coleman Jr., and S.E. Ealick (2000). The crystal structure of ADP-L-glycero-D-mannoheptose-6-epimerase: catalysis with a twist. *Structure*, 8: 453-462.
 - 6 Davis, J. A., X. H. Wu, L. Wang, C. DeRossi, V. Westphal, R. Wu, G. Alton, G. Srikrishna and H. H. Freeze (2002) Molecular cloning, gene organization, and expression of mouse Mpi encoding phosphomannose isomerase. *Glycobiology*, 12: 435-442
 - 7 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H. M. Goodman (1982) Nopaline synthase: Transcript Mapping and DNA sequence. *J. Molecular Applied Genetics*, 1: 561-573.
 - 8 Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A., and Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5389-5394.
 - 9 FAO (2007) Food and Agriculture Organization (of the United Nations) <http://faostat.fao.org/>.
 - 10 FAO/WHO (2001) 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.
 - 11 FARRP (2001) Food Allergy Research and Resource Program Protein Allergen Database, version 1.02, www.allergenonline.com, last updated Feb. 12, 2002.
 - 12 Fling, M. E., J. Kopf and C. Richards (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 13: 7095-7106.
 - 13 Franck, A., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. and Hirth, L. (1980). Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21, 285-294.
 - 14 Freeze, H. H. (2002) 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, pp. 595-599.
 - 15 Fujiki, Y., Y. Yoshikawa, T. Sato, N. Inada, M. Ito, I. Nishida and A. Watanabe (2001) Dark-inducible genes from *Arabidopsis thaliana* are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiol. Plantarum*, 111: 345-352.
 - 16 Galinat, W. C. (1988) The origin of corn. *In*: Corn and corn improvement. G.F Sprague and J.W. Dudley, Eds. Agronomy Monographs No.18; pp. 1-31. American Society of Agronomy: Madison, Wisconsin.
 - 17 Goldsworthy, A. and H. E. Street (1965) The carbohydrate nutrition of tomato roots VIII. The mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots. *Ann. Bot.*, 29: 45-58.
 - 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. Brunstdt 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

galactomannan. *Phytochem.*, 23: 983-987.

37 Lee, M., F. Walters, H. Hart, N. Palekar, and J. Chen (2003). The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4648-4657.

38 Levy, S. B., Marshall, B., Rowse-Eagel, D. and Onderdonk, A. (1980) Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*, 209:391-394.

39 Lucca, P., X. D. Ye and I. Potrykus (2001) Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molec. Breeding*, 7: 43-49.

40 Malvolti, M. E., M. Paciucci, F. Cannata and S. Fineschi (1993) Genetic variation in Italian populations of *Juglans regia* L. *Acta Hortic.*, 311: 86-94.

41 Markovitz, A., R. J. Sydiskis and M. Lieberman (1967) Genetic and biochemical studies on mannose-negative mutants that are deficient in phosphomannose isomerase in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 94: 1492-1496.

42 Martelli, G.P. (2001) Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J. Plant Pathol.* 82:37-46.

43 Miles, J. S. and J. R. Guest (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene*, 32: 41-48.

44 Miller, W. B. (1989) Identification of free mannose and partial characterization of a mannose-6-phosphate isomerase from *Lilium longiflorum* bulbs. *Physiologia Plantarum*, 77: 123-128.

45 Morgan, D. R. and H. E. Street (1959) The carbohydrate nutrition of tomato roots. VII. Sugars, sugar phosphates and sugar alcohols as respiratory substrates for excised roots. *Ann. Bot.*, 23: 89-105.

46 Muhldorfer, I. and Hacker, J. (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microbial Pathogenesis*, 16:171-81.

47 Murray, E. E., J. Lotzer and M. Eberle (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 17: 477-498.

48 Naczki, M., Amarowicz, R. and F. Shahidi (1997) α -Galactosides of Sucrose in Foods: Composition, Flatulence-Causing Effects, and Removal. *In: Antinutrients and Phytochemicals in Foods*. Shahidi, F., Ed; American Chemical Society, Washington D.C.

49 NCBI (2003) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

50 NCBI (2007) National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

51 Negrotto, D., M. Jolley, S. Beer, A. R. Wenck and G. Hansen (2000) The use of phosphomannose-isomerase as a selectable marker to recover transgenic maize plants (*Zea mays* L.) via *Agrobacterium* transformation. *Plant Cell Reports*, 19: 798-803.

52 農学大辞典 (1994) 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 養賢堂.

53 OECD (2002) 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.

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-Kuorlas (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>.