

「高リシントウモロコシ LY038 系統」に係る安全性確認

I はじめに

高リシントウモロコシ LY038 系統（以下「LY038 系統」という。）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 : 高リシントウモロコシ LY038 系統
性質 : 高リジン含有
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company、Renessen LLC

LY038 系統は、リジン生合成に関与するジヒドロジピコリン酸合成酵素（dihydrodipicolinate synthase）である cDHDPS を発現する遺伝子（*cordapA* 遺伝子）を導入したものであり、cDHDPS が主にトウモロコシ穀粒中で発現し、穀粒中のリジン含量が高まる性質を付与されている。

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。

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

宿主に用いた植物は、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ（*Zea mays* L.）でデント種に属する。LY038 系統に導入された *cordapA* 遺伝子は、土壌中に存在する微生物類の 1 つである *Corynebacterium glutamicum* 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（デント種）の主な利用目的は飼料用であり、広範囲な家畜等の飼養経験を持つ。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

LY038 系統の穀粒及び茎葉部の主要構成成分等（たん白質、脂質、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、灰分及び炭水化物）の分析値について、非組換えトウモロコシ等と比較したところ差異は認められなかった。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

LY038 系統と既存のトウモロコシとの相違は、LY038 系統が cDHDPS の発現によりトウモロコシ穀粒中でリジン含量が高まり、また、その二次代謝産物であるサッカロピン及び α -アミノアジピン酸含量が高まる点のみである。これらの点を除けば、LY038 系統は既存のトウモロコシと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について相違はない。

以上（１）～（４）により、LY038 系統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

リジンは家畜等にとって必須アミノ酸の一つである。そのため、特に鶏や豚等の肥育においては、リジンを飼料に添加する必要がある（参考文献 1、2）。飼料に添加されるリジンは、一般に、*C. glutamicum* あるいは *Brevibacterium lactofermentum*（参考文献 3）の発酵によって生産されるリジン―塩酸塩 *またはリジン硫酸塩*である（参考文献 4）。わが国におけるリジン塩酸塩の飼料への添加は 1960 年代から行われており、飼料用リジンの推定年間需要量は 2000 年には 55 万トンに達している（参考文献 5）。

LY038 系統を開発することにより、飼料に添加するリジンの量を減らすことができ、または添加する必要がなくなる。

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属に属するトウモロコシで、LY038 系統の作出には H99 系統が用いられた。

（２） 遺伝的先祖に関する事項

トウモロコシは、一般に、紀元前 5,000 年のメキシコあるいはグアテマラが原産地と考えられ、その植物学的起源は、育種過程で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 6～8）。

（３） 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシが有害生理活性物質を生産することは知られていない（参考文献 9）。

（４） 寄生性及び定着性に関する事項

トウモロコシの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

（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、家畜等に対する病原性は知られていない。

（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、我が国において自生したという報告はない。

（７） 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

トウモロコシは種子繁殖する一年生のイネ科作物である。品種や地域によって栽培時期は多少異なるが、主に春に播種されて秋に収穫される（参考文献 10）。トウモロコシの近縁種には

* 「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律の規定に基づく飼料添加物を定める件」（昭和 51 年 7 月 24 日農林省告示第 750 号）に定める「塩酸 L-リジン」及び「硫酸 L-リジン」をいう。

トリプサカム属及びブタモロコシがあるが、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。なお、我が国においてブタモロコシの自生は知られていない。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

トウモロコシの利用の歴史は、およそ紀元前 3,000 年前まで遡ることができ、その後、ヨーロッパ、アフリカ大陸及びアジアへと伝播し、現在、飼料、食品等として広く利用されている。飼料としての利用は、子実を配合飼料の原料として利用することが最も多く、その他にもサイレージ用として利用する場合、青刈りのまま利用する場合がある。また、ウェットミリング及びドライミリング、アルコール発酵の際の副産物も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

現在のトウモロコシは、栽培作物として適するように人為的に高度に改良された作物であり、人の助けなしに生存、繁殖することはできない(参考文献 11)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシの近縁種である他のトリプサカム属種において有害生理活性物質の産生は報告されていない。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

LY038 系統の作出にはプラスミド・ベクターPV-ZMPQ76 が用いられた。PV-ZMPQ76 は pGEM (Promega Corporation 2800 Woods Hollow Rd, Madison, WI) 由来の2種類のベクターを用いて作成された。

(2) 性質に関する事項

PV-ZMPQ76 の塩基数は 8,819bp であり、制限酵素による切断地図は明らかになっている。また、PV-ZMPQ76 に存在する全ての遺伝子の由来及び機能は明らかになっており、既知の有害塩基配列を含まない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

PV-ZMPQ76 には、*Escherichia coli* における選抜マーカーとしてアンピシリンに対する耐性を付与する *amp^R* 遺伝子(参考文献 12) 及び植物体における選抜マーカーとしてカナマイシンに対する耐性を付与する *npt II* 遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子は LY038 系統に存在しないことが、サザンブロット分析によって確認された。

(4) 伝達性に関する事項

PV-ZMPQ76 は伝達を可能とする配列を含まない。

(5) 宿主依存性に関する事項

PV-ZMPQ76 には、*E. coli* 中でのみ増殖が可能な *ori* 配列が含まれるが、植物や自然界では増殖することができない。また、遺伝子導入に用いた断片には *ori* 配列は含まれていないことから、*ori* 配列が LY038 系統に含まれることはなく、このことはサザンブロット分析により確認された。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

PV-ZMPQ76 は、pGEM 由来の 2 種類のベクターから *cordapA* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現カセットを制限酵素処理により切り取り、各断片を純化した後に連結して作成された。

(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

PV-ZMPQ76 を制限酵素 *Xho I* で処理して得られる領域が、切断・精製された後、パーティクルガン法によりトウモロコシ細胞へ導入された（参考文献 13、14）。

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

cordapA 遺伝子は土壌中に一般的に存在する *C. glutamicum* に由来し、*npt II* 遺伝子は *E. coli* のトランスポゾン Tn5 に由来する。

② 安全性に関する事項

C. glutamicum は自然界に広く存在するグラム陽性菌の一つで、病原性は知られていない（参考文献 3、15～17）。また、リジンの他に、アルギニン、グルタミン酸、ロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリン等のアミノ酸を発酵製造する際に一般的に利用されている（参考文献 4、18～21）。*E. coli* はヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

PV-ZMPQ76 は、2 種類のベクターから *cordapA* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現カセットを制限酵素処理により切り取り、各断片を純化した後に連結して作成された。PV-ZMPQ76 を制限酵素 *Xho I* で処理して得られる領域が、切断・精製された後、パーティクルガン法によりトウモロコシ細胞へ導入された。導入後は、パロモマイシンを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体が得られた。*cordapA* 遺伝子の存在を PCR 法で確認した個体を、*cre* 遺伝子を含む個体（以下、「Cre event」という。）と交配させた後、*cordapA* 遺伝子を含み、かつ *npt II* 遺伝子と *cre* 遺伝子を含まない個体を選抜された。

なお、Cre event とはアグロバクテリウム形質転換法によって作出したバクテリオファージ P1 由来の組換え酵素である Cre リコンビナーゼを発現する組換えトウモロコシである。Cre リコンビナーゼは LY038 系統作出に用いた線状プラスミドに存在する *loxP* 塩基配列中の組換え部位を認識して切断するため、導入遺伝子中の *npt II* 遺伝子発現カセット領域を除去することができる。

(3) 構造に関する事項

cordapA 遺伝子発現カセットのプロモーターは、トウモロコシ由来のグロブリン1 遺伝子の Glb1 promoter (参考文献 22) で、*npt II* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーマザイクウイルス由来の 35S promoter である (参考文献 23)。*cordapA* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、トウモロコシ由来のグロブリン1 遺伝子の Glb1 3' UTR で、*npt II* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Agrobacterium tumefaciens* 由来のノパリン合成酵素遺伝子の NOS 3' である。

(4) 性質に関する事項

LY038 系統に導入された *cordapA* 遺伝子発現カセット及び *npt II* 遺伝子発現カセットの各構成要素、由来及び機能を表 1 にまとめた。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>cordapA</i> 遺伝子発現カセット	
Glb1 promoter	トウモロコシのグロブリン1 遺伝子由来のプロモーター領域。目的遺伝子を主に穀粒で発現させる (参考文献 22)。
rAct1 intron	ライソアクチン遺伝子のイントロン (参考文献 24)。目的遺伝子の発現を活性化させる。
mDHDPS TP	トウモロコシの DHDPS の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチド部分をコードする塩基配列 (参考文献 25)。目的たん白質を細胞質から色素体へと輸送する。
<i>cordapA</i>	<i>C. glutamicum</i> 由来のリジン生合成酵素遺伝子
Glb1 3' UTR	トウモロコシのグロブリン1 遺伝子由来のターミネーター領域で、mRNA のポリアデニル化を誘導する (参考文献 22)。
<i>npt II</i> 遺伝子発現カセット (LY038 系統には存在しない)	
<i>lox P</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼが 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する (参考文献 26)。
CaMV 35S promoter	カリフラワーマザイクウイルスのプロモーター (参考文献 23)。全組織中に目的遺伝子を恒常的に発現させる機能を持つ。
<i>npt II</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードする (参考文献 27)。カナマイシン耐性を付与し、形質転換の選択マーカーとして働く。
<i>ble</i>	Tn5 より単離されたブレオマイシン耐性遺伝子の一部である (参考文献 28) が、ブレオマイシン耐性は付与しない。
NOS 3'	<i>A. tumefaciens</i> のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域で、mRNA のポリアデニル化を誘導する (参考文献 29)。
<i>lox P</i>	バクテリオファージ P1 の組換え部位。2 つ一組で機能する。Cre リコンビナーゼが 2 つの <i>lox P</i> 部位を認識することにより間に存在する DNA 領域を除去する (参考文献 26)。

【*cordapA* 遺伝子】

cordapA 遺伝子は *C. glutamicum* より単離された遺伝子で、cDHDPS をコードする。

DHDPS はアスパラギン酸セミアルデヒドとピルビン酸からジヒドロジピコリン酸を合成する

反応を触媒する（参考文献 30、31）。その後、ジヒドロジピコリン酸は複数の酵素反応を経て、最終的にリジンに合成される。

トウモロコシの内在性 DHDPS は、リジン蓄積によってフィードバック阻害を受け、ジヒドロジピコリン酸の生成量の抑制が起こるが、*C. glutamicum* 由来の cDHDPS はリジン蓄積によるフィードバック阻害を受けにくいため（参考文献 32）、ジヒドロジピコリン酸の生成量が高まる。この結果として、LY038 系統ではリジン含量が高まることになる。

なお、DHDPS は、トウモロコシ、ホウレンソウ、エンドウマメ及び微生物に存在していることが知られており（参考文献 25、33～35）、ヒトや動物はこれまでに様々な DHDPS を摂食してきたと考えられる。

【*npt II* 遺伝子】

npt II (neomycin phosphotransferase type II) 遺伝子は、*E. coli* のトランスポゾン Tn5 由来のカナマイシン耐性を付与する遺伝子で、その遺伝子産物であるネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II (NPT II) は、ATP を利用して抗生物質であるカナマイシンやネオマイシンをリン酸化して不活化する。なお、形質転換細胞の選抜マーカー遺伝子として LY038 系統の形質転換細胞の選抜に用いられた *npt II* 遺伝子発現カセット領域は、LY038 系統の後代には存在しない。

(5) 純度に関する事項

挿入した遺伝子の塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

(6) 安定性に関する事項

LY038 系統の後代世代での挿入遺伝子の安定性を確認するため、*cordapA* プローブをハイブリダイズさせることによりサザンブロット分析を行ったところ、*cordapA* 遺伝子が安定していることが確認された。また、LY038 系統の後代世代での遺伝的安定性を確認するため、cDHDPS に特異的なポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット分析を行ったところ、cDHDPS が安定して発現していることが確認された。さらに、挿入遺伝子の発現・分離様式を LY038 系統の 5 世代について、cDHDPS の発現を指標として調査したところ、全ての世代において実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計的な有意差は認められなかった。

(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、PV-ZMPQ76 の *cordapA* 遺伝子発現カセットが、トウモロコシゲノムの 1 ヶ所に 1 コピー挿入されたことが確認された。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

LY038 系統における cDHDPS の発現量を ELISA 法により測定したところ、その発現量の平均値 ($n=15$) は、穀粒 24 $\mu\text{g/g}$ fwt、茎葉 0.25 $\mu\text{g/g}$ fwt、根 0.14 $\mu\text{g/g}$ fwt、花粉 0.43 $\mu\text{g/g}$ fwt、成熟葉で検出限界 (0.013 $\mu\text{g/g}$ fwt) 以下であった。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

PV-ZMPQ76 には *amp^R* 遺伝子（参考文献 12）及び *npt II* 遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子は LY038 系統に存在しない。

- (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
サブプロット分析及び PCR 分析の結果から、LY038 系統には *cordapA* 遺伝子発現カセットが 1 コピーのみ含まれており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認されたことから、LY038 系統には cDHDPS を発現するオープンリーディングフレームのみが含まれており、目的以外のたん白質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていないと考えられた。

なお、LY038 系統の挿入遺伝子近傍のゲノム DNA の配列と対照の非組換え体のゲノム DNA の配列を PCR 法及び塩基配列分析によって比較したところ、非組換え体に存在している 8,021 bp の断片が LY038 系統にはなく、これは遺伝子導入の際に欠失したと考えられた。また、LY038 系統の挿入遺伝子の 3'末端に PCR 産物の DNA 配列と一致しない 9bp の配列が隣接していることが判明した。このことから、目的以外のたん白質が産生される可能性を想定して、フレームシフトを考慮に入れた既知毒素との相同性検索を行ったが、この領域から毒素と相同性のあるたん白質が産生されることはないことが確認された。

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

LY038 系統は、cDHDPS が主に穀粒中で発現することによりリジン含量が高まり、更にその二次代謝産物であるサッカロピン、 α -アミノアジピン酸の含量が高まる。

- (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

【cDHDPS】

cDHDPS と既知毒素との間に構造相同性を確認するため、GenBank/EMBL release 124 及び Swissprot release 1 に「毒素」として登録されている既知の毒素から成るデータベース TOXIN 5 を構築し、FASTA 型アルゴリズムを用いて cDHDPS のアミノ酸配列と比較した。その結果、cDHDPS と既知毒素との間に構造相同性は認められなかった。

また、cDHDPS を用いてマウスの急性強制経口投与試験を行った結果、cDHDPS の最大投与量 800mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった。

【リジン】

LY038 系統において増加するリジン量は 1,600 μ g/g dwt である。トウモロコシの配合割合は、ブロイラー用配合飼料で 43.3%、豚用配合飼料が 55.8% (参考文献 36) であることから、配合飼料中のトウモロコシをすべて LY038 系統に置き換えると、配合飼料 1kg 当たりのリジン増加量は 0.69g (ブロイラー用) 及び 0.89g (豚用) と算出される。一方、配合飼料へのリジン添加量は約 1g/kg である。このことから、配合飼料中のトウモロコシをすべて LY038 系統に置き換えたとしても、LY038 系統におけるリジン増加量は、従来、配合飼料に添加されていたリジンの量を超えることはない。

【リジンの二次代謝産物】

LY038 系統において、リジンの増加に伴い増加している二次代謝産物のサッカロピン及び α -アミノアジピン酸について、家畜等への健康に与える影響について以下のように考察した。

- ① リジンをサッカロピンに変換する酵素 LKR (Lysine-ketoglutarate reductase) 及びサッカロピンを α -アミノアジピンセミアルデヒドに変換する酵素 SDH (Saccharopine dehydrogenase) は、豚、牛等の肝臓に存在する (参考文献 37)。

配合飼料中のトウモロコシをすべて LY038 系統に置き換えた場合、豚及び牛が一日に摂取するサッカロピン量はそれぞれ 1.09g/day、2.35g/day と算出される (参考文献 36、38、39)。一方、豚及び牛の肝臓に存在する SDH が分解可能なサッカロピン量はそれぞれ 39g/whole liver/day、131g/whole liver/day である。このことから、豚及び牛の肝臓には LY038 系統中のサッカロピンを分解するのに十分な量の SDH が存在すると考えられた。

- ② これらの二次代謝産物は、いくつかの酵素反応を経てアセチル Co-A となり、クエン酸回路 (TCA 回路) に入るため (参考文献 40、41)、家畜等の体内に蓄積することは考えにくい。
- ③ サッカロピン及び α -アミノアジピン酸について、マウスを用いた急性毒性試験をそれぞれ行ったところ、最大投与量である 2,000mg/kg 体重でも有害な影響は認められなかった。
- 以上のことから、リジンの二次代謝産物であるサッカロピン及び α -アミノアジピン酸が家畜等の健康に悪影響を及ぼすことは考えにくい。

(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

- ① 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた cDHDPS を人工胃液で処理しウエスタンブロット分析を行ったところ、試験開始後 30 秒以内で検出限界 (0.05ng) 以下に消失することが確認された。

- ② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた cDHDPS を人工腸液で処理しウエスタンブロット分析を行ったところ、試験開始 24 時間後に cDHDPS の酵素活性の約 70% が失われたことが確認されたが、その分解産物 (29kDa、25kDa) のバンドは 24 時間後も観察された。なお、cDHDPS のようなオリゴマー酵素がトリプシンやキモトリプシンに対して耐性を示すことが知られている (参考文献 42)。

- ③ 加熱処理に対する感受性

穀粒の加工処理段階で用いられる温度条件 (参考文献 43) を考慮して設定した約 204°C、20 分間の加熱条件により処理した LY038 系統中の cDHDPS の免疫反応性は、ウエスタンブロット分析により、検出限界 (0.1ng) 以下に消失することが確認された。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

cDHDPS の基質は、リジン合成系路の L-アスパラギン酸セミアルデヒド (ASA) とピルビン酸である。他の微生物由来の DHDPS は ASA 及びピルビン酸の類似化合物との親和性は認められておらず (参考文献 35、44)、また、cDHDPS のピルビン酸や ASA との動力学的パラメーターは他の微生物由来の DHDPS と共通している。更に、既に明らかにされている *E. coli* の DHDPS の構造 (参考文献 3、19、45) と cDHDPS の構造を比較したところ、基質結合部位はいずれも同じであり、三次構造も互いに類似していた。

以上のことから、cDHDPS の基質特異性は他の微生物由来の DHDPS と同様に高いと考えられ、cDHDPS によりリジン及びその下流側の代謝物の量が増加する以外、導入の影響はないと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

LY038 系統、対照の非組換えトウモロコシを用いて、穀粒中の主要構成成分（たん白質、脂質、灰分及び水分）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、総食物繊維（TDF）、アミノ酸、脂肪酸、ビタミン、フィチン酸、ラフィノース、二次代謝産物（フルフラール、フェルラ酸、p-クマル酸、カダベリン、 α -アミノアジピン酸、サッカロピン、ホモセリン、L-ピペコリン酸、2,6-ジアミノアジピン酸）、無機物（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛）及び炭水化物の分析を行った。また、茎葉中の主要構成成分（たん白質、脂質、灰分及び水分）、酸性デタージェント繊維（ADF）、中性デタージェント繊維（NDF）、無機物（カルシウム、リン）及び炭水化物の分析を行った。

その結果、リジン、遊離リジン及びサッカロピンにおいて、LY038 系統と非組換えトウモロコシとの間で統計学的有意差が認められ、いずれの成分も LY038 系統で高まっていた。なお、 α -アミノアジピン酸は LY038 系統では $39.7 \mu\text{g/g dwt}$ ~ $82.3 \mu\text{g/g dwt}$ であったが、非組換えトウモロコシ多くが検出限界以下（ $5 \mu\text{g/g dwt}$ ）であったため統計学的有意差の確認は行われていない。また、茎葉中のリン、並びに穀粒中のグルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、エイコセン酸、カルシウム、銅、マンガン、亜鉛、脂質、たん白質、中性デタージェント繊維（NDF）、総繊維質（TDF）、葉酸及びビタミンEにおいて統計学的有意差が認められたが、いずれも非組換えトウモロコシ若しくは文献値の範囲内に収まっていた。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国及びアルゼンチンで行われた LY038 系統のは場試験において、その生存・増殖能力は非組換えトウモロコシと差異は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

上記（6）のとおり、LY038 系統の生存・増殖能力は非組換えトウモロコシと差異は認められなかったことから、制限要因についても両者の間に変化はないと考えられた。

(8) 不活化法に関する事項

物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の散布）など、トウモロコシを枯死させる従来の方法によって LY038 系統は不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局（FDA）より、2005 年 10 月に食品・飼料としての安全性が認可された。
カナダ食品検査庁（CFIA）より、2006 年 7 月に飼料及び環境としての安全性が認可された。
オーストラリア・ニュージーランド食品基準局（FSANZ）には、2004 年 10 月に食品としての安全性審査の申請が行われた。

アルゼンチン農畜産品衛生事業団（SENASA）には、2004 年 9 月に食品・飼料としての安全性審査の申請が行われた。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

LY038 系統と既存のトウモロコシとの相違は、LY038 系統においてリジン並びに二次代謝産物であるサッカロピン及び α -アミノアジピン酸の含量が高まる点のみであり、栽培方法等は既存のトウモロコシと同様である。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

LY038 系統の種子の製法及び管理方法は、既存のトウモロコシと同じである。各分析に用いた世代の種子は、米国モンサント社 Chesterfield 研究所 (St. Louis, MO) において、その発芽能力が長期間 (5~10 年) 維持されるような条件下で管理されている。

- 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、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項該当しない。

IV 審議結果

高リシントウモロコシ LY038 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」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

1. NRC. 1994. Nutrient Requirements of Poultry. National Academy Press, Washington, D.C.
2. NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. National Academy Press, Washington, D.C.
3. Eggeling, L. 1994. Biology of L-Lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* 6: 261-272.
4. Leuchtenberger, W. 1996. Amino acids: Technical production and use. pp 465-502. In *Biotechnology: A multi volume comprehensive treatise*. Vol. 6, Products of primary metabolism. Rehm, H.J., G. Reed, A. Puhler, and P. Stadler (eds.). Weinheim, New York.
5. アミノ酸ハンドブック, 2003. 味の素株式会社 編 株式会社工業調査会発行
6. Aldrich, S. R., Scott, W. O. and Hoeft, R. G. 1986. *Modern Corn Production*, Third Edition. A & L Publication, Inc., Champaign, Illinois, USA.
7. Galinat, W. C. 1988. The Origin of Corn. pp 1-31. In Sprague, G.F. and Dudley, J.W., eds. *Corn and Corn Improvement*, Third Edition. #18 in the series *Agronomy*. American Society of Agronomy. Madison, WI.
8. Jugenheimer, R. W. 1976. Corns for special purposes and uses. In *Corn : Improvement, Seed Production and Uses*. John Wiley & Sons, New York pp.215-233.
9. White, P. J. and Pollak, L. M. 1995. Corn as a Food Source in the United States : PartII. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. *Cereal Food World*. 40: 756-761.
10. 畑作全書 雑穀編, 1981. 農文協
11. Galinat, W. C. 1977. The origin of corn. In *Corn and Corn Improvement*, 2nd Edition. G. F. Sprague, ed. American Soc. Agronomy, Madison WI.
12. Sutcliffe, J.G. 1978. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Symposia on Quantitative Biology*. 43:77-103.
13. Klein, T. M., E. D. Wolf, R. Wu and J. C. Sanford. 1987. High velocity microprojectiles for

- delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
14. Gordon-Kamm, W. J., T.M. Spencer, M.L. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams, N.G. Willetts, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Kausch, and P.G. Lemaux. 1990. Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants. *Plant Cell* 2:603-618.
 15. Abe, S. and K. Takayama. 1972. Amino Acid-producing Microorganisms: Variety and Classification. *In* The Microbial Production of Amino Acids. Yamada, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda, and K. Aida (eds.). Halsted Press, New York.
 16. Aida, K., I. Chibata, K. Nakayama, K. Takinami, and H. Yamada. 1986. Biotechnology of Amino Acid Production. Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
 17. Nakayama, K. 1972. Lysine and Diaminopimelic Acid. pp 369-397. *In* The Microbial Production of Amino Acids. Yamada, K., S. Kinoshita, T. Tsunoda, and K. Aida (eds.). John Wiley & Sons, New York.
 18. Atlas, R.M. 1984. Microbiology: fundamentals and applications. pp 729-733. Macmillan Publishing Company, New York.
 19. Eggeling, L. Oberle, S., and Sahm, H. 1998. Improved L-Lysine yield with *Corynebacterium glutamicum*: use of *dapA* resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 24-30.
 20. Hodgson, J. 1994. Bulk amino-acid fermentation: technology and commodity trading. *Biotechnology* 12:152-155.
 21. Kircher, M. and W. Pfefferle. 2001. The fermentative production of L-lysine as an animal feed additive. *Chemosphere* 43 (1): 27-31.
 22. Belanger, F.C. and A.L. Kriz. 1991. Molecular basis for allelic polymorphism of the maize Globulin 1 gene. *Genetics* 129: 863-872.
 23. Odell, J. T., Mag, F. and Chua, H. H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-12.
 24. McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., and Wu, R. 1990. Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *Plant Cell* 2: 163-71.
 25. Frisch, D.A., A.M. Tommey, G.B. Gengenbach and D.A. Somers. 1991. Direct genetic selection of a maize cDNA for dihydrodipicolinate synthase in an *Escherichia coli* *dapA*⁻ auxotroph. *Mol. Gen. Genet.* 228: 287-293.
 26. Russell, S.H., J.L. Hoopes, and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol Gen Genet* 1:49-59.
 27. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
 28. Mazodier, P., P. Cossart, E. Giraud, and F. Gasser. 1985. Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acids Res.* 13: 195-205.
 29. Bevan, M., Barnes, W. M., and Chilton, M. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucl. Acids Res.* 11: 369-385.

30. Bryan, J.K. 1980. Synthesis of the Aspartate Family and Branched-Chain Amino Acids. *The Biochemistry of Plants*. 5: 403-452.
31. Schruppf, B., A. Schwarzer, J. Kalinowski, A. Puhler, L. Eggeling and H. Sahm. 1991. A functionally split pathway for lysine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol* 173:4510-4516.
32. Vauterin, M., V. Frankard and M. Jacobs. 2000. Functional rescue of a bacterial dapA auxotroph with a plant cDNA library selects for mutant clones encoding a feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase. *The Plant J*. 21:239-248.
33. Wallsgrove, R.M. and M. Mazelis. 1981. Spinach leaf dihydrodipicolinate synthase: partial purification and characterization. *Phytochem*. 20:2651-2655.
34. Dereppe, C., G. Bold, O. Ghisalba, E. Ebert, and H.P. Schär. 1992. Purification and characterization of dihydrodipicolinate synthase from pea. *Plant Physiol*. 98:813-821.
35. Karsten, W. E. 1997. Dihydrodipicolinate synthase from *E. coli*: pH dependent changes in the kinetic mechanism and kinetic mechanism of allosteric inhibition by L-Lysine. *Biochemistry*, 36: 1730-1739.
36. 飼料月報 2003-2004, 2004. 通巻 474~485 号 農林水産省生産局畜産部畜産振興課編 社団法人配合飼料供給安定機構発行
37. Fellows, F. C. I. and M. H. R. Lewis. 1973. Lysine Metabolism in Mammals. *Biochemistry Journal* 136: 329-334.
38. 日本飼養標準・豚 (1998 年版) . 農林水産省農林水産技術会議事務局編.
39. 日本飼養標準・肉用牛 (2000 年版) . 農林水産省農林水産技術会議事務局編.
40. Higashino, K., M. Fujioka, and Y. Yamamua. 1971. The conversion of l-lysine to saccharopine and α -amino adipate in mouse. *Archiv. Biochem. Biophys*. 142: 606-614.
41. Devlin, T. M. 2001. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Fifth Edition. pp813. Wiley-Liss, New York.
42. Mirwaldt, C., Korndorfer, I., and Huber, R. 1995. The crystal structure of dihydrodipicolinate synthase from *Escherichia coli* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol*. 246: 227-239.
43. Rooney, L. W. and Serna-Saldivar, S. O. (1994). Food uses of whole corn and dry-milled fractions. In: *Corn Chemistry and Technology*, Watson, S. A. and Ramstad, P. E., eds. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemistry, Inc., pp.399-429.
44. Stahly, D. P. 1969. Dihydrodipicolinic acid synthase of *Bacillus licheniformis*. *Biochim. Biophys. Acta* 191: 439-451.
45. Cremer, J., Treptow, C., Eggeling, L., and Sahm, H. 1988. Regulation of enzymes of lysine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of General Microbiology*, 134: 3221-3229.