

( 案 )

遺伝子組換え食品等評価書

高リシントウモロコシ LY038 系統

2 0 0 7 年 2 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                                            | 1 |
| ○ 食品安全委員会委員名簿                                      | 1 |
| ○ 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                      | 1 |
| ○ 高リシントウモロコシ LY038 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果           | 2 |
| ・ はじめに                                             | 2 |
| ・ 評価対象食品の概要                                        | 2 |
| ・ 食品健康影響評価                                         | 2 |
| 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      | 2 |
| 1 宿主及び導入 DNA に関する事項                                | 2 |
| 2 宿主の食経験に関する事項                                     | 2 |
| 3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項                              | 3 |
| 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                  | 3 |
| 5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項       | 3 |
| 6 安全性評価において検討が必要とされる相違点                            | 3 |
| 第 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項                          | 3 |
| 第 3 宿主に関する事項                                       | 3 |
| 1 分類学上の位置付け（学名、品種名及び系統名等）                          | 4 |
| 2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項                            | 4 |
| 3 有害生理活性物質の生産に関する事項                                | 4 |
| 4 アレルギー誘発性に関する事項                                   | 4 |
| 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                 | 4 |
| 6 安全な摂取に関する事項                                      | 4 |
| 7 近縁の植物種に関する事項                                     | 4 |
| 第 4 ベクターに関する事項                                     | 4 |
| 1 名称及び由来に関する事項                                     | 4 |
| 2 性質に関する事項                                         | 5 |
| 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                | 5 |
| 1 挿入 DNA の供与体に関する事項                                | 5 |
| 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 | 5 |
| 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                    | 5 |
| 4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項                         | 6 |

|     |                                          |    |
|-----|------------------------------------------|----|
| 5   | 構築された発現ベクターに関する事項                        | 6  |
| 6   | DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項                  | 7  |
| 第 6 | 組換え体に関する事項                               | 7  |
| 1   | 遺伝子導入に関する事項                              | 7  |
| 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      | 9  |
| 3   | 遺伝子産物（タンパク質）が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項 | 9  |
| 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              | 9  |
| 5   | 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項                  | 10 |
| 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              | 10 |
| 7   | 宿主との差異に関する事項                             | 12 |
| 8   | 諸外国における認可、食用等に関する事項                      | 12 |
| 9   | 栽培方法に関する事項                               | 13 |
| 10  | 種子の製法及び管理方法に関する事項                        | 13 |
| 第 7 | 第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られていない場合に必要事項     | 13 |
|     | 評価結果                                     | 13 |
|     | 参考文献                                     | 14 |

## 審議の経緯

|                           |                                         |
|---------------------------|-----------------------------------------|
| 平成 17 年 12 月 8 日          | 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請 |
| 平成 17 年 12 月 9 日          | 関係書類の受理                                 |
| 平成 17 年 12 月 15 日         | 第 142 回食品安全委員会（要望事項説明）                  |
| 平成 18 年 1 月 18 日          | 第 36 回遺伝子組換え食品等専門調査会                    |
| 平成 18 年 1 月 21 日          | 第 42 回遺伝子組換え食品等専門調査会                    |
| 平成 19 年 1 月 16 日          | 第 44 回遺伝子組換え食品等専門調査会                    |
| 平成 19 年 2 月 15 日          | 第 178 回食品安全委員会（報告）                      |
| 平成 19 年 2 月 15 日～3 月 16 日 | 国民からの意見・情報の募集                           |

## 食品安全委員会委員

| 平成 18 年 6 月 30 日まで | 平成 18 年 12 月 20 日まで | 平成 18 年 12 月 21 日から      |
|--------------------|---------------------|--------------------------|
| 委員長 寺田雅昭           | 委員長 寺田雅昭            | 委員長 見上 彪                 |
| 委員長代理 寺尾允男         | 委員長代理 見上 彪          | 委員長代理 <sup>*1</sup> 小泉直子 |
| 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                | 本間清一                     |
| 見上 彪               | 本間清一                | * 1 : 平成 19 年 2 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

|                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 座 長 早川堯夫           |                    |
| 座長代理 澤田純一          |                    |
| 五十君静信              | 手島玲子               |
| 池上幸江               | 丹生谷博               |
| 今井田克己              | 日野明寛 <sup>*2</sup> |
| 宇理須厚雄              | 室伏きみ子              |
| 小関良宏               | 山川隆                |
| 橘田和美 <sup>*1</sup> | 山崎壮                |
| 澁谷直人               | 渡邊雄一郎              |

\* 1 : 橘田専門委員は平成 18 年 10 月 1 日から

\* 2 : 日野専門委員は平成 18 年 7 月 31 日まで

## 高リシントウモロコシ LY038 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果

### はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、高リシントウモロコシ LY038 系統の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 17 年 12 月 9 日、関係書類を受理)

### 評価対象食品の概要

名 称 : 高リシントウモロコシ LY038 系統  
性 質 : 高遊離リシン含有  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : Monsanto Company (米国)

遺伝子組換えトウモロコシ「高リシントウモロコシ LY038 系統」(以下、「LY038 系統」という)は、*Corynebacterium glutamicum* に由来する *cordapA* 遺伝子を導入して作製され、穀粒中の遊離リシン含有量が高まるトウモロコシである。

本食品の宿主であるトウモロコシ(デント種)は、主に飼料として利用されるが、食品としてもコーン油やでんぷん等に幅広く用いられている。

### 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

宿主植物として用いたトウモロコシ *Zea mays* L. は、イネ科トウモロコシ属トウモロコシのデント種のものである。

###### (2) DNA 供与体の種名及び由来

LY038 系統に挿入された *cordapA* 遺伝子は、*C. glutamicum* から単離されたものである。

###### (3) 導入 DNA の性質及び導入方法

組換えトウモロコシのゲノムに組み込まれた *cordapA* 遺伝子は、トウモロコシ穀粒中での遊離リシン含有量を高めるジヒドロジピコリン酸合成酵素タンパク質(以下「cdHDPS タンパク質」という)を発現させる。デント種トウモロコシである遺伝子導入用交配雑種に、*cordapA* 遺伝子を含むプラスミド・ベクター PV-ZMPQ76 をパーティクルガン法により導入した。

##### 2 宿主の食経験に関する事項

宿主のトウモロコシ(デント種、イネ科トウモロコシ属)は、小麦、稲と並ぶ三大穀物であり、紀元前から食されており、現在、世界中で栽培されている(参考文献 1)。2000 年における全世界の生産量は約 5 億 9 千万トンである(参考文献 2)。

### 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

トウモロコシ(デント種)の穀粒中の主要栄養組成はタンパク質 6-15%、脂質 1-5%、灰分 1-3%、炭水化物 80-90%、水分 6-20%と報告されている(文献値)。

#### (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

宿主であるトウモロコシ(デント種)には、ヒトの健康に悪影響を与える毒性物質・栄養阻害物質の産生性は知られていない(参考文献3)。

### 4 宿主の組換え体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

LY038 系統の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

#### (2) 摂取(可食)部位

LY038 系統の可食部位は、従来のトウモロコシと変わらない。

#### (3) 摂取量

LY038 系統の摂取量は、従来のトウモロコシと変わらない。

#### (4) 調理及び加工方法

LY038 系統の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

### 5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、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

LY038 系統において、*cordapA* 遺伝子カセットの導入により、cDHDPs タンパク質が産生され、トウモロコシ穀粒中での遊離リシンの含有量が高まり、それに伴い代謝系におけるサッカロピン及び $\alpha$ -アミノアジピン酸の含有量が高まっていることが、宿主との相違点である。

以上、1~6 により、LY038 系統の安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

## 第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

LY038系統のゲノムに組み込まれた*cordapA*遺伝子は、cDHDPsタンパク質を産生し、穀粒中での遊離リシンの含有量を高めることができる。従来よりも高濃度のリシンを含むトウモロコシを家畜に飼料として供給することで、飼料へのリシン添加が不要になる、あるいは添加量を減らすことができる。

このように本組換え体は飼料としての利用を主目的として開発されたが、デント種トウモロコシはコーン油やでんぷん原料等の食品分野で幅広く用いられており、今後商業栽培が進めば食品用として利用される可能性もある。

## 第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（学名、品種及び系統名等）

宿主植物として用いたトウモロコシは、デント種トウモロコシの自殖系統 H99 である。

2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの原産地は、決定的な説はないが、メキシコ、あるいはグアテマラと考えられている。植物学的には、育種の過程でブタモロコシ(*teosinte*, *Zea mexicana*)から派生したとする説が有力とされている（参考文献 4,5,6）。

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、有害生理活性物質の産生性は知られていない（参考文献 7）。

4 アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシは重要なアレルギー誘発食品であるとは考えられておらず（参考文献 8）、アレルギーの報告例は少なく、数件（参考文献 9,10）が報告されているが、いずれの場合もアレルゲンは特定されておらず、アナフィラキシーの事例も稀な症例とされている。

最近になって、Pasterollo は lipid transfer protein(LTP)が、トウモロコシの主なアレルゲンであると示唆する報告をしている(参考文献 11,12)。この感作は主に南ヨーロッパで認められている症状であり、また、トウモロコシの LTP への感作を起こした患者は、LTP を含む他の野菜にも感作反応を起こす可能性が高いと考察されている。

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

多くの植物と同様に、トウモロコシの病気は多く知られているが、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

トウモロコシは、米、小麦とともに、世界の主要な穀物の一つであり、古くから食されている。我が国では 2003 年、でん粉製造用としておよそ 353 万トン、その他の製造用原料としておよそ 73 万トンのトウモロコシを輸入している。（参考文献 13）

7 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、*Tripsacum* 属及び *Zea* 属のブタモロコシがある。トウモロコシと自然交雑が可能なのはブタモロコシのみで *Tripsacum* 属との自然交雑は知られていない（参考文献 8）。我が国では、*Tripsacum* 属の野生種及びブタモロコシの存在は報告されていない（参考文献 14,15）。

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

LY038 系統の作出に用いられたプラスミド PV-ZMPQ76 は、中間体プラスミド A 及び B を用いて作出されている。

これらのプラスミドは、非病原性の *Escherichia coli* 由来のプラスミドから作製されたもの

である。

## 2 性質に関する事項

中間体として用いられたプラスミド A ~ B の制限酵素切断地図は明らかとなっており、また、これらのプラスミドからベクター PV-ZMPQ76 の構築のために用いた各構成要素の機能は明らかとなっている。

## 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

LY038 系統に導入された遺伝子のうち、*cordapA* 遺伝子は、*C. glutamicum* に由来する。また、*npt* 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

*cordapA* 遺伝子が由来する *C. glutamicum* は、自然界に広く存在するグラム陽性菌の 1 つであり、ヒトや家畜に対し病原性等の問題は報告されていない。(参考文献 16,17,18,19)

*C. glutamicum* はリシンを始めとしてアルギニン、グルタミン酸、ロイシン、フェニルアラニ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 20,21,22,23,24)

*npt* 遺伝子が由来する *E. coli* は、ヒトの腸管内に存在する一般的な細菌である。

### 2 挿入 DNA 又は遺伝子 ( 抗生物質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

*cordapA* 遺伝子は、*C. glutamicum* からリシンの生合成遺伝子 *dapA* 遺伝子の配列を基にプライマーを設計し PCR 法によってクローニングし、その塩基配列を決定した。*cordapA* 遺伝子のアミノ酸配列は、土壌中に存在する *C. glutamicum* の *dapA* 遺伝子のアミノ酸配列と同一である。また今回の導入に用いられたベクター PV-ZMPQ76 には loxP - 2 配列で挟まれる形で *npt* 遺伝子カセットが挿入されている。

*npt* 遺伝子は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ (NPT ) をコードする。(参考文献 25) NPT タンパクは、ATP の存在下でアミノ酸配糖体系抗生物質をリン酸化し不活化する。挿入 DNA の構成要素は表のとおりであり、由来、機能及び制限酵素による切断地図等は明らかとなっている。

### 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

プラスミド PV-ZMPQ76 の 2 つの遺伝子カセットのうち、*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 (*Glb1*) 遺伝子の *Glb1* promoter であり ( 参考文献 26 ) 目的遺伝子を主に胚芽で発現させる。

また、*npt* 遺伝子カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の CaMV35S promoter である。

## (2) ターミネーターに関する事項

プラスミド PV-ZMPQ76 の *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(*Glb1*)遺伝子の *Glb1* 3' 非翻訳領域(UTR)である。

また、*npt* 遺伝子カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)由来のノバリン合成遺伝子の 3' 非翻訳領域である。

## (3) その他

プラスミド・ベクター中に、ヒト及び家畜に有害であることが知られているタンパク質をコードする DNA 配列は存在しない。

## 4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

LY038 系統の作出に用いた発現ベクターPV-ZMPQ76 は、ベクターA に組み込まれた *cordapA* 遺伝子発現カセットとベクターB に組み込まれた *npt* 遺伝子発現カセットを、制限酵素で処理して必要部分を切り取り、各断片を純化した後に連結して構築された。なお、*npt* 遺伝子発現カセットはその前後を *loxP* - 2 配列によって挟む形で構築されている。*loxP* - 2 配列は、8bp のスパーサー配列を 13bp の逆方向反復配列 2 つが、挟み込む合計 34bp からなる。(参考文献 27)

これに Cre リコンビナーゼが 13bp 配列の逆方向反復配列に結合し、各 *loxP* 部位の真ん中に存在する 8bp のスパーサー配列間の組換えを触媒する。この結果、除去したい直鎖状 DNA の両端に各 *loxP* 部位の半分が連結した状態で直鎖状 DNA が環状になって切り出され、ゲノム上には、各 *loxP* 部位のあとの半分が残る。(参考文献 28,29,30)

この部位特異的相同組換え系は酵母以外の動植物細胞でも起こることが明らかにされている。*loxP* - 2 配列に挟まれた遺伝子領域が導入された遺伝子組換え個体と、*cre* 遺伝子により Cre リコンビナーゼを発現する別の遺伝子組換え個体を交配させて得られる *loxP* - 2 配列に挟まれた遺伝子領域と *cre* 遺伝子を同一細胞内に有するヘテロ個体においては、*cre* 遺伝子から発現した Cre リコンビナーゼが *loxP* - 2 配列に作用し、この標的配列に挟まれた塩基配列領域が相同組換えによって切り出され除去されることが明らかにされている。

## 5 構築された発現ベクターに関する事項

- ・ LY038 は、発現ベクターPV-ZMPQ76 を用いて作出された。
- ・ 発現ベクターPV-ZMPQ76 の塩基数は 8,819bp であり、本プラスミドの塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。
- ・ PV-ZMPQ76 の各構成要素の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。
- ・ 発現ベクター上での意図する発現領域は、*Xho* 領域から時計回りに *Xho* 領域までである。
- ・ 導入遺伝子の大きさ、由来及び塩基配列は明らかになっている。

### ・ LY038 系統への挿入 DNA

| <i>cordapA</i> 遺伝子カセット |                                                          |
|------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Glb1</i> promoter   | プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列)<br>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 |
| <i>Ract1</i> intron    | イネ由来アクチン遺伝子のイントロン                                        |

|                    |                                                                                  |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| mDHDPS TP          | トウモロコシ由来のDHDPSタンパク質のN末端側に存在する葉緑体に輸送するペプチド部分をコードする塩基配列。                           |
| <i>cordapA</i>     | <i>C. glutamicum</i> 由来のリシン生合成酵素遺伝子                                              |
| GIb1 3' UTR        | 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)<br>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                     |
| <i>npt</i> 遺伝子カセット |                                                                                  |
| CaMV35S promoter   | プロモーター領域(遺伝子の転写に必要な配列)<br>カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)由来のプロモーター領域                        |
| <i>npt</i>         | 大腸菌( <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 をコードする塩基配列。     |
| NOS 3'             | 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)<br><i>A. tumefaciens</i> 由来のノバリン合成酵素コード配列のターミネーター領域 |

なお *npt* 遺伝子カセットは、後代において *cre* 遺伝子により Cre リコンビナーゼを発現する別の遺伝子組換え個体と交配させ除去するように、その前後に *loxP* - 2 配列が結合されている。

## 6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主への導入にはパーティクルガン法を用い、発現ベクターPV-ZMPQ76 の導入 DNA 領域が宿主に導入された。

導入後、パロ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を得た。PCR 法で、*cordapA* 遺伝子の存在を確認した再生個体について、その個体中に含まれる *loxP* - 2 配列に挟まれた *npt* 遺伝子を除去するために、*cre* 遺伝子により Cre リコンビナーゼを発現するトウモロコシと交配させた。その後、*cordapA* 遺伝子を含み、かつ、交配による *npt* 遺伝子と *cre* 遺伝子を含まない個体の選抜を行って、商品化系統 LY038 とした。

## 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

発現ベクターPV-ZMPQ76 を遺伝子導入して得られた初期世代の LY038 系統のゲノム中に挿入された *cordapA* 遺伝子、*npt* 遺伝子の挿入箇所数、コピー数、挿入遺伝子発現カセットの完全性及び外側骨格配列の有無を確認するために、サザンブロット分析を行った。その結果、*cre* 遺伝子により Cre リコンビナーゼを発現するトウモロコシと交配させる前の LY038 系統の導入 DNA 領域中の 1 箇所に 1 コピーの遺伝子発現カセットが完全な状態で導入されていることが確認された(模式図 A)。

これに *cre* 遺伝子により Cre リコンビナーゼを発現するトウモロコシを交配させ、さらに交配選抜を重ねることによって確立され、当評価において安全性評価対象とした商品化系統 LY038 ゲノム中における *cordapA* 遺伝子の挿入箇所数、コピー数、挿入遺伝子発現カセットの完全性、*npt* 遺伝子及び外側骨格配列の有無を確認するために、サザンブロット分析を行った。その結果、LY038 系統の DNA 領域中の 1 箇所に 1 種類(*cordapA* 遺伝子)の遺伝子発現カセット

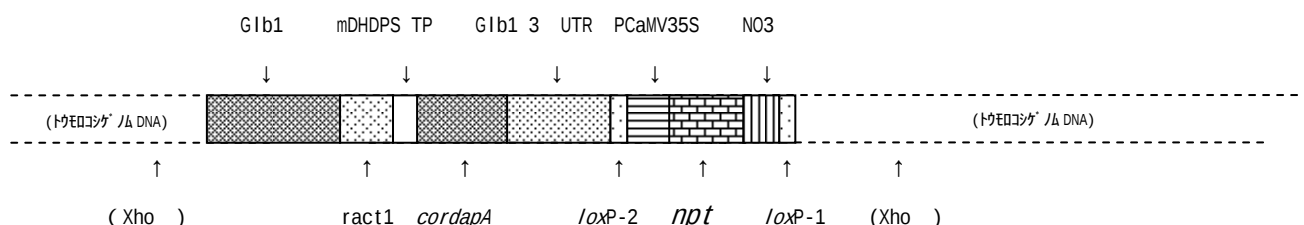
が完全な状態で 1 コピー導入されていることが確認された（模式図 B）。また、当該系統において、CaMV35S promoter 領域、*npt* 領域及び NOS 3 領域に対するプローブを用いてサザンブロット分析を行った結果、これらに対応する DNA 領域は検出されず、*npt* 遺伝子発現カセットは Cre リコンビナーゼにより除去されていることが示された。また、交配選抜を重ねることによって確立され、当評価において安全性評価対象とした商品化系統 LY038 について、この部位特異的相同組換え系を作用させるために交配導入した Cre リコンビナーゼ DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、これらに対応する DNA 領域は検出されず、*cre* 挿入遺伝子は交配選抜によって分離脱落（segregate）されていることが確認された。

また、プラスミド外骨格は検出されなかった。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

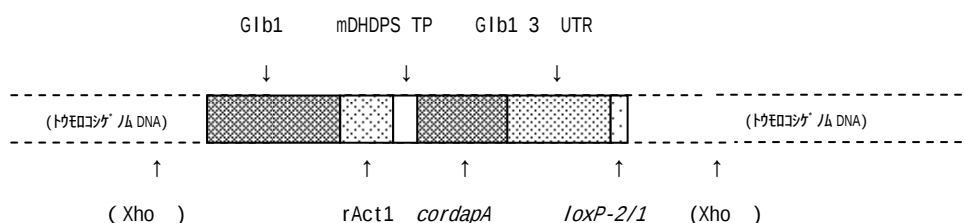
プローブを用いてポジティブコントロール（Cre event の作出に用いたプラスミド・ベクター）では予想どおりのバンドが検出した。

#### ・組換えトウモロコシ LY038 系統に挿入された DNA（模式図）

模式図 A（*npt* 遺伝子除去前）



模式図 B（*npt* 遺伝子除去後）



#### （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

サザンブロット分析及び PCR 分析の結果、商品化系統として最終的に確立された LY038 系統中にはプラスミド PV-ZMPQ76 の *cordapA* 遺伝子発現カセット DNA 領域 1 コピーのみが導入されており、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ている。このことから、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていないと考えられたが、PCR 法及び塩基配列分析によって LY038 系統の挿入遺伝子近傍のゲノム DNA と非組換え体ゲノム DNA 配列を比較したところ、LY038 系統では 8,021bp の断片が欠失していることが確認された。

この欠失している 8,021bp の配列の中に既知の遺伝子が含まれている可能性を調べるため、全塩基配列の解析が終了しているイネゲノムの GenBank データベースを用いて BLASTN 法により DNA の相同検索を行った。その結果、E-value が  $1 \times 10^{-30}$  以下の高い相同性を持つ配列は存在せず、欠失配列には、既知の遺伝子が含まれている可能性は低いと考えられた。（参考文献 31）

また、挿入遺伝子の 3' 末端に PCR 産物の DNA 配列と一致しない 9bp の配列がそれぞれ隣接していることが判明した。(参考文献 32)

これについて、挿入遺伝子周辺の植物ゲノムの DNA 配列(5' 末端は 1,781bp、3' 末端は 667bp) に GenBank を用いて BLASTN 法により検索した。その結果、E-value が  $1 \times 10^{-30}$  以下の高い相同性を持つ配列は存在せず、挿入遺伝子がトウモロコシゲノム中に存在する遺伝子を破壊している可能性は低いと考えられた。(参考文献 31)

なお、念のためにこれら配列を含む領域が発現・翻訳されたと仮定して、フレームシフトも想定してこの推定上のオープンリーディングフレーム(ORF)と既知のアレルゲンあるいは毒素の配列との相同性を検索した結果、有意な相同性を有するものは見い出されることが確認された。(参考文献 33)

## 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

cDHDPS タンパク質の組換え体及び非組換え体中の発現量を測定した。

2002 年に行った栽培試験において、5 箇所の圃場から採取した試料を供試し、LY038 系統並びに対照の非組換え体の穀粒、茎葉、根、花粉及び成熟葉について、ELISA 法(参考文献 34)により発現レベルを測定した。

LY038 系統における cDHDPS タンパク質の発現量の平均値は、穀粒で  $24 \mu\text{g/g}$  生組織重量(以下「FW」という。)、茎葉で  $0.25 \mu\text{g/g}$ (FW)、根で  $0.14 \mu\text{g/g}$ (FW)、花粉で  $0.43 \mu\text{g/g}$ (FW)、成熟葉で検出限界以下であった。

## 3 遺伝子産物(タンパク質)が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

### ・ cDHDPS タンパク質

圃場試験で収穫された LY038 系統の穀粒における cDHDPS タンパク質の最大発現量は、 $43 \mu\text{g/g}$ (FW)であった。

日本人一日一人当たりの「とうもろこし・加工品」の平均摂取量  $0.4\text{g}$ (参考文献 35)をすべて LY038 系統に置き換えて計算すると、cDHDPS タンパク質の一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で  $17.2 \mu\text{g}$  となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量  $72.2\text{g}$ (参考文献 36)に基づき、cDHDPS タンパク質が一日タンパク摂取量に占める割合を計算したところ、 $2.38 \times 10^{-5} \%$ であった。

## 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

*cordapA* 遺伝子の供与体である *C. glutamicum* の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

cDHDPS タンパク質がアレルギー誘発性を持つという知見はこれまでのところ報告されていない。

### (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

#### 人工胃液に対する感受性

*E. coli* で発現させた cDHDPS タンパク質を人工胃液中で処理し、タンパク質染色法及びウェスタンブロット分析を行ったところ、試験開始後 30 秒以内で免疫応答反応の検出限界以下に

消化された。

なお、人工胃液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia) に記載されている方法に従って調製した。

人工腸液に対する感受性

*E. coli* で発現させた cDHDPS タンパク質を人工腸液中で処理し、ウェスタンブロット分析を行ったところ、人工腸液中では 24 時間後に cDHDPS タンパク質の免疫反応性の 70% が失われていることが確認されたが、cDHDPS タンパク質の分解産物である 29kDa 及び 25kDa のバンドは、試験開始 24 時間後も観察された。

加熱処理に対する感受性

cDHDPS タンパク質を産生する LY038 系統トウモロコシの穀粒を用いた加熱試験では、204 の温度で 20 分間熱処理することによってトウモロコシの穀粒粉末中の cDHDPS タンパク質の免疫反応性が検出限界以下であることがウェスタンブロット分析により確認されている (参考文献 37)。

- (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

cDHDPS 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、752 の既知アレルゲン及びグリアジンからなるデータベースを用いて比較を行った。比較は、データベース検索の標準法である FASTA 型アルゴリズム (参考文献 38, 39, 40, 41, 42) を使用した。また、cDHDPS タンパク質について、アミノ酸配列中に抗原決定基を示す可能性のある配列が含まれているかを確認するために、連続する 8 つのアミノ酸による相同性検索を行った。

いずれの検索においても、cDHDPS タンパク質について、既知アレルゲン及びグルテン過敏性腸疾患に関連するタンパク質との間に構造相同性がないことが確認された。

- (1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、cDHDPS 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

LY038 系統の 5 世代について、cDHDPS タンパク質の発現を指標として分離比調査を行った結果、全ての世代で実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかった。

LY038 系統の挿入遺伝子の後代における安定性を確認するために、複数世代のゲノム DNA を発現ベクター中の導入 DNA 領域を制限酵素 *Nde* と *Nco* で切断し、導入 DNA 領域をカバーする 4 つのプロンプトを用いてサザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが確認された。

LY038 系統における cDHDPS タンパク質の発現の安定性を確認するために、複数世代の穀粒粉末を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、各世代において cDHDPS タンパク質の分子量と一致するバンドが示された。

以上のことから、LY038 系統の挿入遺伝子は、メンデルの法則に従って単一の優性遺伝子として後代に安定して遺伝することが確認された。

## 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

### 【DHDPs タンパク質】

cDHDPs タンパク質は、リシン合成経路の L-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の合成反応を触媒する。ジヒドロジピコリン酸から、その後数段階の反応を経てリシンが、合成される。本来、トウモロコシの内在性 DHDPs タンパク質は、リシンの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抑制を起こすが、cDHDPs タンパク質は、リシンの蓄積によるフィードバック阻害を受けない(参考文献 43)ので、ジヒドロジピコリン酸の生成抑制を起こさないことから、結果としてトウモロコシ中での遊離リシンの生成量が、従来のトウモロコシに比べ増加することとなる。

### 【リシン】

LY038 系統の穀粒における総リシン量は、4,800  $\mu\text{g/g}$ (DW)であった。

日本人一日一人当たりの「とうもろこし・加工品」の平均摂取量 0.4g(水分:8.9%) (参考文献 35) をすべて LY038 系統に置き換えて計算すると、リシンの一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で 1,747  $\mu\text{g}$  となる。

また、一日一人当たりのリシンの平均摂取量を「国民栄養の現状 平成 14 年国民栄養調査結果」及び「五訂食品成分表」から計算すると、5.57g であり、一日リシン摂取量に占める割合を計算したところ、 $3.14 \times 10^{-2}\%$ であった。

### 【リシンの代謝産物】

LY038 系統は、トウモロコシ中での遊離リシンの生成量が従来トウモロコシに比べ増加することから、その合成経路及び代謝経路に対し、どのような変化を起こすかを確認した。

合成経路については、リシン合成の前駆体である 2,6-ジアミノピメリン酸及びホモセリンを分析した結果、両成分については、非組換え対照品種との間に統計学的な有意差は認められなかった。

代謝経路については、カダベリン、サッカロピン、 $\alpha$ -アミノアジピン酸、L-ピペコリン酸を分析した結果、サッカロピン、 $\alpha$ -アミノアジピン酸について非組換え対照品種との間に統計学的な有意差が認められたことから、両成分の代謝経路について考察した。

これらの代謝産物は、レンズ豆、エンドウ豆、レタス、マッシュルーム等の食品に広く存在していることが、知られている。(参考文献 44,45,46)

サッカロピン含有量は、アスパラガス(400  $\mu\text{g}/100\text{g FW}$ )、レタス(400  $\mu\text{g}/100\text{g FW}$ )、マッシュルーム(102  $\mu\text{g}/\text{g}$ )である。

$\alpha$ -アミノアジピン酸含有量は、レンズ豆(790  $\mu\text{g}/100\text{g FW}$ )、エンドウ豆(310  $\mu\text{g}/100\text{g FW}$ )、レタス(320  $\mu\text{g}/100\text{g FW}$ )である。

1 日当たりのトウモロコシ加工品の摂取量は、約 0.5g(参考文献 47)であり、このトウモロコシ加工品を LY038 系統から摂取すると仮定するとヒト(体重 50kg)が一日にトウモロコシ穀粒から摂取するサッカロピンの摂取量は 409  $\mu\text{g}$ 、 $\alpha$ -アミノアジピン酸の摂取量は 44.5  $\mu\text{g}$  となる。

サッカロピン及び $\alpha$ -アミノアジピン酸を用い最高投与量を 2,000mg/kg 体重として行った単回急性経口投与試験の結果、最高投与量においてもマウスに有害な事象は認められなかった。この結果から、サッカロピン及び $\alpha$ -アミノアジピン酸がヒトの健康に影響

を及ぼすとは考えにくい。

以上から、これら遺伝子産物が、宿主であるトウモロコシの代謝経路に影響を及ぼすが、それを摂取することによりヒトの健康に悪影響を及ぼす可能性は極めて低いと考察した。

## 7 宿主との差異に関する事項

LY038 系統と非組換え体及び非組換え商業トウモロコシ 20 品種との間で、茎葉及び穀粒について、主要構成成分、繊維、脂肪酸組成、アミノ酸組成、無機物、ビタミン類、栄養阻害物質及び二次代謝産物の分析、比較を行った。

茎葉中の主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェントファイバー、中性デタージェントファイバー）、無機物（カルシウム、リン）及びアミノ酸（リシン）を測定したところ、リンで、LY038 系統と非組換え対照品種との間に統計学的な有意差が認められたが、平均値は、従来商業品種の分析値の範囲内であった。

穀粒中のアミノ酸 18 種類、脂肪酸 8 種類、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、亜鉛）、主要構成成分（灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質）、繊維（酸性デタージェントファイバー、中性デタージェントファイバー、総食物繊維）、ビタミン類（葉酸、ナイアシン、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン B6 及びビタミン E）、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、 $\alpha$ -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、遊離リシン）及び栄養阻害物質（フィチン酸、ラフィノース）を分析したところ、グルタミン酸、ヒスチジン、イソロイシン、リシン、フェニルアラニン、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -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、総脂質、タンパク質、中性デタージェントファイバー、総食物繊維、葉酸、ビタミン E、遊離リシン、L-ピペコリン酸及びサッカロピン、で、LY038 系統と非組換え体との間に統計学的な有意差が認められたが、遊離リシン及びリシンの二次代謝産物であるサッカロピン以外の成分の平均値は、従来商業品種の分析値の範囲内であったことから、これらの統計学的な有意差は生物学的に有意な差ではないと考えられた。

遊離リシン（LY038 系統：921.9-1,697.6  $\mu\text{g/g}$  (DW)、非組換えトウモロコシ：18.4-40.2  $\mu\text{g/g}$  (DW))及び二次代謝産物であるサッカロピン（LY038 系統：499.3-818.4  $\mu\text{g/g}$  (DW)、非組換えトウモロコシ：2.8-8.3  $\mu\text{g/g}$  (DW))については、LY038 系統において従来の商業品種の分析値の範囲を超える値となっていた。また、二次代謝産物の一つである $\alpha$ -アミノアジピン酸については、LY038 系統においては、39.7-82.3  $\mu\text{g/g}$  (DW)であったが、非組換えトウモロコシについては、ほとんどが検出限界(5  $\mu\text{g/g}$ )以下であったことから、統計処理は行わなかった。

## 8 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、食品医薬品局（FDA）に 2004 年 8 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2005 年 10 月に許可を得ている。また、2004 年 8 月、農務省（USDA）に無規制栽培（商業栽培）のための申請を行い、2006 年 2 月に許可を得ている。

カナダ保健省には、2004 年 8 月、食品としての安全性審査の申請を行い、2006 年 7 月に許可を得ている、カナダ食品検査庁（CFIA）には、2004 年 8 月、環境・飼料についての安全性の申請を行い、2006 年 7 月に許可を得ている。

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、食品、飼料とし

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。

#### 9 栽培方法に関する事項

LY038 系統と従来のトウモロコシの栽培方法は従来と同じである。

#### 10 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については、従来のトウモロコシ品種と同じである。

### 第 7 第 2 から第 6 まで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。なお、申請者からは急性毒性試験のデータが提出されていたことから、このデータを念のため確認した。

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)

#### 1. 急性毒性に関する試験

*E. coli* で発現させた cDHDPS タンパク質を用いてマウスの急性強制経口投与試験が行われている。最大投与量 (800mg/kg 体重) でもマウスに有害な影響は認められなかった。このタンパク質の投与量は、体重 50kg のヒトが、1 日約 930kg のトウモロコシ穀粒を摂取することに相当する。(参考文献 48)

LY038 系統トウモロコシで生産されるリシンの二次代謝産物であるサッカロピン及び  $\alpha$ -アミノアジピン酸のマウスに対する単回摂取急性経口投与試験が行われている。

サッカロピン及び  $\alpha$ -アミノアジピン酸をそれぞれ、50, 150, 450, 2000mg/kg 体重の各投与量でマウスに対し強制経口投与した結果、最大投与量でもマウスに有害な影響は認められなかった。最大投与量の 2000mg/kg 体重のサッカロピン及び  $\alpha$ -アミノアジピン酸は、ヒトが LY038 系統から 1 日摂取すると予想される量のそれぞれ、約 24 万倍及び約 224 万倍に相当する (参考文献 49, 50)

#### 評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ (高リシントウモロコシ LY038 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」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。

## 参考文献

1. 菊池一徳. トウモロコシの生産と利用. 光林. (1987).
2. 2002 年版 FAO 農業生産年報. FAO. (2003).
3. 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. (Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France) *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, No.6. ENV/JM/MONO(2002)25.
4. Aldrich SR, Scott WO, Hoeft RG. Modern Corn Production, Third Edition. (1986). A&L Publication, Inc. Champaign, Illinois, USA.
5. Galinat WC. The Origin of Corn. Corn and Corn Improvement, Third Edition. #18 in the series *Agronomy* (Ed. Sprague GF, Dudley JW). (1988) 1-31. American Soc. of Agronomy. Madison, WI, USA.
6. Jugenheimer RW. Corns for special purposes and uses. Corn: Improvement, Seed Production and Uses. (1976) 215-233. John Wiley & Sons. New York.
7. White PJ, Pollak LM. Corn as a Food Source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. *Cereal Food World*. (1995)40:756-761.
8. OECD Consensus document on the Biology of *Zea Mays* Subsp. *Mays* (Maize). (2003). OECD.
9. Tanaka LG, El-Dahr JM, Lehrer SB. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*.(2001)107:744.
10. Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Dai Belin Peruffo A, Giannattasio M. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is major allergen. *Allergy*(2002)57:98-106.
11. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Scibola E, Trambaioli C, Giuffrida MG, Ansaloni R, Godovac-Zimmermann J, Conti A, Fortunato D, Ortolani C. The maize major allergen, which is responsible for food-induced allergic reactions, is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol*.(2000)106:744-751.
12. Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C. Lipid-transfer protein is the maize major allergen, maintaining IgE-binding activity after cooking 100 degC, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J. Allergy Clin. Immunol*.(2003)112:744-751.
13. 日本貿易月表 2003 年 12 月号(通巻 689 号). 日本関税協会. (2004).
14. 長田武正. 日本イネ科植物図譜. 平凡社. (1989).
15. 畑作全書 雑穀編. 農文協. (1981).
16. Abe S, Takayama K. 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 (1972).
17. Aida K, Chibata I, Nakayama K, Takinami K, Yamada H. Biotechnology of Amino Acid Production. Elsevier, Amsterdam, Netherlands (1986).

18. Eggeling L. Biology of L-Lysine overproduction by *Corynebacterium glutamicum*. *Amino Acids* (1994)6: 261-272.
19. Nakayama K. Lysine and Diaminopimelic Acid. *In* The Microbial Production of Amino Acids. Yamada K, Kinoshita S, Tsunoda T, and Aida K (eds.). John Wiley & Sons, New York. (1972):369-397.
20. Atlas RM. Microbiology: fundamentals and applications. Macmillan Publishing Company, New York. (1984):729-733.
21. Eggeling L, Oberle S, Sahm H. Improved L-Lysine yielded with *Corynebacterium glutamicum*: use of dapA resulting in increased flux combined with growth limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1998)49: 24-30.
22. Hodgson J. Bulk amino-acid fermentation: technology and commodity trading. *Biotechnology* (1994)12:152-155.
23. Kircher M, Pfefferle W. The fermentative production of L-lysine as an animal feed additive. *Chemosphere* (2001)43:27-31.
24. Leuchtenberger W. Amino acids: Technical production and use. *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. (1996):465-502.
25. Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* (1982)19:327-336.
26. Belanger FC, Kriz AL. Molecular basis for allelic polymorphism of the maize Globulin 1 gene. *Genetics* (1991)129: 863-872.
27. Gilbertson L. Cre-*lox* recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. *Trends Biotechnol.* (2003)21:550-555.
28. Russell SH, Hoopes JL, Odell JT. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Mol.Gen.Genet.*(1992)1:49-59.
29. Zhang W, Subbarao S, Addae P, Shen A, Armstrong C, Peschke V, Gilbertson L. Cre/*lox*-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) Plants. *Theor.Appl.Genet.* (2003)107:1157-1168.
30. Hare PD, Chua NH. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotech.* (2002)20:575-580.
31. 3BLAST analysis of the DNA Sequence Flanking the 5' and 3' End of the LY038 Insert and DNA Sequences Deleted During Transformation.
32. Characterizing the DNA Sequence of the LY038 Insertion Site in the Maize Genome. (*Monsanto Company Product Characterization Center*). (2005)
33. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in Lysine Maize LY038 : Assessment of Putative Polypeptides. (*Monsanto Company Product Characterization Center*). (2004)
34. Assessment of cDHDPs Protein Levels in Maize Tissues from Lysine Maize LY038 Collected from 2002 U.S. Field Trials. (*Monsanto Company Product Characterization Center*). (2004)
35. 国民栄養の現状 平成 14 年国民栄養調査結果. 厚生労働省. (2004).

36. 平成 14 年国民栄養調査結果の概要.厚生労働省.(2003)
37. Amended Report for MSL-19253:Immunodetection of the cDHDPS protein in Maize Grain from LY038 Following Heat Treatment.(*Monsanto Company Biotechnology Regulatory Sciences*).(2004).
38. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1988)85:2440-2448.
39. Wilbur WJ, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1983)80:726-730.
40. Pearson WR. Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA. *Meth. Enzymol*. (1990)183:63-98.
41. Givskov M, Devereux J. Sequence Analysis Primer. W.H.Freeman and Co. New York. (1992).
42. Doolittle RF. Searching through sequence databases. *Meth. Enzymol*. (1990)183: 99-110.
43. Vauterin M, Frankard V, Jacobs M. Functional rescue of a bacterial *dapA* auxotroph with a plant cDNA library selects for mutant clones encoding a feedback-insensitive dihydrodipicolinate synthase. *Plant J*. (2000)21:239-248.
44. Rozan P, Kuo YH, Lambein F. Nonprotein amino acids in edible lentil and garden pea seedlings. *Amino Acids*. (2001)20:319-324.
45. Nawaz R, Sorensen H. Distribution of Saccharopine and 2-Aminoadipic Acid in Higher Plants. *Phytochemistry*. (1977) 16:599-600.
46. Oka Y, Tsuji H, Ogawa T, Sasaoka K. Quantitative determination of the free amino acids and their derivatives in the common edible mushroom, *Agaricus bisporus*. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. (1981)27:253-262.
47. 厚生労働省平成 15 年国民健康・栄養調査報告. 第一出版(2006)
48. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with *E.coli*-Produced cDHDPS Protein.(*Monsanto Company*).(2003).
49. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with L-Saccharopine.(*Monsanto Company*).(2006).
50. An Acute Oral Toxicity Study in Mice with L-Alpha Aminoadipic Acid.(*Monsanto Company*).(2006).