

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性
トウモロコシ 6275 系統

2 0 0 7 年 6 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
○ 要約	2
○ チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果	3
はじめに	3
評価対象食品の概要	3
食品健康影響評価	3
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	3
1 宿主及び導入 DNA に関する事項	3
2 宿主の食経験に関する事項	4
3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	4
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	4
5 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項	4
6 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項	4
第 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
第 3 宿主に関する事項	5
1 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項	5
2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	5
3 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
4 アレルギー誘発性に関する事項	5
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	5
6 安全な摂取に関する事項	5
7 近縁の植物種に関する事項	6
第 4 ベクターに関する事項	6
1 名称及び由来に関する事項	6
2 性質に関する事項	6
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	6
1 挿入 DNA の供与体に関する事項	6
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	7
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	7

4	ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	8
5	構築された発現ベクターに関する事項	8
6	DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	9
第 6	組換え体に関する事項	9
1	遺伝子導入に関する事項	9
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	10
3	遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項	11
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	11
5	組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	12
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	12
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	13
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 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	13
	評価結果	13
	参考文献	14

審議の経緯

平成 18 年 9 月 29 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・関係書類の受理
平成 18 年 10 月 5 日	第 162 回食品安全委員会（要望事項説明）
平成 18 年 11 月 21 日	第 42 回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成 19 年 2 月 13 日	第 45 回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成 19 年 5 月 25 日	第 48 回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成 19 年 6 月 7 日	第 193 回食品安全委員会（報告）
平成 19 年 6 月 7 日～7 月 6 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 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	見上 彪
委員長代理	見上 彪	委員長代理 ^{*1}	小泉直子
	小泉直子		長尾 拓
	長尾 拓		野村一正
	野村一正		畑江敬子
	畑江敬子		廣瀬雅雄 ^{*2}
	本間清一		本間清一

* 1 :平成 19 年 2 月 1 日から

* 2 :平成 19 年 4 月 1 日から

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員

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	室伏きみ子
	宇理須厚雄	山川隆
	小関良宏	山崎壮
	橘田和美 ^{*1}	渡邊雄一郎
	澁谷直人	

* 1 : 橘田専門委員は平成 18 年 10 月 1 日から

要 約

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、遺伝子組換えトウモロコシ「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統」の食品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。

評価対象食品の概要

名 称 : チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統
性 質 : チョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統」は、*Bacillus thuringiensis* spp *aizawai* PS811 株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子及び *Streptomyces hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子を導入して作製され、チョウ目害虫を防除し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができるトウモロコシである。

食品健康影響評価

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 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。

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 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、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統の食品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 18 年 9 月 29 日、関係書類を受理)

評価対象食品の概要

名 称 : チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統
性 質 : チョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社(米国)

遺伝子組換えトウモロコシ「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 系統」(以下、「トウモロコシ 6275 系統」という)は、*Bacillus thuringiensis* spp *aizawai* PS811 株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子及び *Streptomyces hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子を導入して作製され、チョウ目害虫を防除し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができ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コーンスターチ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は、イネ科トウモロコシ属トウモロコシ(*Zea mays* L.)のデント種の Hi- 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

トウモロコシ 6275 系統に挿入された改変 *cry1F* 遺伝子は、*B. thuringiensis* spp *aizawai* PS811 株から単離された *cry1F* 遺伝子の塩基配列に変更を加えたものである。また、改変 *bar* 遺伝子は *S. hygroscopicus* から単離された *bar* 遺伝子の塩基配列に変更を加えたものである。

(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改変 *cry1F* 遺伝子は、チョウ目害虫に対する殺虫活性を付与するタンパク質(B.t.タンパク質)を、改変 *bar* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与するタンパク質を発現させる。デント種トウモロコシである Hi- に、改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子を含むプラスミド・ベクター PHP12537 を用いてアグロバクテリウム法によ

り導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

トウモロコシ（デント種）は、主に飼料用として栽培されているが、コーンスターチの原料として利用される他、食用油やスナック菓子に加工されて摂取されており、安全な食品としての長い利用の歴史をもつ。

3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

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 8-14%、脂質 1.2-18.8%、灰分 1.1-3.9%、炭水化物 78.4-89.8%、粗繊維 2.0-5.5%、酸性デタージェント・ファイバー (ADF) 3.0-4.3% 及び中性デタージェント・ファイバー (NDF) 8.3-11.9% 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の産生性は知られていない。

栄養阻害物質としては、フィチン酸及びトリプシンインヒビターが知られている。トウモロコシ穀粒中のフィチン酸含有量は 0.45-1.0% (DW) (参考文献 1)、トリプシンインヒビター含有量は、1.01-6.18 TIU/g (TIU: trypsin inhibitor unit) (参考文献 2) である。トリプシンインヒビターのトウモロコシ中の含有量は低く、栄養学的に問題ないとされている。(参考文献 1)

4 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法

トウモロコシ 6275 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

トウモロコシ 6275 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

トウモロコシ 6275 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

トウモロコシ 6275 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用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主以外のものは比較対象としていない。

6 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

トウモロコシ 6275 系統において、改変 *cry1F* 遺伝子カセット及び改変 *bar* 遺伝子カセットの導入により、改変 Cry1F タンパク質及び PAT タンパク質が産生されていることが、宿主との唯一の相違点と考えられる。

以上、1～6 により、トウモロコシ 6275 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

トウモロコシ 6275 系統は、そのゲノムに組み込まれた改変 *cry1F* 遺伝子が、改変 Cry1F タンパク質を産生することから、トウモロコシの害虫であるヨーロッパアワノメイガ (*Ostrinia nubilalis*)、サウスウエスタンコーンボア (*Diatraea grandiosella*)、フォールアーミーワーム (*Spodoptera frugiperda*) 等に対し抵抗性を示し、本害虫の防除を可能にする。

同様に、改変 *bar* 遺伝子が、PAT タンパク質を産生することから、除草剤グルホシネートの作用を不活化する。この作用により、トウモロコシ 6275 系統は、その栽培中にグルホシネートを散布しても影響を受けずに成長を続けることが可能となる。

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主植物として用いたトウモロコシ (*Zea mays* L.) は、デント種トウモロコシの Hi- 系統である。

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、育種の過程でプタモロコシ (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3)

コロンブスの新大陸上陸後、トウモロコシはアメリカ大陸、ヨーロッパ全土及びアジアを含む全世界に伝播した。そして、栽培地域は北緯 60 度から、南緯 40 度に至る世界各地に広く分布するようになった。(参考文献3)

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1)

4 アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシはヒトに対してアレルギーを誘発する可能性の低い食物と考えられており(参考文献1)、アナフィラキシーの事例は稀な症例であると報告されている。(参考文献4)

最近のトウモロコシのアレルゲンに関する研究では、分子量9kDaのlipid transfer protein(LTP)と呼ばれる膜輸送タンパク質(参考文献5,6)及び50kDaのタンパク質(参考文献7)が、アレルゲンタンパク質として作用するタンパク質であることが示唆されている。

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。

2005 年の全世界におけるトウモロコシの生産量は、約 7 億トンで、主な栽培国は米国、中国、ブラジル等である。(参考文献 8) 我が国では 2005 年、約 1,666 万トンのトウモロコシを輸入しており、そのうち約 1,568 万トンが米国からの輸入である。(参考文献 9)

また、2005 年に我が国に輸入されたトウモロコシのうち、約 1,221 万トンが飼料として用いられ、その約 94% が米国から輸入されており(参考文献 9)、食品等の加工用に約 445 万トンが使用されている。

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。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

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

トウモロコシ 6275 系統の作出に用いられたベクター PHP12537 は、pSB1 を用いて作出されている。

このプラスミドは、*Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 株由来である。

2 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

ベクター pSB1 の全塩基数は 36,897bp であり、クローニングベクター pSB11 の全塩基数は 6,329bp であり、それぞれの塩基配列は明らかとなっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

それぞれのベクターの制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

それぞれのベクターの塩基配列は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

ベクター pSB1 には、微生物中での選抜のための抗生物質耐性マーカー *tet* 遺伝子(*tetA*:耐性遺伝子、*tetR*:調節遺伝子)が含まれており、テトラサイクリンに対する耐性を付与する。クローニングベクター pSB11 には、抗生物質耐性マーカー *spc* 遺伝子が含まれており、スペクチノマイシンに対する耐性を付与する。なお、これらの遺伝子は宿主ゲノムには挿入されていない。

(5) 伝達性に関する事項

伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第 5 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

トウモロコシ 6275 系統に導入された遺伝子のうち、改変 *cry1F* 遺伝子は、*B. thuringiensis* spp *aizawai* に由来する *cry1F* 遺伝子を改変したものである。また、改変 *bar* 遺伝子は、*S.*

hygroscopicus に由来する *bar* 遺伝子を改変したものである。

(2) 安全性に関する事項

cry1F 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* spp *aizawai* は、自然界の土壤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 10)

bar 遺伝子が由来する *S. hygroscopicus* は土壤中に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜に対しての病原性は知られていない。(参考文献 11)

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子は、*B. thuringiensis* spp *aizawai* に由来する *cry1F* 遺伝子を基に、トウモロコシ中でのコアトキシンの発現量を高めるために、コアトキシンをコードする部分のグアニン (G) 及びシトシン (C) の含有量を高めることにより、最適化し、合成された。

改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygroscopicus* に由来する *bar* 遺伝子を基に、開始コドンを変更し、トウモロコシ中での発現量を高めるために最適化した。産生される PAT タンパク質のアミノ酸配列は改変されていない。

挿入 DNA の要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図等は明らかとなっている。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

トウモロコシ 6275 系統に導入された T-DNA の挿入部分の塩基数は 6,779bp であり、制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子は、トウモロコシの害虫であるチョウ目昆虫を防除するタンパク質をコードしており、改変 *bar* 遺伝子は除草剤に対し耐性を有するタンパク質をコードしている。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

発現ベクターの T-DNA 領域外には、テトラサイクリン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *tet* 遺伝子及び *spc* 遺伝子を含んでいるが、宿主には導入されていないことが、サザンブロット分析により確認されている。

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 PHP12537 の 2 つの遺伝子カセットのうち、改変 *cry1F* 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ユビキチン 1 プロモーター (UBI1ZM) である。(参考文献 12)

また、改変 *bar* 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由来の CaMV35S プロモーター (CaMV35S PRO) である。(参考文献 13)

(2) ターミネーターに関する事項

プラスミド PHP12537 の改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子カセットのターミネーターは、ジャガイモ由来のプロテアーゼインヒビター 遺伝子(PIN)である。(参考文献 14)

(3) その他

改変 *bar* 遺伝子の転写効率を増強するために、CaMV35S プロモーターの上流にカリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S エンハンサー (CaMV35S ENH) が組み込まれている。

また、PAT タンパク質の発現を高めるために、改変 *bar* 遺伝子上流にトウモロコシ由来のアルコール脱水素酵素イントロン 1 (ADH1) が組み込まれている。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

トウモロコシ 6275 系統の作出に用いた発現ベクター PHP12537 は、ベクター pSB1 に改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子カセットを DNA クローニング法で組込み構築された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

トウモロコシ 6275 系統は、発現ベクター PHP12537 を用いて作出された。PHP12537 の塩基数は 49,698bp である。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。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

構築された発現ベクターには、改変 *Cry1F* タンパク質及び PAT タンパク質以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームは含まれていない。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

トウモロコシ 6275 系統は発現ベクター PHP12537 を用いて、アグロバクテリウム法により作出されたものである。改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子のコード配列及び組換え体内でのこれらの遺伝子発現に必要な調節要素を含む挿入領域は、発現ベクター上で明らかとなっている。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないように純化されていること

発現ベクター PHP12537 の各要素は明らかにされており、挿入領域に目的以外の遺伝子は含まれていない。

・トウモロコシ 6275 系統への挿入 DNA

改変 <i>cry1F</i> 遺伝子カセット	
UBI1ZM	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター領域 (イントロン及び 5' 末端の翻訳されない配列を含む)
改変 <i>cry1F</i>	トウモロコシで最適に発現するように合成された <i>B. thuringiensis</i> spp <i>aizawai</i> 由来の <i>cry1F</i> 遺伝子

PIN	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) ジャガイモ由来のプロテアーゼ のタ - ミネーター領域
改変 <i>bar</i> 遺伝子カセット	
CaMV35S ENH	カリフラワーモザイクウイルス 1841 株由来の 35S エンハンサー
CaMV35S PRO	プロモーター領域(遺伝子の転写に必要な配列) カリフラワーモザイクウイルス 1841 株由来の 35S プロモーター
ADH1	トウモロコシ由来のアルコール脱水素酵素イントロン 1
改変 <i>bar</i>	<i>S. hygroscopicus</i> 由来のホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子
PIN	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) ジャガイモ由来のプロテアーゼ のタ - ミネーター領域

6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主 Hi- への導入にはアグロバクテリウム法を用い、発現ベクター PHP12537 の導入 DNA 領域が宿主に導入された。

Hi- の未成熟胚を、PHP12537 をもつ *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) LBA4404 株と共に培養した後、抗生物質カルベニシリン及び除草剤グルホシネート・アンモニウムを含む新しい培地に移した。その後、胚組織を植物体まで再生し温室に移した後、植物体から葉片サンプルを採取し、PCR 法により導入遺伝子の存在を確認し、ELISA 法により改変 Cry1F タンパク質の発現を確認した。さらに、植物体すべてをヨーロッパアワノメイガに対する生物検定に供し、害虫抵抗性を確認した。

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 PHP12537 を遺伝子導入して得られたトウモロコシ 6275 系統のゲノム中に挿入された改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *bar* 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。(参考文献 15) その結果、改変 *cry1F* 遺伝子カセットのうち、UBI1ZM プロモーターの全てとイントロンの一部が欠失していることが示唆された。改変 *bar* 遺伝子カセットは、完全な状態で 1 コピー存在することが確認された。また、発現ベクター PHP12537 の、外骨格領域 DNA (*tet* 遺伝子, *spc* 遺伝子を含む)は、サザンブロット分析を行った結果検出されなかった。

T-DNA 領域における個々の遺伝子要素と挿入を確認するために、宿主ゲノム境界領域を含むトウモロコシ 6275 系統における挿入遺伝子全体のクローニング及び塩基配列の決定を行った。(参考文献 16)

トウモロコシ 6275 系統のゲノム DNA と PHP12537 の T-DNA 領域を比較したところ、トウモロコシ 6275 系統には挿入 T-DNA 領域の 3 末端及び 5 末端の一部が欠失していた。5 末端における欠失は、サザンブロット分析で示唆された UBI1ZM プロモーター全てと UBI1ZM イントロンの一部が欠失していることが、明らかとされた。(参考文献 16)

3 末端における欠失は、T-DNA のゲノムへの挿入において、しばしば起こる現象として知られ

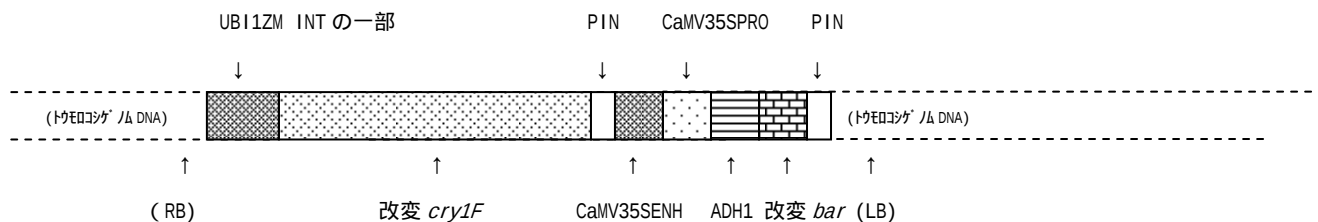
ている。(参考文献 17)

5 末端における欠失にともないトウモロコシ 6275 系統では、UBI1ZM プロモーター全てと UBI1ZM イントロンの一部が欠失しているにもかかわらず、トウモロコシ 6275 系統において改変 Cry1F タンパク質が発現している。この理由は以下のように考えられる。

・トウモロコシ 6275 系統に挿入された 5 末端近傍配列においては、プロモーター活性をもつ配列が存在する可能性は低く、また、5 末端近傍配列の解析によりオープンリーディングフレームが、存在しないことも確認されている(参考文献 16)ことから、5 末端近傍領域にプロモーターが、存在する可能性は低いと考えられる。

・Salgueiro らは、トウモロコシのコビキチンイントロンが、プロモーター活性をもつことを報告しており、コビキチンイントロンに存在する TATA ボックス様の配列(TATAA)がプロモーター活性の可能性を示唆している。(参考文献 18) この TATAA 配列は、トウモロコシ 6275 系統に挿入された UBI1ZM イントロンの 3 末端側に存在することから、UBI1ZM イントロンが、プロモーターとして働いている可能性が高いと考えられる。

・組換えトウモロコシ「トウモロコシ 6275 系統」に挿入された DNA (模式図)



(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

遺伝子解析ソフト Vector NTT7.1(Informax 社)を用いた分析により、トウモロコシ 6275 系統に挿入された T-DNA の 5 末端及び 3 末端隣接境界領域に新たなオープンリーディングフレームは、存在しないことが確認された。(参考文献 16)

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

改変 Cry1F タンパク質及び PAT 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。

2001 年及び 2002 年に行った栽培試験において、6 箇所の圃場から採取した試料を供試し、トウモロコシ 6275 系統並びに対照の非組換え体の穀粒、葉、根、花粉、茎、全植物について、ELISA 法(参考文献 19)により発現量を測定した。

トウモロコシ6275系統における改変Cry1Fタンパク質の最大発現量は、穀粒(成熟期)で1.14ng/mg (DW)、葉(糊熟期)で44.8ng/mg (DW)、根(抽出期)で6.60 ng/mg (DW)、花粉(抽出期)で3.67 ng/mg (DW)、茎(抽出期)で11.0 ng/mg (DW)、全植物(抽出期)で7.16ng/mg (DW)であった。また、PATタンパク質の最大発現量は、穀粒(成熟期)で23ng/mg(DW)、葉(糊熟期)で682ng/mg (DW)、根(抽出期)で253 ng/mg (DW)、花粉(抽出期)で0.20 ng/mg (DW)、茎(抽出期)で282 ng/mg (DW)、全植物(抽出期)で72ng/mg (DW)であった。

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

圃場試験で収穫されたトウモロコシ 6275 系統の穀粒における改変 Cry1F タンパク質及び PAT タンパク質の最大発現量は、1.14ng/mg(DW)及び 23ng/mg(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 0.5g（参考文献 20）をすべてトウモロコシ 6275 系統に置き換えて計算すると、改変 Cry1F タンパク質及び PAT 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 0.57 µg 及び 11.5 µg となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 71.5g（参考文献 20）に基づき、改変 Cry1F タンパク質及び PAT 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、0.00000080% (8.0×10^{-7} %)、及び 0.000016% (1.6×10^{-5} %) となる。

4 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

cry1F 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* spp *aizawai* 及び *bar* 遺伝子の供与体である、*S. hygroscopicus* とともに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

改変 Cry1F 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。

PAT タンパク質についてはこれまでに多くの評価が行われており、当該タンパク質とその供与体に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。また、人工胃液中で 15 秒以内に消化されること、哺乳類の胃内環境を模した条件下では、1 分以内に活性を失うこと、GenBank に登録されている既知アレルゲンとアミノ酸の相同性を示さないこと、加熱や酸性環境下で速やかに変性すること等が報告されており、PAT タンパク質がヒトに対してアレルギーを誘発する可能性は極めて低いと結論されている。（参考文献 11）

また、当該タンパク質については、既に日本において、LLCotton25(バイオクロップサイエンス株)に導入された *bar* 遺伝子により発現しており、その安全性評価は平成 16 年 6 月 10 日に終了している。

(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

Pseudomonas fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質を人工胃液中で処理し、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。（参考文献 21）

その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 15 秒以内に速やかに消化された。ウェスタンブロット分析では、免疫応答反応性ポリペプチドは検出されなかった。

PAT タンパク質については、実施されていない。

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

P. fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質を人工腸液中で処理し、SDS-PAGE 分析を

行った。(参考文献 22) その結果、人工腸液中では 120 分後にも観察された。

PAT タンパク質については、実施されていない。

加熱処理に対する感受性

改変 Cry1F タンパク質を 100 ° で加熱処理(5、15 分間)することによる分子量変化を SDS-PAGE により確認したところ、改変 Cry1F タンパク質の分解が若干認められたが、ほとんど変化がないことが確認された。また、100 ° で 15 分間加熱処理することによる免疫応答反応性の変化を ELISA 法で確認したところ、加熱処理後の免疫応答反応性は完全に失われていた。

PAT タンパク質については、実施されていない。

(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

改変 Cry1F タンパク質及び PAT 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、グリアジンを含む 526 の既知アレルゲンからなるデータベースを用いて、80 個の連続アミノ酸配列からなる“ウインドウ”を設定し、1 アミノ酸ずつずらしながら相同性を比較した結果、35 % 以上の相同性は検出されなかった。(参考文献 23,24) 比較は、探索ソフトウェア GCGFASTA(Version10.3 of the GCG(Accelrys, Inc., San Diego, CA))を使用した。

また、改変 Cry1F 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、グリアジンを含む 2,228 の既知アレルゲンからなる公開データベース(SwissProt, GenBank, PIR 等)を用いて、連続する 8 つのアミノ酸による相同性検索を行った結果、相同性は検出されなかった。(参考文献 23) 比較は、探索ソフトウェア FINDPATTERNS(Version10.3 of the GCG(Accelrys, Inc., San Diego, CA))を使用した。

(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 Cry1F 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。また、PAT タンパク質についても(1), (2), (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、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

トウモロコシ 6275 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 領域を複数の制限酵素で切断し、導入 DNA 領域をカバーする 2 つのプローブを用いてサザンブロット分析を行った。(参考文献 25) その結果、改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *bar* 遺伝子について各世代において共通のバンドが確認された。

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

改変 Cry1F タンパク質は、*B. thuringiensis* の Cry1F タンパク質と同様に酵素活性を持たないため、宿主の代謝経路へ影響を及ぼすものでない。また、PAT タンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分である *L*-グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有するため、宿主の代謝経路へ影響を及ぼすものでないと考えられる。

7 宿主との差異に関する事項

2002年に米国及びカナダの6圃場で栽培されたトウモロコシ 6275 系統と非組換え体との間で、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、栄養障害物質及び二次代謝産物の分析、比較を行った。

穀粒中の主要構成成分（灰分、炭水化物、タンパク質、脂質）、繊維（粗繊維、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維）、脂肪酸 5 種類、アミノ酸 18 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、ナトリウム、亜鉛）、ビタミン類（葉酸、ビタミン A、ビタミン B1、ビタミン B2、ビタミン E、総トコフェロール）、栄養障害物質（フィチン酸、トリブシンインヒビター）、二次代謝産物（イノシトール、ラフィノース、フルフラール、*p*-クマル酸、フェルラ酸）を測定したところ、全ての分析成分においてトウモロコシ 6275 系統と非組換え体との間に統計学的な有意差は認められなかった。

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）は 2004 年 6 月に安全性審査を終了した。また、農務省（USDA）は、2004 年 11 月に無規制裁培（商業栽培）の決定をした。さらに、環境保護局（EPA）は、2005 年 5 月 27 日に登録を許可した。

カナダ保健省は、2006 年 6 月 28 日、食品としての安全性確認を行った。カナダ食品検査庁（CFIA）から、2006 年 6 月 19 日、環境・飼料についての安全性の許可を得ている。

9 栽培方法に関する事項

トウモロコシ 6275 系統の栽培方法については、従来のトウモロコシ品種と同じである。

10 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ 6275 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 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見は得られており、次に示された試験は必要ないと判断される。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ 6275 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. OECD. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Secondary Plant Metabolites. (Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France) *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, No.6. ENV/JM/MONO(2002)25.
2. International Life Sciences Institute. (2006). <http://www.cropcomposition.org>
3. 戸澤英男. トウモロコシ. (社)農村漁村文化協会. (2005)
4. Tanaka LG, El-Dahr JM, Lehrer SB. Double-blind, placebo-controlled corn challenge resulting in anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol.* (2001)107:744.
5. 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.
6. 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 major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol.* (2003)112:775-783.
7. Pasini G, Simonato B, Curioni A, Vincenzi S, Cristaudo A, Santucci B, Peruffo AD, Giannattasio M. IgE-mediated allergy to corn: a 50 kDa protein, belonging to the Reduced Soluble Proteins, is a major allergen. *Allergy.* (2002)57:98-106.
8. FAOSTAT. (2006). <http://faostat.fao.org>
9. 財務省貿易統計(2006) <http://customs.go.org>
10. Mackenzie D, McLean M. Who's afraid of GM feed? *FEED MIX.* (2002)10:16-19.
11. OECD. Consensus Document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. (Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France) *Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology*, No.11. ENV/JM/MONO(1999)13.
12. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology.* (1992)18:675-689.
13. Pietrzak M, Shillito RD, Hohn T, Potrykus I. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acid Research* (1986)14:5857-5868.
14. An G, Mitra A, Choi HK, Costa MA, An K, Thornburg RW, Ryan CA. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plan*

Cell(1989)1:115-122.

15. Green SB, Luckring AK, Locke ME. Detailed Molecular Characterization of the DNA Inserted into Transgenic Corn Event TC6275. (2003) DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware.
16. Tagliani L, Song P, Sanders C, Locke M. Insert and Border Sequence Characterization of B.Cry1F Maize Event TC6275. (2003) DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware/Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana.
17. Tinland B, Hohn B, Puchta H. *Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred DNA (T-DNA) into the plant cell nucleus. *Proc.natl.Acad.Sci. USA*(1994)91:8000-8004.
18. Salgueiro S, Pignocchi C, Parry M. Intron-mediated *gusA* expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment. *Plant Molecular Biology*(2000)42:615-622.
19. Essner R. Nutrient composition and/or Quantitative Analysis of Cry1F and BAR Protein Rexpression Levels of Maize Hybrid, Inbroad and Progenitor Lines Containing Event TC6275. (2003) Pioneer Hi-Bred international., Johnston, Iowa.
20. 厚生労働省平成 15 年国民健康・栄養調査報告. 第一出版 (2006).
21. Schafer BW, Korjagin VA. *In Vitro* Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Truncated Cry1F Delta-endotoxin Derived from *Pseudomonas fluorescens*. (2002) Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana.
22. Korjagin VA, Ernest AD. *In Vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1F(tr). (2000) Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana.
23. Song P. Comparison of the Amino Acid Sequences of *Bacillus thuringiensis* var. aizawai Insecticidal Crystal Protein as Expressed in Maize to Known Protein Allergens. (2004) Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana.
24. Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*(2005)41:134-149.
25. Locke ME, Tyree C. Characterization of DNA Inserted into Transgenic Corn Event TC6275. (2003) DuPont Experimental Station, Wilmington, Delaware.