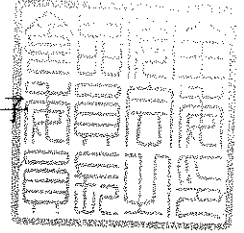




府食第544号
平成24年5月31日

厚生労働大臣
小宮山 洋子 殿

食品安全委員会
委員長 小泉 直子



食品健康影響評価の結果の通知について

平成23年2月21日付け厚生労働省発食安0221号第2号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 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」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）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と判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グルホシネート耐性及びチヨウ目
害虫抵抗性ワタ GHB119 系統

2012年5月

食品安全委員会

目 次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<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>.....	3
要 約.....	4
Ⅰ. 評価対象食品の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
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.....	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	5
2. 宿主の食経験に関する事項.....	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	5
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.....	6
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.....	6
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.....	6
第 2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	6
第 3. 宿主に関する事項.....	7
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.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
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.....	7
6. 安全な摂取に関する事項.....	7
7. 近縁の植物種に関する事項.....	7
第 4. ベクターに関する事項.....	7
1. 名称及び由来に関する事項.....	7
2. 性質に関する事項.....	7
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.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
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.....	8
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.....	9
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	11
第 6. 組換え体に関する事項.....	11
1. 遺伝子導入に関する事項.....	11
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.....	13
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.....	13
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.....	13
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	15
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.....	15
7. 宿主との差異に関する事項.....	15
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	16
9. 栽培方法に関する事項.....	17
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	17
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.....	17
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	17
<参照>.....	17

<審議の経緯>

2011年2月22日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安0221第2号）、関係書類の接受
2011年2月24日	第368回食品安全委員会（要請事項説明）
2011年3月7日	第89回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年3月14日	第102回遺伝子組換え食品等専門調査会
2012年4月26日	第429回食品安全委員会（報告）
2012年4月26日から5月25日	国民からの御意見・情報の募集
2012年5月29日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長に報告
2012年5月31日	第433回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

小泉直子（委員長）
熊谷 進（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
村田容常

<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>

2011年9月30日まで		2011年10月1日から	
澤田純一（座長）		澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）		鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	澁谷直人	五十君静信	手島玲子
石見佳子	手島玲子	宇理須厚雄	中島春紫
海老澤元宏	中島春紫	橘田和美	飯 哲夫
小関良宏	飯 哲夫	児玉浩明	和久井信
橘田和美	山崎 壮	澁谷直人	
児玉浩明	和久井信		

要 約

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を行った。

本系統は、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ビアラフォス耐性遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota* に由来する *cry2Ae* 遺伝子を導入して作出されており、改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素及び Cry2Ae タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネート及びチョウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、遺伝子の導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分等の比較等について確認した結果、非組換えワタと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、本系統については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統
性質：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性
申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社
開発者：Bayer CropScience（ドイツ）

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統」（以下「ワタ GHB119」という。）は、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ピアラフォス耐性遺伝子（改変 *bar* 遺伝子）及び *Bacillus thuringiensis* ssp. *dakota* に由来する *cry2Ae* 遺伝子を導入して作出されており、改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（改変 PAT タンパク質）及び *Cry2Ae* タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネート及びチョウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。

II. 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

宿主は、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 Coker312 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygroscopicus* である。また、*cry2Ae* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *dakota* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *bar* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する改変 PAT タンパク質を発現する。また、*cry2Ae* 遺伝子はチョウ目害虫抵抗性を付与する *Cry2Ae* タンパク質を発現する。

改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

ワタ種子から搾油した綿実油が古くから食用に用いられている。また、綿実の殻に含まれるヘミセルロースは、キシロースやキシリトールの原料として用いられている。さらに綿実のリンター（地毛）から製造されたセルロースは、食品や医薬品の原料として用いられている。

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

ワタ種子の主要栄養組成は、水分 4.0～15.9%、粗タンパク質 11.7～34.2%、粗脂質 11.8～36.3%、灰分 3.2～6.2%、炭水化物 24.5～74.4%である（参照 1,2,3,4）。

(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

ワタ種子の有害生理活性物質は、遊離ゴシポール 0.23～1.40%（乾燥重量）、ステルクリン酸 0.12～0.92%（脂質中）、マルバリン酸 0.17～1.5%（脂質中）である（参照 3,4,5,6）。

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

ワタ GHB119 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のワタと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ワタ GHB119 の摂取部位は、従来のワタと変わらない。

(3) 摂取量

ワタ GHB119 の摂取量は、従来のワタと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ワタ GHB119 の調理及び加工方法は、従来のワタと変わらない。

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

ワタ GHB119 は、改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子の導入によって、改変 PAT タンパク質及び *Cry2Ae* タンパク質を発現することが宿主との相違点である。

以上、1～6 から、ワタ GHB119 の安全性評価においては、既存のワタとの比較が可能であると判断した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ワタ GHB119 は、導入された改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子が改変 PAT タンパク質及び *Cry2Ae* タンパク質を発現することによって、除草剤グルホシネート及びチョウ目害虫の影響を受けずに生育することができるとされている。

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

宿主は、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ（*G. hirsutum* L.）の商業品種 Coker312 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

ワタ属に属する品種のうち、栽培種は、*G. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum* 及び *G. barbadense* の4種であり、現在生産されているワタのほとんどが *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* である。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタ種子には、ゴシポール及びステルクリン酸、マルバリン酸などのシクロプロペン脂肪酸が含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ワタは、主要なアレルギー誘発性食品とは考えられていない。

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

ワタには、細菌及びウイルスによる各種病害が知られているが、これらがヒトに対して病原性を持つことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸が含まれているが、綿実油の製造工程で除去されるか、著しく減少することが知られている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ属の近縁種には、ゴシポールが含まれていると考えられている。

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

ワタ GHB119 の作出に使用された導入用プラスミド pTEM12 の構築には、プラスミド pTYG50 が用いられた。

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

プラスミド pTYG50 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pTYG50 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pTYG50 の塩基配列は明らかになっており、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

プラスミド pTYG50 には、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *aadA* 遺伝子並びにネオマイシンに対して耐性を付与する *npt I* 遺伝子の断片が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pTYG50 には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

改変 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygrosopicus* である。また、*cry2Ae* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *dakota* である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygrosopicus* が属する *Streptomyces* 属は、土壌、飼料、堆肥等に存在しており、ヒトに対し病原性を持つという報告はない。

cry2Ae 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *dakota* が属する *B. thuringiensis* は、微生物農薬として長年にわたり安全に利用されている。

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 *bar* 遺伝子は、*S. hygrosopicus* からクローニングされた *bar* 遺伝子の塩基配列を植物体内での発現が最適となるように改変された遺伝子である。この改変によって発現タンパク質のアミノ酸配列が1つ改変されている。

cry2Ae 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *dakota* からクローニングされた *cry2Ae* 遺伝子の塩基配列を植物体内での発現が最適となるように改変された遺伝子である。この改変によって発現タンパク質のアミノ酸配列は改変されていない。

挿入 DNA は表 1 のとおりである。

(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

改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子の塩基数、塩基配列及び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 *bar* 遺伝子

改変 *bar* 遺伝子が改変 PAT タンパク質を発現することによって、グルタミン合成酵素を阻害する除草剤グルホシネートの存在下でもグルタミン合成酵素活性を示すことができる。その結果、ワタ GHB119 は、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可能となる。

改変 PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^aを用いて *blastp* 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照7）。

・*cry2Ae* 遺伝子

cry2Ae 遺伝子がコードする *Cry2Ae* タンパク質は、チョウ目害虫等に殺虫活性を示すタンパク質（Bt タンパク質）の一種である。Bt タンパク質は、標的昆虫に摂取されると消化されて活性コアタンパク質となり、これが中腸に作用し、上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されている（参照 8,9）。なお、*Cry2Ae* タンパク質は、*Cry2Ab* タンパク質とアミノ酸配列の相同性が高く、改変 *cry2Ab2* 遺伝子が導入により改変 *Cry2Ab2* タンパク質を発現するワタ及びトウモロコシは、既に安全性評価が終了している。

Cry2Ae タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^aを用いて *blastp* 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照10）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pTEM12 の外骨格領域には、*aadA* 遺伝子及び *npt I* 遺伝子の断片が含まれているが、ワタ GHB119 のゲノムには挿入されていないことがサザンブロット分析によって確認されている。

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

改変 *bar* 遺伝子のプロモーターは、Cassava Vein Mosaic Virus 由来のプロモーターである（参照11）。

cry2Ae 遺伝子のプロモーターは、Cauliflower Mosaic Virus の 35S RNA 由来のプロモーターである（参照12）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *bar* 遺伝子のターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素遺伝子由来の 3'非翻訳領域である（参照13）。

^a Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept

cry2Ae 遺伝子のターミネーターは、Cauliflower Mosaic Virus の 35S RNA 由来の 3'非翻訳領域である（参照14）。

(3) その他

cry2Ae 遺伝子発現カセットには、改変 *Cry2Ae* タンパク質の発現を高めるために、*Petunia hybrida* 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダー配列が挿入されている（参照15）。また、*Cry2Ae* タンパク質を色素体に移行させるために、*Arabidopsis thaliana* 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子の輸送ペプチドをコードする配列が挿入されている（参照16）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pTYG50 の T-DNA 領域に、改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *cry2Ae* 遺伝子発現カセットを挿入することによって、導入用プラスミド pTEM12 が作製された。

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

導入用プラスミド pTEM12 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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

導入用プラスミド pTEM12 の T-DNA 領域の塩基配列は明らかになっており、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 (ORF) 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

意図する挿入領域は、導入用プラスミド pTEM12 の左側境界配列 (LB) から右側境界配列 (RB) までの T-DNA 領域である。

(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純化されていること

導入用プラスミド pTEM12 の T-DNA 領域内の各要素はすべて純化されており、目的外の遺伝子の混入はない。

表1 ワタ GHB119 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
LB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の左側境界配列
(改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット)	
3' nos ターミ ネーター	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) <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子 由来の 3'非翻訳領域
改変 <i>bar</i>	<i>S. hygroscopicus</i> 由来の改変 <i>bar</i> タンパク質をコードする遺伝子
csmv XYZ プロモーター	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) Cassava Vein Mosaic Virus 由来のプロモーター
(改変 <i>cry2Ae</i> 遺伝子発現カセット)	
35S2 プロモ ーター	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) Cauliflower Mosaic Virus の 35S RNA 由来 のプロモーター領域
5' cab22L	<i>P. hybrida</i> 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダ ー配列
TPssuAt	<i>A. thaliana</i> 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子の輸送ペプチド をコードする領域
<i>cry2Ae</i>	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>dakota</i> 由来の <i>Cry2Ae</i> タンパク質をコードす る遺伝子
3' 35S ターミ ネーター	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) Cauliflower Mosaic Virus の 35S RNA 由来の 3'非翻訳領域
RB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の右側境界配列

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法を用いて改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *cry2Ae* 遺伝子カセットを宿主に導入した後、グルホシネートを含む培地で選抜して再生個体が得られた。次に、一般的なワタの育成プロセスにしたがって既存の優良品種との交配及び自殖を行うことによって、ワタ GHB119 が得られた。

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

ワタ GHB119 のゲノムに挿入された改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *cry2Ae* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び *cry2Ae* 遺伝子発現カセットがそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された (参照17)。

導入用プラスミド pTEM12 の外骨格領域がワタ GHB119 のゲノムに挿入されていないことを確認するために、サザンブロット分析を行った結果、挿入されていないことが確認された (参照18)。

ワタ GHB119 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pTEM12 の T-DNA 領域の塩基配列と比較した結果、挿入 DNA の右側境界配列 20 bp 及び左側境界配列 23 bp の欠失を除き一致していることが確認された(参照19)。

ワタ GHB119 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、5'末端近傍配列 (1,019 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,026 bp) の塩基配列を決定し、宿主ゲノムの塩基配列と比較した結果、挿入時に欠失した配列 (8 bp) を除き一致していることが確認された (参照20)。

ワタ GHB119 のゲノムに DNA を挿入することによって宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、挿入前のワタ GHB119 の塩基配列 (5'末端近傍配列 (1,019 bp)、挿入時に欠失した配列 (8 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,026 bp)) について、タンパク質データベース (DAD、Genpept 及び UniProt) を用いて blastx 検索を行った結果、相同性を示す既知の塩基配列は見いだされなかった (参照21)。したがって、DNA の挿入によって宿主の既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた。

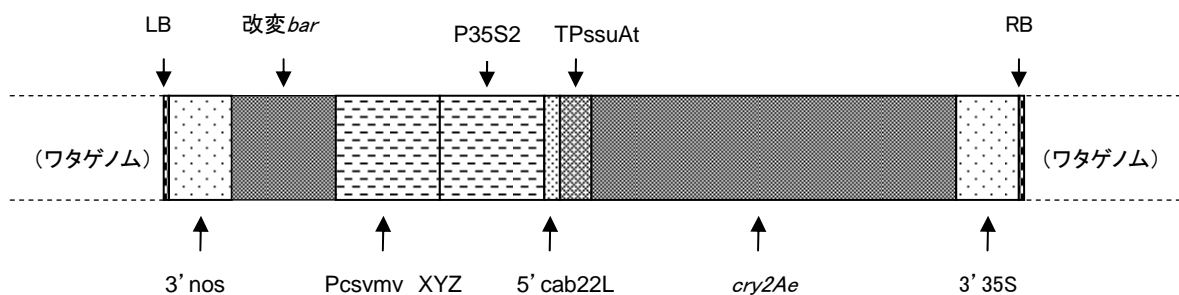


図1 ワタ GHB119 の挿入 DNA (模式図)

(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

ワタ GHB119 の挿入 DNA と 5'末端近傍配列 (1,019 bp) との接合部及び挿入 DNA と 3'末端近傍配列 (1,026 bp) との接合部において意図しない ORF が生じていないことを確認するために、六つの読み枠において ORF 検索を行った結果、3 アミノ酸以上の ORF が 11 個見いだされた (参照 21)。

11 個の ORF のうち、8 アミノ酸以上の 10 個の ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース (Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PDB、GenPept) を用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照22)。

また、8 アミノ酸以上の 10 個の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース (Allergen Online) を用いて相同性検索を行った結果、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった (参照 22)。また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース (Allergen Online) を用いて相同性検索を行った結果、連続する

8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 22）。

さらに、ORF からの発現の可能性を確認するために、挿入 DNA と 5'末端近傍配列との接合部及び挿入 DNA と 3'末端近傍配列との接合部について、ノーザンブロット分析を行った結果、発現する可能性は低いと考えられた（参照23）。

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

ワタ GHB119 の根、茎、葉、花蕾、頂端、さく、全地上部、花及び種子における改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析を行った。結果は表 2 のとおりである（参照24）。

表 2 ワタ GHB119 における改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の発現量（単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重）

分析組織	採取時期*	改変 PAT タンパク質	Cry2Ae タンパク質
根	1、3	54.6~100	11.2~16.9
茎	1、3	40.9~47.4	5.26~5.28
葉	1、2、3	78.6~114	17.8~37.5
花蕾	2	80.6	8.69
頂端	3	89.0	8.38
さく	3	36.1	4.13
全地上部	3	59.0	30.4
花	3	50.1	5.59
種子	4	2.59	0.99

* 1:生育期（4~6 葉期）、2:開花直前期、3:開花期、4:収穫期

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

ワタ GHB119 を用いて製造した綿実油の改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質含有量を ELISA 法を用いて分析を行った結果、検出限界値（改変 PAT タンパク質 5.84 ng/g、Cry2Ae タンパク質 1.86 ng/g）以下であった。

そこで、ワタ GHB119 を用いて製造した綿実油の改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質含有量を検出限界値と仮定し、日本人一人一日当たりの油脂類平均摂取量 9.9 g（参照25）をすべてワタ GHB119 を用いて製造した綿実油に置き換えて計算すると、改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の摂取量はそれぞれ 55.48 ng 及び 17.67 ng となり、日本人一人一日当たりのタンパク質摂取量 67.8 g（参照 25）に占める割合はそれぞれ 8.5×10^{-10} 及び 2.7×10^{-10} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと考えられる。

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

改変 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* 及び *cry2Ae* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* に関して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 PAT タンパク質及び *Cry2Ae* タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(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

① 人工胃液に対する感受性

・改変 PAT タンパク質

Escherichia coli で発現させた改変 PAT タンパク質の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析においては試験開始後 30 秒以内に消化されることが及びウェスタンブロット分析においては試験開始後 2 分以内に消化されることが確認された（参照26）。

・*Cry2Ae* タンパク質

B. thuringiensis で発現させた *Cry2Ae* タンパク質の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析においては試験開始後 10 分以内に消化されることが及びウェスタンブロット分析においては試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された（参照27）。

② 人工腸液に対する感受性

・改変 PAT タンパク質

E. coli で発現させた改変 PAT タンパク質の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 2 分以内に消化されることが確認された（参照28）。

・*Cry2Ae* タンパク質

B. thuringiensis で発現させた *Cry2Ae* タンパク質の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始直後にポリペプチド断片に分解され、それ以上消化が進まないことが確認された（参照29）。

③ 加熱処理に対する感受性

・改変 PAT タンパク質

E. coli で発現させた改変 PAT タンパク質の加熱による酵素活性の変化を測定した結果、35°Cを超えて、15 分間加熱することによって酵素活性が減少することが確認された（参照30）。

・*Cry2Ae* タンパク質

B. thuringiensis で発現させた Cry2Ae タンパク質の加熱による殺虫活性の変化を測定した結果、60℃の加熱処理により処理時間とともに殺虫活性が低下することが確認された（参照31）。また、ウェスタンブロット分析を行った結果、改変 Cry2Ae タンパク質は、60℃以上の加熱処理で凝集沈殿を起こすことが示された（参照32）。

(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 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース（Allergen Online）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 33,34）。また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース（Allergen Online）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致する配列は見いだされなかった（参照 33,34）。

上記、（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae 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

ワタ GHB119 に導入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、3 世代のワタ GHB119 につ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検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照35）。

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 PAT タンパク質は、グルホシネートをアセチル化することによって、グルホシネートの除草剤としての機能を失わせる。その反応は L-グルホシネートに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる（参照36,37,38）。

Cry2Ae タンパク質が酵素活性を持つという報告はなく、宿主の代謝系と独立して機能するため、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

スペインのほ場で栽培されたワタ GHB119 の種子及び非組換えワタの種子の主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル類、ビタミン E 及び有害生理活性物質の分析を行い、ほ場ごとにワタ GHB119 と非組換えワタの間の統計学的有意差について検討し、有意差が認められたほ場が過半数を占めるか否かで

ワタ GHB119 と非組換えワタとの差異について検討が行われた（参照39）。

(1) 主要構成成分

水分、粗タンパク質、粗脂肪、灰分、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び炭水化物について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかったか、差異が確認された場合であっても一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

(2) アミノ酸組成

アミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかったか、差異が確認された場合であっても一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

(3) 脂肪酸組成

主要な脂肪酸 19 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかったか、差異が確認された場合であっても一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

(4) ミネラル類

主要なミネラル 6 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかったか、差異が確認された場合であっても一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン E

総トコフェロールについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかった。

(6) 有害生理活性物質

総ゴシポール、遊離ゴシポール、マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されなかったか、差異が確認された場合であっても一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

ワタ GHB119 系統の単独での商品化の予定はなく、諸外国における申請は行われていない。

なお、ワタ GHB119 系統と除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統を掛け合わせた品種の申請状況は、以下のとおりである。

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2011年8月に確認が終了した。また、米国農務省（USDA）に対する無規制裁培の承認申請が行われ、2011年10月に承認を得た。さらに、米

国環境保護庁（EPA）に対する改変 Cry2Ae タンパク質の許容値設定除外の申請が行われ、2012年1月に承認を得た。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対する食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁（CFIA）に対する環境への安全性審査の申請及び飼料としての安全性審査の申請が行われ、2012年1月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ GHB119 の栽培方法は、従来のワタと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ GHB119 の種子の製法及び管理方法は、従来のワタと同じである。

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までによって、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 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」（平成16年1月29日 食品安全委員会決定）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と判断した。

<参照>

- 1 Amann, Mary M. Eickhoff, Jane C. Identification of nutrients and antinutrients to analyze in cotton-derived foods for human and animal consumption, Environ. 1999, p.1-5,41.
- 2 Bertrand, J A.; Sudduth, T Q.; Condon, A.; Jenkins, T C.; Calhoun, M C. Nutrient content of whole cottonseed. Journal of Dairy Science. 2005, 88(4), p.1470-1477.
- 3 ILSI. Crop composition database Search results, ver.3.0. ILSI Crop compositional database-search, 2007.
- 4 OECD. Consensus document on the biology of cotton (Gossypium spp.). ENV/JM/MONO(2008)33,2008.
- 5 Nida, Debbie L.; Patzer, Shari.; Harvey, Patricia.; Stipanovic, Robert.; Randall, Wood.; Fuchs, Roy L. Glyphosate-tolerant cotton: The compositional of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. J.Agric. Food Chem. 1996, 44(7), p.1967-1974.

- 6 Phelps, Richard A.; Shenstone, F. S.; Kemmerer, A. R.; Evans, R. J. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. *Poult. Sci.* 1965, 44, p.358-394.
- 7 PAT/bar protein amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
- 8 Knowles, Barbara H.; Dow, Julian A.T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 1993, 15(7), p.469-476.
- 9 Broderick, Nichole A.; Raffa Kenneth F.; Handelsman, Jo. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*. 2006, 103(41), p.15196-15199.
- 10 CryA2e protein amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
- 11 Verdaguer, Bertrand.; De Kochko, Alexandre.; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31, p.1129-1139.
- 12 Odell, Joan T.; Nagy, Ference.; Chua, Nam-Hai. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985, 313(28), p.810-812.
- 13 Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H.M. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics*. 1982, 1(6), p.561-573.
- 14 Sanfaçon Helene.; Brodmann Peter.; Hohn, Thomas. A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes and Development*. 1991, 5, p.141-149.
- 15 Harpster Mark H.; Townsend, Jefferey A.; Jones, Jonathan, D.G.; Bedbrook, John.; Dunsmuir, Pamela. Relative strenghts of the 35S Cauliflower Mosaic Virus, 1', 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics*. 1998, 212, p.182-190.
- 16 De Almeida Elionor R.P.; Gossele, Veronique.; Muller, Christianne G.; Dockx, Jan.; Reynaerts, Arlette.; Botterman, Johan.; Krebbers, Enno.; Timko, Michael P. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Mol. Gen. Genet.* 1989, 218, p.78-86.
- 17 Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 by Southern blot analysis (社内報告書)

- 18 Determination of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (社内報告書)
- 19 DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (社内報告書)
- 20 Determination of additional flanking sequences and the corresponding pre-insertion locus of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (社内報告書)
- 21 Bioinformatics analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (社内報告書)
- 22 Cotton transformation event GHB119: In silico analysis of additional putative Open Reading Frame (ORF) sequences for identifying potential homologies to known toxins and allergens (社内報告書)
- 23 Full expression analysis of the trait genes and newly created ORFs of cotton event GHB119 (社内報告書)
- 24 Protein expression analysis of cotton event GHB119, expressing Cry2Ae and PAT/bar proteins, USA, 2007 (社内報告書)
- 25 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室. 平成 21 年 国民健康・栄養調査結果の概要. 2010. P22-25,
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000000xtwq.html> (accessed 2011-01-14)
- 26 PAT/bar protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid (社内報告書)
- 27 Cry2Ae protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid-complement study (社内報告書)
- 28 PAT/bar protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid (社内報告書)
- 29 Cry2Ae protein in vitro digestibility study in simulated intestinal fluid (社内報告書)
- 30 Botterman, Johan.; Gossele, Veronique.; Thoen, Chris.; Lauwereys, Mark. Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. *Gene*. 1991, (102), p.33-37.
- 31 Heat stability of the Cry1Ab and Cry2Ae protein Bioassay data (社内報告書)
- 32 Analysis of the heat stability of the Cry2Ae protein (社内報告書)
- 33 PAT/bar protein amino acid sequence homology search with known allergens (社内報告書)
- 34 Cry2Ae protein amino acid sequence homology search with known allergens (社内報告書)
- 35 Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event

- GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments (社内報告書)
- 36 Thompson, Charles J.; Movva, N. Rao.; Tizard, Richard.; Cramer, Reto.; Davis, Julian E.; Lauwereys, Marc.; Botterman, Johan. Characterization of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*. 1987, 6(9), p.2519-2523.
 - 37 Droge, W.; Broer, I; Puhler, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*. 1992, 187, p.142-151.
 - 38 Wehrmann, Axel.; Van Vliet, Adri.; Opsomer, Chris.; Botterman, Joha.; Schulz, Arno. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14, p.1274-1278.
 - 39 Analysis of substantial equivalence of transgenic and non-transgenic cotton (社内報告書)