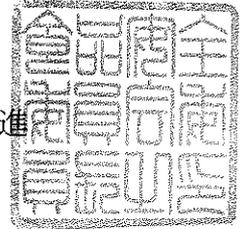




府食第882号
平成26年11月18日

厚生労働大臣
塩崎 恭久 殿

食品安全委員会
委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成25年11月20日付け厚生労働省発食安1120第1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「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701」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。また、本件に関して行った国民からの意見・情報の募集において、貴省に関する意見・情報が別添のとおり寄せられましたのでお伝えします。

記

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701」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

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性
ワタ MON88701 系統

2014年11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.....	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.....	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.....	7
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.....	8
第4. ベクターに関する事項.....	8
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに導入用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.....	9
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.....	10
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.....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	12
第6. 組換え体に関する事項.....	12
1. 遺伝子導入に関する事項.....	12
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.....	14
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.....	14
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	16
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.....	16
7. 宿主との差異に関する事項.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	17
9. 栽培方法に関する事項.....	18
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	18
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.....	18
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	18
<参照>.....	18

<審議の経緯>

- 2013年11月20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1120第1号）、関係書類の接受
- 2013年11月25日 第495回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年12月12日 第122回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年6月20日 第128回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年7月15日 第522回食品安全委員会（報告）
- 2014年7月16日から8月14日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2014年11月14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
- 2014年11月18日 第538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>

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森国敏（委員長代理）
石井克枝
上安平冽子
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>

2014年3月30日まで	2014年4月1日から
澤田純一（座長）	澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	小関良宏（座長代理*）
小関良宏 手島玲子	宇理須厚雄 手島玲子
宇理須厚雄 中島春紫	岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信
近藤一成	近藤一成

（*2014年4月24日から）

要 約

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 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実施した。

本系統は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子及び *Streptomyces hygrosopicus* に由来するビアラフォス耐性遺伝子を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ及びホスフィノトリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼを発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その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の結果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、「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 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：除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 系統

性質：除草剤ジカンバ耐性、除草剤グルホシネート耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 系統」（以下「ワタ MON88701」という。）は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子（改変 *dmo* 遺伝子）及び *Streptomyces hygroscopicus* に由来するピアラフォス耐性遺伝子（*bar* 遺伝子）を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ（改変 MON88701 DMO タンパク質）及びホスフィノトリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ（PAT タンパク質）を発現することで、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、その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、アオイ科ワタ属に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 Coker130 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、*bar* 遺伝子の供与体は *S. hygroscopicus* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *dmo* 遺伝子は、除草剤ジカンバを不活性化する酵素である改変 MON88701 DMO タンパク質を発現する。*bar* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質を発現する。

改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 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

綿実から得られた綿実油及びリンター（地毛）が食品として利用されている。綿実油は、食用油、ショートニング、マーガリン等に用いられる。リンターは、セルロースが 99%以上含まれ、ソーセージ類のケーシングや増粘剤として用いられる。

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（対乾燥重量）は、タンパク質 21.48～32.97%、総脂質 17.20～27.29%、灰分 3.76～5.34%、炭水化物 39.0～53.6%である（参照 1）。

- (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、総ゴシポール 0.55～1.52%（対乾燥重量）、遊離ゴシポール 0.45～1.40%（対乾燥重量）、ジヒドロステルクリン酸 0.08～0.31%（脂質中）、マルバリン酸 0.23～0.76%（脂質中）及びステルクリン酸 0.19～0.56%（脂質中）である（参照 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

ワタ MON88701 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 MON88701 の摂取部位は、従来のワタと変わらない。

- (3) 摂取量

ワタ MON88701 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 MON88701 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

宿主及び従来品種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 MON88701 は、改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子の導入によって、改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT 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 MON88701 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 MON88701 は、改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子が改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質を発現することによって、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートを散布しても、そ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、アオイ科ワタ属に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の商業品種 Coker130 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* であり、長い栽培の歴史を持つ。

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、ステルクリン酸、マルバリン酸等のシクロプロペン脂肪酸が含まれている。ゴシポールは、単胃動物に対して毒性があり、食欲減退、体重減少、呼吸困難等の症状を引き起こす（参照2）。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の代謝を妨げること（参照3）、鶏の卵黄の変色や孵化率の減少を引き起こすことが報告されている（参照4）。ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸は、加工により著しく量が減少する。

4. アレルギー誘発性に関する事項

綿実油は長い食経験を有し、アレルギー反応は報告されていない。ワタ繊維産業の労働者にコットンダスト吸入による綿肺症を引き起こすことが知られている（参照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

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示す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ことが知られている。なお、日本にはワタ属と交雑可能な近縁植物は存在しない。

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

ワタ MON88701 の作出に使用した導入用プラスミド PV-GHHT6997 の構築には、ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB 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

ベクターB 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、ネオマイシン及びカナマイシンに対して耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターB 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、並びに導入用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 *dmo* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、*bar* 遺伝子の供与体は *S. hygroscopicus* である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は植物の根圏や土壌等の自然環境中及び食品中に存在しており、健康なヒトに感染して悪影響を及ぼすことは知られていない。

bar 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* が属する *Streptomyces* 属は食経験がないが、土壌、飼料、堆肥等に存在しており、これらを通じてヒトは接

触経験があると考えられる。また、ヒトに対する病原性を持つという報告はない。

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 *dmo* 遺伝子は *S. maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子をクローニングすることにより構築された遺伝子である。野生型 DMO タンパク質のアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目にロイシンが挿入されている。

bar 遺伝子は、*S. hygroscopicus* からクローニングした遺伝子である。

挿入 DNA の構成要素は表 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

挿入 DNA 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 *dmo* 遺伝子

改変 *dmo* 遺伝子がコードする改変 MON88701 DMO タンパク質は、DMO の改変タンパク質である。ジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) は、除草剤ジカンバから 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA) とホルムアルデヒドを生成する脱メチル化反応を触媒する酵素であり、三量体を形成して機能する (参照 6)。

ワタ MON88701 に含まれる改変 MON88701 DMO タンパク質は、葉緑体輸送ペプチド (CTP2) 由来の 9 個のアミノ酸が N 末端に付加された 349 個のアミノ酸からなるタンパク質である (参照 7)。

改変 MON88701 DMO 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について確認するために、毒性タンパク質データベース (TOX_2011^a) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 8)。

・*bar* 遺伝子

bar 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、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 MON88701 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。

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、毒性タンパク質データベース (TOX_2011) を用いて FASTA 検索を

^a TOX_2011: GenBank (GenBank protein database, 181.0 版、2010 年 12 月 18 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) から検索して集めた 10,570 配列のサブセット。

行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 8）。

(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 PV-GHHT6997 には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、ワタ MON88701 には導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 *dmo* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Peanut chlorotic streak virus (PCISV) 由来のプロモーターである（参照 9）。

bar 遺伝子発現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 *e35S* プロモーターである（参照 10）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ピマワタ (*Gossypium barbadense*) の初期繊維形成に関わる繊維タンパク質をコードする *E6* 遺伝子の 3'非翻訳領域である（参照 11）。

bar 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (*nos*) 遺伝子の 3'非翻訳領域である（参照 12、13）。

(3) その他

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットには、遺伝子発現の制御に関与する Tobacco etch virus (TEV) の 5'非翻訳領域由来の配列が挿入されている（参照 14）。また、改変 MON88701 DMO タンパク質を葉緑体へ移動させるために、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *ShkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチド領域である *CTP2* 標的配列が挿入されている（参照 15）。

bar 遺伝子発現カセットには、遺伝子発現の制御に関与するペチュニア (*Petunia hybrida*) の *Hsp70* 遺伝子の 5'非翻訳領域 *Hsp70* リーダー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

ベクターAの改変 *dmo* 遺伝子を含む領域をベクターBに挿入してベクターCを構築した。ベクターD、E及びFからそれぞれ作製された *e35S* 配列、*Hsp70* 配列及び *bar* 遺伝子を含む DNA 断片をベクターCに挿入することによって、導入用プラスミド PV-GHHT6997 を得た。

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 PV-GHHT6997 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導入用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 PV-GHHT6997 の T-DNA 領域には、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導入用ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド PV-GHHT6997 の意図する挿入領域は、右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの T-DNA 領域である。

(4) 導入しようとする導入用ベクターは、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 PV-GHHT6997 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表1 ワタ MON88701 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>PCISV</i> プロモーター	プロモーター領域 Peanut chlorotic streak virus 由来のプロモーター配列
<i>L-TEV</i>	Tobacco etch virus の 5' 非翻訳領域由来の配列
<i>TS-CTP2</i>	シロイヌナズナ由来の <i>EPSPS</i> タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>dmo</i>	<i>S. maltophilia</i> 由来の改変 <i>DMO</i> をコードする遺伝子
<i>E6</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>G. barbadense</i> の線維タンパク質をコードする <i>E6</i> 遺伝子の 3' 非翻訳領域
(bar 遺伝子発現カセット)	
<i>e35S</i> プロモーター	プロモーター領域 カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA プロモーター配列

L- <i>Hsp70</i>	ペチュニア (<i>P. hybrida</i>) 由来の <i>Hsp70</i> 遺伝子の 5' 非翻訳領域リーダー配列
<i>bar</i>	<i>S. hygroscopicus</i> 由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子
<i>nos</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセットをアグロバクテリウム法によって宿主に導入した後、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、再分化個体の自殖により得た個体に対して、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を評価し、ワタ MON88701 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 MON88701 のゲノム中に、改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセットが1コピー挿入されていることがサザンブロット分析で確認された(参照17)。

また、導入用プラスミド PV-GHHT6997 の外骨格領域がワタ MON88701 のゲノム中に検出されないことがサザンブロット分析で確認された(参照17)。

ワタ MON88701 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-GHHT6997 の T-DNA 領域と比較した結果、塩基配列は一致することが確認された(参照17)。

ワタ MON88701 の挿入 DNA 近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、DNA の挿入に伴うワタゲノムの 123 bp の欠失を除き、塩基配列は一致していた。このことから、挿入 DNA の近傍配列はワタゲノム由来であることが確認された(参照17)。

DNA 挿入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、5'末端近傍配列(1,126 bp)、欠失した 123 bp 及び3'末端近傍配列(1,138 bp) について、公的に利用できるデータベース (GenBank)^bを用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、相同性のある配列は見いだされなかった。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

^b EST_2012, NT_2012, NR_2012: EST データベース (71,454,007 配列)、塩基配列データベース (15,512,049 配列) 及びタンパク質データベース (16,826,875 配列)。

ないと考えられた（参照 18）。

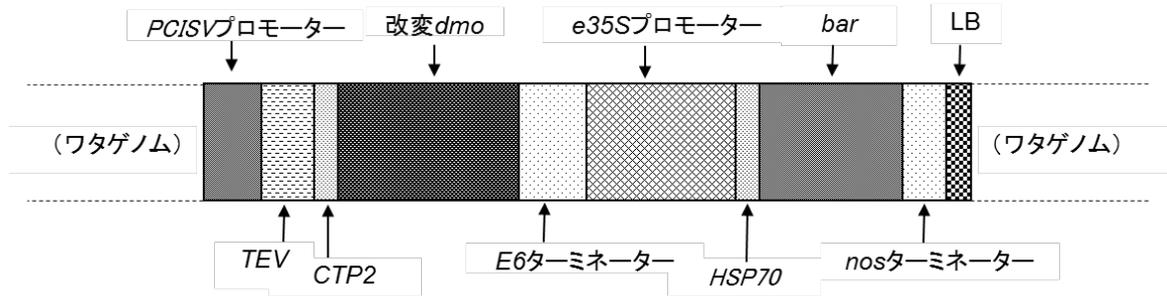


図1 ワタ MON88701 に挿入された DNA (模式図)

(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

ワタ MON88701 の挿入 DNA 領域 (4,105 bp)、5'末端近傍配列 (1,126 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,138 bp) 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、連続する 8 アミノ酸以上の ORF が 9 個見いだされた。9 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース (AD_2011^c)、毒性タンパク質データベース (TOX_2011) 及びタンパク質データベース (PRT_2010^d) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2011 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ものは見いだされなかった (参照 19、20)。

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 MON88701 の葉、根、花粉及び種子の改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。その結果は表 3 のとおりである (参照 21)。

^c AD_2011: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、1,491 配列のサブセット。

^d PRT_2011: GenBank (GenBank protein database, 181.0 版、2011 年 2 月 18 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるデータベースで、20,807,555 配列のサブセット。

表3 ワタ MON88701 における改変 MON88701 DMO 及び PAT タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重量)

分析組織*	改変 MON88701 DMO タンパク質	PAT タンパク質
葉	27~57	0.78~1.1
根	14	0.56
花粉	14	0.56
種子	20	6.1

* 葉は2葉期~開花期、根及び花粉は開花期、種子は成熟期の値を示した。

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

ワタから生産される主要食品は綿実油であり、精製された綿実油からはタンパク質が検出されない（参照 22）。また、リンターが食用に利用されるが、99%以上がセルロースである（参照 23、24）。したがって、ワタ MON88701 由来の食品を摂取した際の改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質の摂取量は、仮に残存していたとしてもごく僅かであり、一日蛋白摂取量の有意な量を占めるとは考えにくい。

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 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* 及び *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* 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 MON88701 DMO タンパク質及び PAT 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 MON88701 DMO タンパク質

Escherichia coli で発現させた改変 MON88701 DMO タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するため、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 分析では、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された。また、ウェスタンブロット分析でも同様に、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 25）。

・PAT タンパク質

E. coli で発現させた PAT タンパク質の人工胃液中における消化性について

確認するため、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 分析では、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された。また、ウェスタンブロット分析でも同様に、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 26）。

② 人工腸液に対する感受性

・改変 MON88701 DMO タンパク質

E. coli で発現させた改変 MON88701 DMO タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するため、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、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 25）。

・PAT タンパク質

E. coli で発現させた PAT タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するため、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、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 26）。

③ 加熱処理に対する感受性

・改変 MON88701 DMO タンパク質

E. coli で発現させた改変 MON88701 DMO タンパク質の加熱処理に対する感受性を確認するため、ELISA 分析を行った。その結果、改変 MON88701 DMO タンパク質は、95℃以上、15 分及び 30 分間の加熱処理で免疫反応性が失われることが確認された（参照 27）。

・PAT タンパク質

E. coli で発現させた PAT タンパク質の加熱処理に対する感受性を確認するため、ELISA 分析を行った。その結果、PAT タンパク質は、75℃以上、15 分及び 30 分間の加熱処理で免疫反応性が失われることが確認された（参照 28）。

(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 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質と既知のアレルゲン等との構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース (AD_2011) を用いて相同性検索を行った。その結果、80 以上の連続するアミノ酸配列について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等は見いだされなかった。また、抗原決定基の有無を確認するため、AD_2011 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ものは見いだされなかった（参照 8、29）。

上記、(1)～(4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT 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 MON88701 に挿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、5 世代のワタ MON88701 についてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが確認され、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 30）。

さらに、改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質の発現の安定性を確認するために、5 世代のワタ MON88701 の葉から抽出した試料を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの世代においても改変 MON88701 DMO タンパク質及び PAT タンパク質が発現していることが確認された（参照 30）。

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 MON88701 DMO タンパク質

DMO タンパク質の構造学的解析により、ジカンバのベンゼン環を含む化学基が DMO タンパク質の触媒作用に重要であることが示された（参照 31、32）。

そこで、DMO タンパク質が植物の代謝経路に与える影響について、植物体中に存在する化合物のうち、ジカンバと構造が類似するメトキシ基及びフェニルカルボキシル基をもつ 5 種類の化合物が DMO タンパク質により代謝されるか否かについて検討した。その結果、いずれの化合物も代謝されず、DMO タンパク質は植物の代謝経路に影響を及ぼさないことが確認された（参照 33）。この *in vitro* 試験に用いられた野生型 DMO タンパク質の N 末端にヒスチジンタグが付加された DMO タンパク質と改変 MON88701 DMO タンパク質の基質特異性が同じであることが確認されている（参照 34）。

・PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-グルホシネートをアセチル化することによって、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。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたワタ MON88701 宿主である非組換えワタについて、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル、ビタミン類及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 35）。

(1) 主要構成成分

種子の主要構成成分（水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維）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に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(2) アミノ酸組成

種子のアミノ酸 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に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間又は文献値の範囲内であった。

(3) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 22 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に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(4) ミネラル

種子のカルシウム、銅等の主要なミネラル 9 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(5) ビタミン類

種子のビタミン E (α -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に統計学的有意差が認められたが、一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(6) 有害生理活性物質

種子のシクロプロペノイド脂肪酸 (ジヒドロステルクリン酸、マルバリン酸及びステルクリン酸) 及びゴシポール (遊離ゴシポール及び総ゴシポール) 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に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ワタ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、2012 年 7 月に米国農務省 (USDA) に対して無規制栽培の承認申請が行われた。また、米国食品医薬品庁 (FDA) に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2013 年 4 月に審査が終了した。

カナダにおいては、カナダ保健省 (Health Canada) 及びカナダ食品検査庁 (CFIA) に対して食品及び環境・飼料としての安全性審査の申請が行われ、ともに 2014 年 6 月に承認を得た。

EU においては、2013 年 4 月に欧州食品安全機関 (EFSA) に対して食品、飼料及び輸入のための申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージ

ーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2014年1月に審査が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ MON88701 の栽培方法については、生育期の雑草防除にジカンバ及びグルホシネートを使用できる点を除いて、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 MON88701 の種子の製法及び管理方法については、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までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 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 ILSI. 2011. Crop Composition Database, Version 4.2. International Life Sciences Institute, Washington, D.C.
- 2 Berardi, L.C. and L.A. Goldblatt. 1980. Gossypol. Pages 184-237 in Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Second Edition. I.E. Liener (ed.). Academic Press, Inc., New York, New York.
- 3 Cao, J., J.-P. Blond and J. Bézard. 1993. Inhibition of fatty acid Δ^6 - and Δ^5 -desaturation by cyclopropene fatty acids in rat liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1210: 27-34.
- 4 OECD. 2009. Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2004)16. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 5 Salvaggio, J.E., C.E. O'Neil and B.T. Butcher. 1986. Immunologic responses to inhaled cotton dust. *Environmental Health Perspectives* 66: 17-23.

- 6 Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
- 7 Characterization of Dicamba Mono-oxygenase (DMO) Protein Purified from the Cottonseed of MON 88701 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli*-Produced DMO Proteins. (MSL0023517)(社内報告書)
- 8 Bioinformatics Evaluation of the DMO Protein in MON 88701 Utilizing the AD_2011, TOX_2011 and PRT_2011 Databases (MSL0023516) (社内報告書)
- 9 Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
- 10 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 11 John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular Biology* 30: 297-306.
- 12 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- 13 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- 14 Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73: 9080-9088.
- 15 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- 16 Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.
- 17 Molecular Characterization of Dicamba Glufosinate-Tolerant Cotton MON 88701 (MSL0023280) (社内報告書)
- 18 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in

- MON 88701: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0024148) (社内報告書)
- 19 Amended Report for MSL0023585: Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 88701: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0024371) (社内報告書)
 - 20 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 88701 Utilizing the AD_2011, TOX_2011 and PRT_2011 Databases (MSL0023565) (社内報告書)
 - 21 Amended Report for MSL0024006: Assessment of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Protein Levels in Tissues from Dicamba Glufosinate Tolerant Cotton (MON 88701) Produced in U.S. Field Trials during 2010 (MSL0024523) (社内報告書)
 - 22 Reeves, J.B. and J.L. Weihrauch. 1979. Composition of foods: Fats and oils. Agriculture Handbook 8-4. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
 - 23 NCPA. 2002. Cottonseed and its products. National Cottonseed Products Association, Cordova, Tennessee.
 - 24 Nida, D.L., S. Patzer, P. Harvey, R. Stipanovic, R. Wood and R.L. Fuchs. 1996. Glyphosate-tolerant cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 1967-1974.
 - 25 Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia coli* (*E.coli*)-produced MON 88701 Dicamba Mono-oxygenase (DMO) Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0023579) (社内報告書)
 - 26 Assessment of the *in vitro* Digestibility of Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*) Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0023567) (社内報告書)
 - 27 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced MON 88701 DMO Protein (MSL0023605) (社内報告書)
 - 28 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*) Protein (MSL0023583) (社内報告書)
 - 29 Bioinformatics Evaluation of the PAT (*bar*) Protein in MON 88701 Utilizing the AD_2011, TOX_2011 and PRT_2011 Databases (MSL0023528) (社内報告書)
 - 30 Stability of the DNA Insert and Expression of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Proteins in MON 88701 (MSL0023322) (社内報告書)
 - 31 D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiński and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. Journal of Molecular Biology 392: 481-497.
 - 32 Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes

- oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
- 33 Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates (RPN-10-365) (社内報告書)
 - 34 Amended Report: Specificity of *E. coli*-produced MON 88701 Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme Using *o*-Anisic Acid as a Substrate (RPN-2011-0079) (社内報告書)
 - 35 Amended Report for MSL0024393: Compositional Analyses of Cottonseed Collected from MON 88701 treated with Dicamba and Glufosinate Grown in the United States during 2010 (MSL0024606) (社内報告書)