



府食第161号
平成21年2月24日

食品安全委員会
委員長 見上 彪 殿

遺伝子組換え食品等専門調査会
座長 澤田 純一

遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価に関する審議結果について

平成19年8月20日付け厚生労働省発食安第0820002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「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズDP-356043-5」に係る食品健康影響評価について、当専門調査会において審議を行った結果は別添のとおりですので報告します。

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成
酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5

2009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>	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	7
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	8
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	8
6. 安全な摂取に関する事項	8
7. 近縁の植物種に関する事項	9
第4. ベクターに関する事項	9
1. 名称及び由来に関する事項	9
2. 性質に関する事項	9
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	9
1. 挿入DNAの供与体に関する事項	9
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	10
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	11
4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	12
6. DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項	13
第6. 組換え体に関する事項	13
1. 遺伝子導入に関する事項	13

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.....	15
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.....	15
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	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	17
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	17
7. 宿主との差異に関する事項	18
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	20
9. 栽培方法に関する事項	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	20
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.....	21
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	21
＜参照＞	22

<審議の経緯>

2007年8月20日	厚生労働大臣より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（厚生労働省食安発第0820002号）、関係書類の接受
2007年8月23日	第203回食品安全委員会（要請事項説明）
2007年10月9日	第54回遺伝子組換え食品等専門調査会
2008年4月18日	第61回遺伝子組換え食品等専門調査会
2008年12月3日	第65回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年1月8日	第268回食品安全委員会（報告）
2009年1月8日より2月6日	国民からの御意見・情報の募集
2009年2月24日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告

<食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

<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>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	丹生谷博
石見佳子	飯 哲夫
宇理須厚雄	山川 隆
小関良宏	山崎 壮
橘田和美	和久井信
澁谷直人	渡邊雄一郎
手島玲子	

要 約

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5」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。

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5」は、*Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来する改変 *gat4601* 遺伝子及びダイズ (*Glycine max* L.) に由来する改変 *gm-hra* 遺伝子を導入して作製されており、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤による影響を受けずに生育できるとされている。

特に、導入した遺伝子により、種子中に *N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量が、非組換えダイズと比較して有意に増加しているが、これらの物質は非組換えダイズを含め日常的に摂取している食品にも含有されていること、日本人 1 人が 1 日当たりに摂取するダイズを全て本組換えダイズに置き換えて試算したところ、これらの物質の摂取量の増加はわずかであること、ラットを用いた 90 日間反復混餌投与試験の結果、投与に関連する有害な影響は認められていないことから、これらの物質の有意な増加に関し、ヒトの健康を損なうおそれは現在のところ極めて低いと考えられた。

これらのことから、「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、「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5」はヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

I. 評価対象食品の概要

- 名称 : 除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5
- 性質 : 除草剤グリホサート耐性、アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性
- 申請者 : デュポン株式会社
- 開発者 : Pioneer Hi-Bred International, Inc. (米国)

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5」(以下、「ダイズ DP-356043-5」という。)は、*Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来する *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列を基に作製した改変 *gat4601* 遺伝子及びダイズ (*Glycine max* L.) のアセト乳酸合成酵素遺伝子由来の改変 *gm-hra* 遺伝子を導入して作製されており、改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質を発現させることで、ダイズ DP-356043-5 は除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤を散布しても、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、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*G. max* L. Merr.) の商業品種 Jack である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

ダイズ DP-356043-5 に挿入された改変 *gat4601* 遺伝子は、*B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株に由来する *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列を基に作製されたものである。

また、改変 *gm-hra* 遺伝子は、ダイズに由来するアセト乳酸合成酵素遺伝子 (*gm-als*) を改変したものである。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

ダイズ DP-356043-5 に挿入された改変 *gat4601* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与するタンパク質を、改変 *gm-hra* 遺伝子は、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に耐性を付与するタンパク質を発現する。これら 2 種類の挿入 DNA を含む直鎖状 DNA 断片をパーティクルガン法により宿主に導入した。

2. 宿主の食経験に関する事項

ダイズの出産地は中国で、紀元前 11 世紀頃の周時代にはすでにダイズが栽培

されていたとされている（参照 1, 2）。ダイズが我が国へ伝来した時期は約 2,000 年前と推定され、コメとともに日本の食生活に欠くことができない食糧として、古くから食品として利用されている（参照 3）。

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

ダイズの種子中の主要栄養組成はタンパク質 33.2～47.4%（乾燥重量）（以下、(DW)と記載）、脂質 8.10～23.6%(DW)、灰分 3.89～6.54%(DW)、炭水化物 29.6～50.2%(DW)、粗繊維分 4.12～10.9%(DW)と報告されている（参照 4, 5, 6）。

(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

宿主であるダイズの種子には、毒性物質・栄養阻害物質として、トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が含まれている（参照 5）。

ダイズ種子中のトリプシンインヒビター含有量は 20～119 TIU^a/mgタンパク質、レクチン含有量は 0.1～9.0 HU^b/mgタンパク質、イソフラボン類のダイジン含有量は 0.7～83.6mg/kg(DW)、ゲニスチン含有量は 12～143mg/kg(DW)、グリシチン含有量は 0.6～33.5mg/kg (DW)である。また、ラフィノース含有量は 0.21～0.66mg/kg (DW)、スタキオース含有量は 1.21～3.50mg/kg(DW)、フィチン酸含有量は 0.63～1.96mg/kg(DW)である（参照 4, 5, 6, 7）。

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

ダイズ DP-356043-5 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のダイズと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ダイズ DP-356043-5 の可食部位は、従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量

ダイズ DP-356043-5 の摂取量は、従来のダイズと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ダイズ DP-356043-5 の調理及び加工方法は、従来のダイズと変わらない。

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

^a TIU : trypsin inhibitor unit

^b HU : hemagglutinating unit

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

ダイズ DP-356043-5 は、改変 *gat4601* 遺伝子及び改変 *gm-hra* 遺伝子発現カセットの導入により、改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質が発現すること、また種子中に *N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量が有意に増加していることが、宿主との相違点である。

以上、1～6により、ダイズ DP-356043-5 の安全性評価においては、既存のダイズ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

ダイズ DP-356043-5 は、ゲノムに組み込まれた改変 *gat4601* 遺伝子及び改変 *gm-hra* 遺伝子が、改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質を発現することにより、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤の影響を受けずに成長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、マメ科 *Glycine* 属のダイズ (*G. max* L. Merr.) の商業品種 Jack 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

ダイズの出産地は、中国であり、祖先は野生種のツルマメ (*Glycine. soja* Sieb. and Zucc.) と考えられている。紀元前 11 世紀頃の周時代にはすでにダイズの出産が行われ、食用に供されていたと考えられている（参照 1, 2）。ダイズは、約 2,000 年前に日本に渡来したと推定され、今日では栽培地域や用途に適した品種が開発され、全国的に栽培されている（参照 3, 8）。

一方、米国には 1765 年に伝えられて栽培が普及し（参照 2）、現在、世界最大のダイズ生産国となっている（参照 9）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズ種子には、毒性物質・栄養阻害物質として、トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が含まれている（参照 5）。

このうちトリプシンインヒビターはタンパク質分解酵素阻害物質であり、消化酵素のトリプシンを不活化し、結果としてタンパク質の消化を妨げる（参照 5）。また、レクチンは炭水化物含有化合物に結合するタンパク質で、血液凝集を引き

起こすが、加熱処理により速やかに失活することが知られている。

イソフラボン類は、主にダイズの胚芽に多く含まれるフラボノイドの 1 種で、ほとんどの場合、食品中ではダイジン、ゲニスチン、グリシチンなどの配糖体として存在している。イソフラボン含有量は、品種、栽培地域等の要因によって、他の成分以上に大きく変動することが知られている。また、ダイズの食品加工工程によってもイソフラボン含有量は大きく変動するが、加熱ダイズのイソフラボン含有量は生のダイズとほぼ同じである。イソフラボン類は植物エストロゲンであり、哺乳動物に対して、エストロゲン、抗エストロゲン及びコレステロール低下などの生化学活性を示す（参照 5）。

ラフィノース及びスタキオースは低分子量の炭水化合物で、摂取によってガス化し、腹部を膨満させる原因物質である（参照 5）。

フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄及び亜鉛等とキレート化合物を形成し、反芻動物以外の動物において、ミネラル吸収を阻害することが知られている（参照 5）。

ダイズ種子中のトリプシンインヒビター含有量は 20～119 TIU/mgタンパク質、レクチン含有量は 0.1～9.0 HU/mgタンパク質、イソフラボン類のダイジン含有量は 0.7～83.6mg/kg(DW)、ゲニスチン含有量は 12～143mg/kg(DW)、グリシチン含有量は 0.6～33.5mg/kg(DW)である。また、ラフィノース含有量は 0.21～0.66mg/kg (DW)、スタキオース含有量は 1.21～3.50mg/kg(DW)、フィチン酸含有量は 0.63～1.96mg/kg(DW)である（参照 4, 5, 6, 7）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要食物の一つである（参照 10）。代表的なアレルゲンとして、種子貯蔵タンパク質である β -コングリシンの α -サブユニット、ダイズ液胞タンパク質及びビシリン様糖タンパク質等が知られている（参照 11）。

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

ダイズには、ウイルス病、細菌及び糸状菌の各種病害が知られているが（参照 2, 12）、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

ダイズは紀元前 11 世紀頃から栽培が行われ、食用されてきたと考えられており、その利用の歴史は古い（参照 12）。現在、ダイズは様々な食品に加工されており、約 75%は搾油用、25%は豆腐、味噌、納豆、醤油、豆乳等として利用されている（参照 13）。

2006 年における世界総生産量は約 2 億 1,000 万トンであり、米国は総生産量の約 40%を占めている。我が国の 2006 年の生産量は約 22.9 万トンであり、輸入量は約 404 万トンである。そのうち約 80%が米国からの輸入である（参照 9, 14, 15）。

7. 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種には、ダイズの祖先と考えられている野生のツルマメ (*G. soja* Sieb. and Zucc.) が存在する (参照 1, 2)。しかし、ツルマメは食用に供されることはない。

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

ダイズ DP-356043-5 の作出に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A は、プラスミド pSP72 を基に構築された。

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 pSP72 の全塩基数は 2,462bp であり、そ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

プラスミド pSP72 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

プラスミド pSP72 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

プラスミド pSP72 には、アンピシリン耐性マーカー *amp* 遺伝子 (参照 16) が含まれているが、宿主に挿入した直鎖状 DNA 断片 PHP20163A には含まれていない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pSP72 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

ダイズ DP-356043-5 に挿入された改変 *gat4601* 遺伝子は、*B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株に由来する *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列を基に作製されたものである。

また、改変 *gm-hra* 遺伝子は、ダイズに由来するアセト乳酸合成酵素遺伝子 (*gm-als*) を改変したものである。

(2) 安全性に関する事項

改変 *gat4601* 遺伝子の供与体である *B. licheniformis* は、 α -アミラーゼ等、食品製造酵素の生産に利用されている（参照 17, 18）。また、改変 *gm-hra* 遺伝子の供与体であるダイズは、古くから食用に供されている。

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 *gat4601* 遺伝子

除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル活性を持つ *B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株を選抜し、各々のゲノム DNA から *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子をクローニングした。

次に、クローニングした 3 つの *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を制限酵素で処理し PCR 法によりランダムに再構築することにより、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化活性が高まるように作製した（参照 19）。

・改変 *gm-hra* 遺伝子

ダイズ (*G. max*) に由来するアセト乳酸合成酵素遺伝子 (*gm-als*) について、これまでに商業化されているアセト乳酸合成酵素阻害剤に耐性をもつ植物のアセト乳酸合成酵素のアミノ酸配列を参考に、2 箇所のアミノ酸を置換させるよう改変を加えることにより作製した。この改変により、アセト乳酸合成酵素阻害剤（チフェンスルフロン、ニコスルフロン、リムスルフロン等）に対する耐性が付与された。

挿入 DNA の構成要素は表のとおりである。

(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

ダイズ DP-356043-5 に導入された挿入 DNA の塩基数及び塩基配列は明らかであり、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 *gat4601* 遺伝子

改変 *gat4601* 遺伝子は、改変 GAT4601 タンパク質を発現し、この改変 GAT4601 タンパク質によって、除草剤グリホサートを *N*-アセチルグリホサートに変化させ、その機能（5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（EPSPS）活性を阻害）を失わせる。その結果、ダイズ DP-356043-5 は、除草剤グリホサートに対する耐性を有することとなる。

改変 GAT4601 タンパク質が既知の毒性タンパク質との間に構造相同性がないことを確認するために National Center for Biotechnology Information (NCBI) から入手可能なタンパク質アミノ酸配列データベースに対し、blastp (version 2.2.13) を用いてアミノ酸相同性検索を行った結果、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった。

・改変 *gm-hra* 遺伝子

改変 *gm-hra* 遺伝子は、改変 GM-HRA タンパク質を発現し、この改変 GM-HRA タンパク質によって、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤の存在下でも酵素活性を示し、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分岐アミノ酸が合成される。その結果、ダイズ DP-356043-5 は、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に対する耐性を有することとなる。

改変 GM-HRA タンパク質と既知の毒性タンパク質との間に構造相同性がないことを確認するために、改変 GAT4601 タンパク質と同様にアミノ酸相同性検索を行った結果、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

発現ベクターを構築する過程で作製したプラスミド PHP20163 には、ハイグロマイシン耐性マーカー (*hyg* 遺伝子) が含まれているが、宿主に導入した直鎖状 DNA 断片 PHP20163A には含まれていない。

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 *gat4601* 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 (CaMV) の 35S プロモーター領域の一部と Rsyn7-SynCore II プロモーターから構成された SCP1 プロモーターである (参照 20, 21, 22)。

改変 *gm-hra* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ダイズ由来の S-アデノシル-L-メチオニンシンテターゼ (SAMS) 遺伝子のプロモーターである (参照 23)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *gat4601* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、バレイショ由来のプロテアーゼインヒビター II 遺伝子のターミネーターである (参照 24)。

改変 *gm-hra* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ダイズ由来の *gm-als* 遺伝子のターミネーターである (参照 23)。

(3) その他

改変 *gat4601* 遺伝子発現カセットには、改変 *gat4601* 遺伝子の転写効率を増強するために、SCP1 プロモーターの下流に、タバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ 5'非翻訳領域が挿入されている (参照 25)。

改変 *gm-hra* 遺伝子発現カセットには、改変 *gm-hra* 遺伝子の転写効率を増強するために SAMS プロモーターの下流に、ダイズ由来の SAMS 遺伝子の 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域が挿入されている (参照 23)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

ダイズ DP-356043-5 の作出に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A は、プ

ラスミド pSP72 に改変 *gm-hra* 遺伝子カセット (SAMS プロモーター、SAMS イントロン、改変 *gm-hra* 遺伝子及び *gm-als* ターミネーター) を挿入し、次いで、改変 *gat4601* 遺伝子発現カセット (SCP1 プロモーター、TVM オメガ 5'非翻訳領域、改変 *gat4601* 遺伝子及び *pinII* ターミネーター) を挿入しプラスミド PHP20163 を構築し、制限酵素で処理することにより、改変 *gat4601* 遺伝子発現カセット及び改変 *gm-hra* 遺伝子発現カセットを含む直鎖状 DNA 断片 PHP20163A 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

サイズ DP-356043-5 の作出に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基数は 5,362bp であり、本断片の塩基配列、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

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A には、改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質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 (参照 26)。

(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

サイズ DP-356043-5 は直鎖状 DNA 断片 PHP20163A を用いてパーティクルガン法により作出されたものである。

(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

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A は、プラスミド PHP20163 を制限酵素で処理した後、アガロースゲル電気泳動によって単離し、純化されている。

表 DP-356043-5 への挿入 DNA

改変 <i>gat4601</i> 遺伝子カセット	
SCP1 promoter	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 (CaMV) の 35S プロモーターの一部と Rsyn7-SynCore II プロモーター
TMV omega 5'UTR	エンハンサー領域 (翻訳を促進する配列) タバコモザイクウイルス (TMV) のオメガ 5'非翻訳領域

改変 <i>gat4601</i>	<i>B. licheniformis</i> 株由来の改変 GAT4601 タンパク質をコードする遺伝子
<i>pin II</i> terminator	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) バレイショ由来のプロテアーゼインヒビター II 遺伝子のターミネーター
改変 <i>gm-hra</i> 遺伝子カセット	
SAMS promoter	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) ダイズ由来の S-アデノシル-L-メチオニンシンターゼ (SAMS) 遺伝子のプロモーター
SAMS intron	エンハンサー領域 (翻訳を促進する配列) ダイズ由来の SAMS 遺伝子の 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域
改変 <i>gm-hra</i>	ダイズ由来の改変 GM-HRA タンパク質をコードする遺伝子
<i>gm-als</i> terminator	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) ダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子のターミネーター

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A をパーティクルガン法を用いて、宿主に導入した。導入後、アセト乳酸合成酵素阻害剤クロロスロフロンを含む培地で形質転換したカルスを選抜して再生個体を得た。

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

ダイズ DP-356043-5 のゲノム中に挿入された改変 *gat4601* 遺伝子及び改変 *gm-hra* 遺伝子カセットを含む直鎖状 DNA 断片 PHP20163A のコピー数及び完全性を確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、1 コピーの直鎖状 DNA 断片 PHP20163A が完全な形で導入されていることが確認された。

なお、念のため、ダイズ DP-356043-5 のゲノムに直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の作製に用いたプラスミド PHP20163 の外骨格領域が挿入されていないことを確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、プラスミド PHP20163 の外骨格領域は挿入されていないことが確認された (参照 27)。

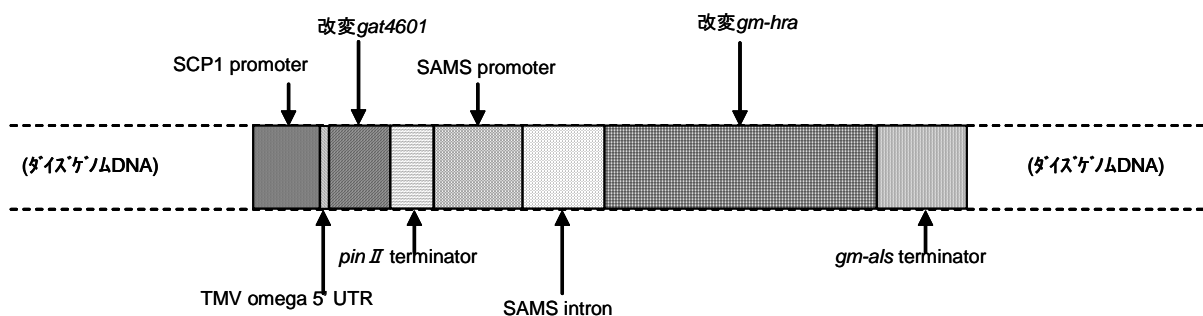
ダイズ DP-356043-5 における挿入遺伝子の塩基配列を決定し、直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基配列と比較した結果、両者の塩基配列は完全に一致することが確認された。

また、挿入遺伝子の近傍配列がダイズゲノム由来であることを確認するため、5'末端近傍配列、挿入遺伝子及び3'末端近傍配列にプライマーを設計しPCR分析を行なった。その結果、近傍配列内のプライマー対を用いたPCRでは、ダイズDP-356043-5及び非組換えダイズの両方で同じ大きさのPCR産物が増幅された。一方、近傍配列及び挿入遺伝子領域のプライマー対を用いたPCRでは、ダイズDP-356043-5のみに特異的なPCR産物が増幅された。(参照26)。更に、ダイズDP-356043-5の5'末端近傍配列(300bp)及び3'末端近傍配列(300bp)について、一般に公開されているダイズゲノムデータベース^cに対しblastnによる検索を行った結果、既知のダイズゲノムと高い相同性が認められた(参照28)。これらのことから、ダイズDP-356043-5の近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられた。

直鎖状DNA断片PHP20163Aの挿入によって、近傍の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(300bp)及び3'末端近傍配列(各300bp)について、ダイズゲノム及びEST配列を含むデータベース^dを用いてblastn検索を行った結果、5'末端近傍配列にEST配列と相同性のある2個のEST配列が検索された。相同性が認められた2個のEST配列の全長に、連続する20アミノ酸以上のORFが存在するかを確認した結果、それぞれ2個及び6個のORFが確認され、これらのORFについて、NCBIタンパク質データセットを用いてblastp検索を行った結果、ダイズ由来の既知のタンパク質と相同性のあるアミノ酸配列は見いだされなかった(参照28)。

更に、5'末端及び3'末端近傍配列について、既知のタンパク質と相同性を持つ配列が存在するかを確認するために、DOE-JGIタンパク質候補データセット及びNCBIタンパク質データセットを用いてblastx検索を行った結果、既知のタンパク質と相同性のあるアミノ酸配列は見いだされなかった(参照28)。

・組換えダイズ「ダイズ DP-356043-5」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

^c Draft Soybean Genome Assembly (Department of Energy Joint Genome Institute: DOE-JGI)

^d ①ダイズゲノムのデータベース (DOE-JGI) 及び DOE-JGI より作成された mRNA 候補とコーディング領域候補から構築したデータセット、②公開されているダイズゲノム及び EST 配列から構築したデータセット、③パイオニア・ハイブレッド・インターナショナル社が保有するダイズゲノム及び EST 配列から構築したデータセット

する事項

5'末端近傍配列（300bp）及び 3'末端近傍配列（300bp）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、遺伝子解析ソフト Vector NTI 10.3 Sequence analysis softwareを用いて、6つの読み枠において連続する 20 アミノ酸以上のORFを分析した結果、ORFは生じていないことが確認された（参照 26）。

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

米国及びカナダの計6カ所の圃場から採取したダイズDP-356043-5の茎葉、根及び種子における改変GAT4601 タンパク質及び改変GM-HRAタンパク質の発現量を、ELISA法を用いて測定した。その結果、改変GAT4601 タンパク質の平均発現量は、茎葉（着莢期）で 1.6ng/mg (DW)、根（着莢期）で 1.6ng/mg (DW)、種子（収穫期）で 0.24ng/mg (DW)であった。また、改変GM-HRAタンパク質の平均発現量は、茎葉（着莢期）で 27ng/mg (DW)、根（着莢期）で 3.2ng/mg (DW)、種子（収穫期）で 0.91ng/mg (DW)であった（参照 29）。

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

日本人1人が1日あたりに摂取するダイズ及びダイズ加工品の量 59.8g（参照 30）を全てダイズDP-356043-5 に置き換えて計算すると、改変GAT4601 タンパク質及び改変GM-HRAタンパク質の1人1日当たりの予想平均摂取量は最大で 14.4 μ g及び 54.4 μ gとなり、1人1日当たりのタンパク質平均摂取量 70.8g（参照 30）に占める割合を計算したところ、 $2.0 \times 10^{-5}\%$ 及び $7.7 \times 10^{-5}\%$ 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

改変*gat4601* 遺伝子の供与体である *B.licheniformis* は、ヒトに対するアレルギー誘発性の報告はない。また、改変*gm-hra* 遺伝子の供与体であるダイズ (*G.max*) は、ヒトに対するアレルギー誘発性について一般によく知られており、研究も多く行われている（参照 10, 11）。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 GAT4601 タンパク質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼに分類される酵素タンパク質であるが、これまでに *N*-アセチルトランスフェラーゼがアレルギー誘発性を持つという知見は報告されていない。

改変 GM-HRA タンパク質は、ダイズのアセト乳酸合成酵素タンパク質の改変型であるが、これまでにアセト乳酸合成酵素がアレルギー誘発性を持つという知見は報告されていない。

(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

① 人工胃液に対する感受性

Escherichia coli で発現させた改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質を、米国薬局方 (US Pharmacopeia, 2000) に記載されている方法に従って調製した人工胃液中で処理し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 及びウェスタンブロッティング法による分析を行った。

その結果、両タンパク質ともSDS-PAGE分析及びウェスタンブロッティング法において試験開始後 30 秒以内に消化された (参照 31, 32)。

② 人工腸液に対する感受性

E.coli で発現させた改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質を、米国薬局方に記載されている方法に従って調製した人工腸液中で処理し、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティング法による分析を行った。

その結果、改変GAT4601 タンパク質は、SDS-PAGE分析において試験開始後 2 分以内に、ウェスタンブロッティング法において試験開始後 5 分以内に消化された。改変GM-HRAタンパク質は、SDS-PAGE分析において試験開始後 30 秒以内に、ウェスタンブロッティング法において試験開始後 2 分以内に消化された (参照 33, 34)。

③ 加熱処理に対する感受性

*E. coli*で発現させた改変GAT4601 タンパク質及び改変GM-HRAタンパク質について、加熱による酵素活性の変化を測定したところ、改変GAT4601 タンパク質は 56°C、15 分間の加熱処理で、改変GM-HRAタンパク質は 50°C、15 分間の加熱処理で失活することが確認された (参照 35,36)。

また、70°C、15 分間の加熱処理後のウェスタンブロッティング法においても熱処理に対して不安定であることが確認されている (参照 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

改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA タンパク質について、アレルゲン等との構造相同性を確認するために、アレルゲンデータベース (FARRP6) を用いて相同性検索を行った。その結果、80 残基以上のアミノ酸について 35% 以上の相同性を示すアミノ酸配列は見いだされなかった。

また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在の可能性を確認するために、FARRP6 を用いて、連続する 8 つのアミノ酸の相同性検索を行った結果、一致するものは見いだされなかった (参照 38, 39)。

上記、(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 GAT4601 タンパク質及び改変 GM-HRA 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

ダイズDP-356043-5 の挿入遺伝子について、後代における安定性を確認するために、3世代のゲノムDNAについて、サザンブロット法による分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが確認された（参照 27）。

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 GAT4601 タンパク質

改変 GAT4601 タンパク質は、一般的に末端アミノ酸、遊離アミノ酸、ヒストンのアミノ酸側鎖及び一部の抗生物質などをアセチル化することが知られている *N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である（参照 40）。

改変 GAT4601 タンパク質の3次元構造解析の結果から低分子化合物が基質となる可能性があり（参照 41）、可能性のある低分子化合物（農薬 20 種類、抗生物質 11 種類、アミノ酸 21 種類、グリホサート類似化合物 6 種類）に対する基質反応性実験を行ったところ、改変 GAT4601 タンパク質は除草剤グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられた。また、5 種類のアミノ酸について触媒活性が認められたが、最も高い触媒活性が認められたアスパラギン酸でもグリホサートの 3%程度であった。

ダイズ DP-356043-5 において、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸が非組換えダイズと比較して有意に増加しているが、この増加は改変 GAT4601 タンパク質が遊離のアスパラギン酸及びグルタミン酸に作用したものと考えられる。

また、ダイズDP-356043-5 の遊離アミノ酸及びアミノ酸含有量は、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値^e又は文献値の範囲内であった（参照 42）。除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤（クロリムロンエチル及びチフェンスルフロン）を登録使用基準の最大量及び最大回数を散布した場合であっても、遊離アミノ酸及びアミノ酸含有量は、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった（参照 43）。

以上のことから、ダイズ DP-356043-5 における改変 GAT4601 タンパク質の発現により、一部の遊離アミノ酸に活性を示し、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸の含有量が有意に増加したが、宿主の持つアミノ酸合成経路には大きな影響は及ぼさないと考えられた。

・改変 GM-HRA タンパク質

改変 GM-HRA タンパク質は、分枝アミノ酸合成において共通経路となるアセト乳酸合成を触媒する酵素であるアセト乳酸合成酵素にアミノ酸変異を導入することで、アセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤に耐性を示す特徴がある。一方、ダイズ内在性のアセト乳酸合成酵素は、このような除草剤によって阻害

^e 2005 年に北米の 6 カ所で栽培された 4 つの商業非組換えダイズ品種の分析結果に基づいて、分析値の 99%を含むように統計学的に設定された上限値と下限値の区間

される。一般的に、分枝アミノ酸合成経路のうち、バリン・ロイシン合成経路においては、バリンによってアセト乳酸合成酵素がフィードバック制御を受け、また、イソロイシン合成経路においては、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラターゼがイソロイシンによってフィードバック制御されていることが知られている（参照 40）。

また、ダイズ DP-356043-5 において、これらアミノ酸含量及び遊離アミノ酸含量は非組換えダイズと比較して有意に変化していないことから、仮に改変 GM-HRA タンパク質によりアセト乳酸合成酵素の触媒活性が高まっていたとしても、これらのフィードバック制御が働いていると推定できる。これらのことから、ダイズ DP-356043-5 における改変 GM-HRA タンパク質は、宿主の持つアミノ酸合成経路に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

ダイズ DP-356043-5 においてヘプタデカン酸とヘプタデセン酸の含有率が非組換えダイズと比較して有意に増加している。この増加は、改変 GM-HRA タンパクが有するアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤への耐性を付与するために導入されたアセト乳酸合成酵素のアミノ酸変異により、基質の1つである α -ケト酪酸に対する改変 GM-HRA タンパク質の基質親和性が低下し、ヘプタデカン酸等奇数鎖脂肪酸の合成の基となる α -ケト酪酸が蓄積し、それら奇数鎖脂肪酸への合成量が増加した可能性があるかと推察された。

両タンパク質の相互作用について検討した結果、これら酵素反応及び代謝系の特性、本組換えダイズの構成成分分析及び農業形質の非組換えダイズとの比較結果から、相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

なお、*N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量が有意に増加していることから、今後、ダイズ DP-356043-5 を用いた掛け合わせ品種の安全性評価の場合には、詳細な審査が必要と考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

2005年に米国（5箇所）及びカナダ（2箇所）の圃場で栽培されたダイズ DP-356043-5 と非組換えダイズについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類及び栄養阻害物質等の分析を行い、ダイズ DP-356043-5 と非組換えダイズとの間の統計学的有意差について検討した（参照 42）。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、粗繊維）の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

(2) 脂肪酸組成

脂肪酸（24種類）の分析を行ったところ、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸を除き、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であっ

た。

有意な増加が認められたヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸のヒトへの健康影響について考察を行った。

ダイズDP-356043-5を用いて製造したダイズ油に含まれるヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量の測定を行ったところ、牛肉、ソーセージ、調理済みラム肉、バター等の脂肪含有食品におけるヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の含有量（参照 44）と同程度かそれ以下であった。また、これら以外にも、まぐろ、かじき等の魚介類、牛乳、チーズ等にもヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸は含有されており（参照 45）、これらの食品を介して日常的に摂取されている。

また、日本人1人が1日当たりに摂取するダイズ及びダイズ加工品を全てダイズDP-356043-5に置き換えた場合のヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の摂取の増加量について、総脂質摂取量に対する割合を算出した結果、それぞれ0.018%、0.010%であった。

これらのことから、ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の有意な増加に関し、ヒトの健康を損なうおそれはないと考えられた。

(3) アミノ酸組成

遊離アミノ酸（27種類）及びアミノ酸（18種類）の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

改変GAT4601タンパク質が、アスパラギン酸及びグルタミン酸をアセチル化する活性を示すことが認められていることから、*N*-アセチルアスパラギン酸及び*N*-アセチルグルタミン酸の分析を行った。その結果、非組換えダイズと比較して統計学的に有意な増加が認められたことから、*N*-アセチルアスパラギン酸及び*N*-アセチルグルタミン酸の安全性について考察を行った。

ダイズDP-356043-5中のアミノ酸全体に占める遊離アミノ酸の割合は約0.5%であり、非組換えダイズと比較して大きな差は認められなかった。

また、*N*-アセチルアスパラギン酸及び*N*-アセチルグルタミン酸は、ダイズDP-356043-5中に新たに産生されたものではなく、これまでも、非組換えダイズを含め、いわし、鶏肉、卵、牛肉、米、ほうれん草、コーヒー、チョコレートなど身近な食品から摂取していることが知られている。

N-アセチルアスパラギン酸が蓄積する疾病として、アスパルトアシラーゼの遺伝的欠損又は活性低下によるカナバン病があるが、その病因としては*N*-アセチルアスパラギン酸の蓄積又は酵素反応物である酢酸レベルの低下という異なる説が報告されている。一方、*N*-アセチルアスパラギン酸はヒトの脳内にも存在しており、日本人1人が1日当たりに摂取するダイズを全てダイズDP-356043-5に置き換えた場合の*N*-アセチルアスパラギン酸の摂取の増加量について、脳内総*N*-アセチルアスパラギン酸量に対する割合を算出した結果、0.18~0.23%であった。また、ダイズ製品を含む調製乳を摂取する乳幼児の場合では、0.006~0.007%と算出され、その寄与は極めてわずかであると

推察された。

ダイズ DP-356043-5 を用いた SD ラット（1 群雌雄各 12 匹）における 90 日間反復混餌投与試験（ダイズ DP-356043-5 由来のダイズ粕 20%及びダイズ外皮 1.5%を配合した飼料）の結果、投与に関連する有害な影響は認められていない（参照 46 及び第 7）。

これらのことから、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸の有意な増加に関し、ヒトの健康を損なうおそれは現在のところ極めて低いと考えられた。

(4) ミネラル類

カルシウム、銅などの主要なミネラル 9 種類の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値あるいは文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン類

ビタミン B1、葉酸などの主要なビタミン類 8 種類の分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は文献値の範囲内であった。

(6) 栄養阻害物質等

栄養阻害物質及び二次代謝産物として、イソフラボン類（13 種類）、オリゴ糖類（3 種類）、レクチン、フィチン酸及びトリプシンインヒビターの分析を行ったところ、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値又は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

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に 2006 年 11 月に安全性審査のための申請を行い、2007 年 9 月に確認が修了した。また、農務省（USDA）に 2006 年 9 月に無規制裁培許可の申請を行い、2008 年 7 月に承認を得た。

カナダにおいては、カナダ保健省（HC）及びカナダ食品検査庁（CFIA）に 2006 年 12 月に安全性審査の申請を行っている。

EU においては、欧州食品安全機関（EFSA）に 2006 年 12 月に安全性審査の申請を行っている。

メキシコにおいては、メキシコ保健省（DOH）に 2007 年 2 月に安全性審査の申請を行っている。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ DP-356043-5 の栽培方法については、従来のダイズと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ダイズ DP-356043-5 の種子の製法及び管理方法については、従来のダイズと同じである。

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6の7に係る安全性の確認のため、ダイズ DP-356043-5 の亜急性毒性試験データの確認を行った。

- ・ダイズ DP-356043-5 の亜急性毒性試験（参照 46）

SD ラット（1 群雌雄各 12 匹）を用いて 13 週間反復混餌投与試験を行った。供試試料はダイズ DP-356043-5 由来のダイズ粕 20%及びダイズ外皮 1.5%を配合した飼料を用い、対照は非組換えダイズを用いた。その結果、体重、臨床検査、眼科学的評価、神経行動学的評価、剖検、病理検査等において被験物質の投与に関連した異常は認められなかった。

なお、申請者から *N*-アセチルアスパラギン酸に関する急性毒性及び亜急性毒性試験のデータが提出されたことから、このデータを念のため確認した。

1. *N*-アセチルアスパラギン酸の急性毒性試験（参照 47）

SD ラット（1 群雌雄各 5 匹）に *N*-アセチルアスパラギン酸（純度 99.5%）を 2,000mg/kg 体重の用量で単回強制経口投与し、投与後 14 日間、臨床症状の有無及び体重への影響について観察、測定し、14 日後に病理検査を実施した。その結果、全例とも試験終了まで生存し、臨床検査、剖検において被験物質の投与に関連した異常は認められなかった。

2. *N*-アセチルアスパラギン酸の亜急性毒性試験（参照 47）

SD ラット（1 群雌雄各 5 匹）を用いて 28 日間反復混餌投与試験を行った。*N*-アセチルアスパラギン酸（純度 99.5%）を、投与 14 日目までは 10, 100, 1,000mg/kg 体重/日の用量で投与し、15 日目以降は 100, 500, 1,000mg/kg 体重/日の用量で投与した。その結果、全例とも試験終了まで生存し、臨床試験、剖検において、被験物質の投与に関連した異常は認められなかった。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5」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ものと判断した。

<参照>

- 1 農学大事典 第2次増訂改版, 野口弥吉, 川田信一郎 監修, 1994, 養賢堂.
- 2 OECD. Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, 2000. No. 15.
- 3 農業技術体系 (最終追補年度). ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 作物編第6巻, 2002 社団法人 農山漁村文化協会.
- 4 ILSI Crop Composition Database Version 3.0. International Life Sciences Institute, Washington, DC. 2004
<http://www.cropcomposition.org/>
- 5 OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean): Key food and feed nutrients, and anti-nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 2. Organization for Economic Co-operation and Development, 2001, ENV/JM/MONO, 15.
- 6 Taylor N, Fuchs R, MacDonald J, Shariff A, and Padgett S. Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999; 47: 4469-4473.
- 7 Kim S, Jung W, Ahn J, Kim J, and Chung I. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO₂ level and N application. Journal of Science of Food and Agriculture. 2005; 85: 2557-2566.
- 8 国産大豆品種の事典, 農林水産省. 2006a. 大豆のホームページ.
<http://www.maff.go.jp/soshiki/nousan/hatashin/jiten/sakuin.htm>
- 9 FAOSTAT, FAO Statistical Database 2006.
<http://apps.fao.org/page/collections>
- 10 Metcalfe D D, Astwood J D, Townsend R, Sampson H A, Taylor S L and Fuchs R L. Assessment of the allergenic potential of foods from genetically engineered crop plants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1996; 36(S): S165-186.
- 11 Ogawa T, Samoto M and Takahashi K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 2000; 46: 271-279.
- 12 University of Illinois. 2006. Field Crop Diseases.
<http://cropdisease.cropsci.uiuc.edu/index.html>
- 13 大久保一良: 大豆の科学。山内文男, 大久保一良編, 大豆の食品学, 朝倉書店. 1992. 76-90.
- 14 平成 17 年度産大豆の収穫量の確定について, 農林水産省. 農林水産統計データ, 2006b.
<http://www.maff.go.jp/toukei/sokuhou/data/daizu-syukaku2005-k/daizu-syukaku2005-k.xls>

- 15 財務省貿易統計, 2007. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>.
- 16 Krieg P A and Melton D A. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth Enzymol.* 1987; 155: 397-415.
- 17 日本食品化学研究振興財団, 既存添加物名簿収載品目リスト. 2005. <http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/c3f4c591005986d949256fa900252700?OpenDocument>
- 18 CODEX General Standard for Food Additives (GSFA) Details for Alpha-Amylase (Carbohydrase) (*Bacillus licheniformis*) (1100). 2006.
- 19 Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Duck, N.B., Wong, J. Liu, D. and Lassner, M.W. 2004. Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304: 1151-1154.
- 20 O'Dell J T, Nagy F and Chua N-H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 1985; 313: 810-812.
- 21 Bowen B A, Bruce W B, Lu G, Sims L E and Tagliani L A. Synthetic Promoters. US Patent 2000; 6072050.
- 22 Bowen B A, Bruce W B, Lu G, Sims L E and Tagliani L A. Synthetic Promoters. US Patent 2003; 6555673 B1
- 23 Falco C S and Li Z. S-adenosyl-L-methionine Synthetase Promoter and Its Use in Expression of Transgenic Genes in Plants. US Patent Application 2003; 0226166.
- 24 Keil M, Sanches-Serrano J, Schell J and Willmitzer L. Primary structure of proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14: 5641-5650.
- 25 Gallie D R and Walbot V. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20: 4631-4638.
- 26 Insert and 300 Base Pair Flanking Border Sequence Characterization of Soybean Event DP-356043-5. (社内報告書)
- 27 Molecular Characterization of DP-356043-5 Soybean. (社内報告書)
- 28 BLASTn/BLASTx analysis of the Flanking Border Sequences Comprising Soybean Event DP-365043-5. (社内報告書)
- 29 Quantitative ELISA Analysis of Soybean Line DP-356043-5: U.S. and Canada Locations. (社内報告書)
- 30 国民栄養の現状. 平成 16 年国民健康・栄養調査報告. 厚生労働省. 2005.
- 31 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of Glyphosate N-acetyltransferase 4601 Protein (GAT4601) using Western Blot Analysis. (社内報告書)
- 32 Characterization of the In Vitro Pepsin Resistance of GM-HRA using Western

- Blot Analysis. (社内報告書)
- 33 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of Glyphosate N-acetyl transferase 4601 Protein (GAT4601). (社内報告書)
 - 34 Characterization of the In Vitro Pancreatin Resistance of GM-HRA. (社内報告書)
 - 35 Characterization of the Thermal Stability of Glyphosate Acetyltransferase Enzyme Activity: GAT4601 and GAT4602 (社内報告書)
 - 36 Characterization of the Thermal Stability of GM-HRA Enzyme Activity. (社内報告書)
 - 37 Additional Information: Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the GM-HRA Protein using Western Blot Analysis. (社内報告書)
 - 38 Composition of the Amino Acid Sequence Identity between the GAT4601 Protein and Known Protein Allergens. (社内報告書)
 - 39 Comparison of the Amino Acid Sequence Identity between the GM-HRA Protein and Known Protein Allergens. (社内報告書)
 - 40 生化学辞典 第3版. 1998. 監修 今堀和友、山川民夫. 東京化学同人. p67.
 - 41 Siehl D L, Castle L A, Gorton R, Chen Y H, Bertain S, Cho H-J, Keenan R, Liu D and Lassner M W. Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Manag. Sci.* 2005; 61: 235-240.
 - 42 Nutrient Composition Analysis of the Soybean Line DP-356043-5: U.S. and Canada Locations. (社内報告書)
 - 43 Agronomic Characteristics, Quantitative ELISA, Nutrient Composition Analysis, and Magnitude of Glyphosate Residues Analysis of a Soybean Line Containing Event DP-356043-5: U.S. and Canada Locations. (社内報告書)
 - 44 USDA. 2006. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 19. Nutrient Data Laboratory Home Page. (<http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>).
 - 45 文部科学省. 2005. 五訂増補日本食品標準成分表 (2005年版) 脂肪酸組成表 (http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/gijyutu/gijyutu3/toushin/05031801.htm)
 - 46 Subclonic Feeding Study of Herbicide-Tolerant Soybean DP-356043-5 in Sprague-Dawley rats (*Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 2210-2213). (社内報告書)
 - 47 Acute and repeated dose oral toxicity of N-Acetyl-L-aspartic acid in Sprague-Dawley rats (*Food and Chemical Toxicology*, 46, (2008), 2023-2034). (社内報告書)

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5 に係る食品健康影響評価に関する審議結果（案）についての御意見・情報の募集結果について

1. 実施期間 平成21年1月8日～平成21年2月6日
2. 提出方法 インターネット、ファックス、郵送
3. 提出状況 2通
4. 御意見・情報の概要及び遺伝子組換え食品等専門調査会の回答

	御意見・情報の概要	遺伝子組換え食品等専門調査会の回答
1	<p>本件の大豆は除草剤耐性を付与していることから、通常の大豆に対しては散布されない当該除草剤を散布している畑で栽培されることが予想されるので、当該除草剤散布条件下で栽培したときに危険な物質を産生しないかどうかを評価すべきである。しかし、本報告書では「9. 栽培方法に関する事項ダイズ DP-356043-5 の栽培方法については、従来ダイズと同じである」とされており、実際に流通することが期待される大豆と栽培方法が異なる条件で栽培した大豆の評価となっており、適切性に疑問をはさむ余地がある。除草剤散布条件下で栽培した大豆の成分分析等を要求するほうが良いと思われる。</p>	<p>当該ダイズの評価では、除草剤を最大量又は最大量の5倍量散布した条件で栽培した場合に含まれる栄養阻害物質、主要栄養成分、脂肪酸、アミノ酸等についても確認を行っています。その結果、除草剤を散布した場合と散布しない場合による差がないことを確認しています。</p> <p>当該ダイズがその影響を受けないで生育できるとされるグリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤は、共に、従来から、ダイズにおいて使用が認められている除草剤です。従って、これらの除草剤の使用方法が異なることがありますが、ダイズの栽培方法においては、従来ダイズと本質的に同じであることから評価書（案）「第6、9. 栽培方法に関する事項」では、従来ダイズと同じであると記載しています。なお、これらの除草剤を散布した条件で栽培した場合のダイズ中の残留量も我が国の残留基準値に適合していることを確認しています（回答4参照）。</p>
2	<p>当該ダイズより産生される改変 GAT4601 タンパク質に対しては、安全に消費されている前例も十分に安全であるとの情報も存在せず、関連する相同性又は GAT と同じ酵素機能を持つタンパク質酵素への重大な曝露の前</p>	<p>当該ダイズより産生される改変 GAT 4601 タンパク質については、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ <i>gat4601</i> 遺伝子の供与体である <i>Bacillus licheniformis</i> は、α-アミラーゼなどの食品製造酵素の生産において利用経験があること、 ・ 同じ酵素機能を持つ <i>N</i>-アセチルトランス

	<p>例もありません。GAT4601 タンパク質が安全に消費できるとの前例を持たない独自の活性を持つ新種のタンパク質であることを考慮すると、当タンパク質は人体及び動物への影響を調査するために生殖・発生・神経及び慢性毒性の調査を含めた適切な毒性試験を実施するべきである。</p>	<p>フェラーゼは食品として用いられる植物、動物及び微生物に幅広く見られること、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・既知の毒性及びアレルギー性タンパク質との相同性が認められなかったこと、 ・胃液及び腸液による消化試験の結果、30秒以内に消化され、また、加熱試験の結果、60℃、15分で失活すること、 ・当該ダイズを用いたラットにおける亜急性毒性試験の結果、有害な影響は見られなかったことから、 <p>総合的に評価した結果、当該ダイズを通して摂取する改変 GAT4601 タンパク質が、ヒトの健康を損なうおそれはないと考えられます。</p>
3	<p>当該ダイズを用いた掛け合わせ品種については、GAT4601 タンパク質の人体への影響及び安全性をさらに調査する必要がある。</p>	<p>当該ダイズを用いた掛け合わせ品種の食品健康影響評価については、本評価とは別に評価を行うこととなっており、特に当該ダイズは一部の成分に有意な差が認められていることから、掛け合わせ品種の評価では、詳細な審査を行うこととしています。</p>
4	<p>N-アセチルグリホサート及びN-アセチル AMPA に対する懸念が残されています。これらは、新しい代謝産物であり、当該ダイズに比較的高濃度で産生されますが、十分な毒性データが存在しません。これら十分に評価されていない新しい代謝産物の存在は、上記に述べた懸念とともに、さらなる評価の必要性を明示しています。当該ダイズの耐性に対する大きな懸念がある場合、これら新しい代謝産物について予想される植物毒性、残留物の蓄積レベル及び食料／飼料の安全性を理解するためにさらに多くの情報が必要となるでしょう。</p>	<p>栽培期間中に登録使用基準の最大薬量又は5倍量のグリホサートを散布した当該ダイズに含まれるグリホサート及びその代謝物（N-アセチルグリホサート、AMPA、N-アセチル AMPA）の含有量は、最大で6.2ppmであり、日本におけるダイズの残留基準（20ppm）を下回っています。</p> <p>米国環境保護庁（EPA）では、N-アセチルグリホサートの毒性はグリホサートと同等であり、N-アセチル AMPA の毒性は、N-アセチルグリホサートより低いとの見解を示しています。</p> <p>以上のことを考慮して総合的に評価した結果、当該ダイズを通して摂取する N-アセチルグリホサート及び N-アセチル AMPA が、ヒトの健康を損なうおそれはないと考えられます。</p> <p>なお、申請者においては、我が国のグリホサート残留基準の見直しにあわせ、残留農薬の評価の申請を行う予定と聞いています。</p>

5	<p>当該ダイズ中の含有量が有意に増加する <i>N</i>-アセチルアスパラギン酸及び <i>N</i>-アセチルグルタミン酸について徹底的な調査及び神経毒性評価を含む十分な毒性試験を実施することが絶対に必要です。<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸（従来のダイズの 230 倍以上）は神経毒性のある代謝産物 <i>N</i>-メチル-<i>D</i>-アスパラギン酸（特に乳児に対して有毒）と構造的に類似しています。ゆえに、<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸及び <i>N</i>-アセチルグルタミン酸の毒性は新生ラットまたはネズミを使った実験で評価されるべきであり、成体の動物を使用した実験では不十分です。</p>	<p>当該ダイズ中の含有量が有意に増加する <i>N</i>-アセチルアスパラギン酸及び <i>N</i>-アセチルグルタミン酸については、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・当該ダイズに新たに産生されたものではなく、これまでも非組換えダイズを含め身近な食品から摂取していること、 ・日本人が摂取しているダイズを全て当該ダイズに置き換えて摂取したと試算した場合であっても、<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸及び <i>N</i>-アセチルグルタミン酸の増加量はわずかであること、 ・当該ダイズを用いたラットにおける 90 日間の亜急性毒性試験の結果、神経毒性に関する評価項目を含め、有害な影響は見られなかったこと、 ・文献検索の結果、毒性があるとの報告は確認されていないこと。 <p>さらに、<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸については、</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトの脳内において高濃度に存在していること、 ・<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸を用いたラットにおける急性毒性及び亜急性毒性試験の結果、神経毒性に関する評価項目を含め、有害な影響は見られなかったことから、 <p>総合的に評価した結果、当該ダイズを通して摂取する <i>N</i>-アセチルアスパラギン酸及び <i>N</i>-アセチルグルタミン酸が、ヒトの健康を損なうおそれはないと考えられます。</p> <p>なお、<i>N</i>-メチル-<i>D</i>-アスパラギン酸（NMDA）は、記憶や学習などに関わる NMDA 型のグルタミン酸受容体を選択的に作用することが知られていますが、<i>N</i>-アセチルアスパラギン酸は上述の理由からヒトの体内で NMDA と同様の働きをする可能性はないと考えられます。</p>
---	---	---