

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシ  
フェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ  
阻害型除草剤耐性ワタ GHB811

2018年4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 .....	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
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 .....	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 .....	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 .....	11
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 .....	11
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 .....	14

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.....	17
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	18
9. 栽培方法に関する事項.....	19
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	19
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 .....	19
Ⅲ. 食品健康影響評価結果 .....	19
<参照> .....	20

### <審議の経緯>

- 2018年3月6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0306第4号）、関係書類の接受
- 2018年3月13日 第688回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年3月28日 第172回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年4月17日 第693回食品安全委員会（報告）

### <食品安全委員会委員名簿>

佐藤 洋（委員長）  
山添 康（委員長代理）  
吉田 緑  
山本 茂貴  
石井 克枝  
堀口 逸子  
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>

中島 春紫（座長）  
小関 良宏（座長代理）  
児玉 浩明（座長代理）  
岡田 由美子            手島 玲子  
橘田 和美              樋口 恭子  
近藤 一成              山川 隆  
鈴木 秀幸              吉川 信幸  
柘植 郁哉

### <専門参考人>

澤田 純一（独立行政法人医薬品医療機器総合機構テクニカルエキスパート）  
（第172回遺伝子組換え食品等専門調査会）

## 要 約

「除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」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、ワタ (*Gossypium hirsutum* L.) にトウモロコシ (*Zea mays*) に由来する改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* に由来する改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子を導入して作出されており、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質が発現することで、除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤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の結果、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、「除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」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：除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811

性質：除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性

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 LP（ドイツ）

「除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」（以下「ワタ GHB811」という。）は、トウモロコシ（*Zea mays*）に由来する改変5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（*2mepsps*）遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* に由来する改変4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（*hppdPFW336-1Pa*）遺伝子を導入して作出されており、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS タンパク質）及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（HPPD W336 タンパク質）が発現することで、除草剤グリホサート及び4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤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 Coker312 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

*2mepsps* 遺伝子の供与体は、トウモロコシ（*Z. mays*）であり、*hppdPFW336-1Pa* 遺伝子の供与体は、*P. fluorescens* である。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法

*2mepsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する 2mEPSPS タンパク質を発現する。*hppdPFW336-1Pa* 遺伝子は、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性を付与する HPPD W336 タンパク質を発現する。

これらの遺伝子は、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は食品として使用され、食用油、マーガリンの原料等として用いられる。また、リンター（地毛）がセルロース源として食品に使用

される。

### 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

ワタ綿実の主要栄養組成（対乾燥重量）は、粗タンパク質 14.9～28.8%、粗脂質 13.6～25.6%、灰分 2.66～4.99%及び炭水化物 46.5～63.0%である。

(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、ゴシポールのうち活性を有する遊離ゴシポール 0.106～1.15%（対乾燥重量）、総ゴシポール 0.153～1.53%（対乾燥重量）ジヒドロステルクリン酸 0.0972～0.438%（対総脂肪酸）、マルバリニン酸 0～1.062%（対総脂肪酸）及びステルクリン酸 0～0.423%（対総脂肪酸）である。

### 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 GHB811 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来ワタと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ワタ GHB811 の摂取部位は、従来ワタと変わらない。

(3) 摂取量

ワタ GHB811 の摂取量は、従来ワタと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ワタ GHB811 の調理及び加工方法は、従来ワタと変わらない。

### 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

宿主と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 GHB811 は、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子を導入して作出されており、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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 GHB811 の安全性評価においては、既存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 GHB811 は、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子を導入して作出され、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質を発現することで、除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤の影響を受けずに生育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 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* 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

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸（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）が含まれている。ゴシポールは、ヘモグロビンからの酸素の乖離を阻害して心不全、心肥大、肝臓障害を引き起こし（参照 1）、またシクロプロペン脂肪酸は、脂質の代謝に異常を起こして細胞膜の透過性に変化を起こす（参照 2）が、綿実油の製造工程でともに不活化又は除去されることが報告されている（参照 1、3）。

### 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不活化又は除去され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、ゴシポールを産生する属が複数知られている。



## 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 GHB811 の作出に使用した導入用プラスミド pTSIH09 の構築には、プラスミド pGSC1700 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

導入用プラスミド pTSIH09 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 4、5）。

#### (2) 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 pTSIH09 の外骨格領域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

導入用プラスミド pTSIH09 の外骨格領域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

導入用プラスミド pTSIH09 の外骨格領域には、アミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれている。

#### (5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pTSIH09 の外骨格領域には、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

*2mepsps* 遺伝子の供与体は、トウモロコシ (*Z. mays*) である。*hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の供与体は、*P. fluorescens* A32 株である。

#### (2) 安全性に関する事項

*2mepsps* 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays*) は、長期にわたり食料や飼料として安全に摂取されてきた。

*hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* は、自然界に広く存在し、魚類及び無脊椎動物に感染するがヒトへは日和見病原体を超えるほどの病原性を持たない。米国において、*P. fluorescens* を有効成分として含む生物農薬が安全に使用されている。

## 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

*2mepsps* 遺伝子は、トウモロコシ (*Z. mays*) からクローニングされた *epsps* 遺伝子の塩基配列に基づき、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS タンパク質) の 102 番目のアミノ酸をトレオニンからイソロイシンに、106 番目のアミノ酸をプロリンからセリンに置換する変異を導入して改変した (参照 6)。

*hppdPFW336-1Pa* 遺伝子は、*P. fluorescens* からクローニングされた *hppd* 遺伝子の塩基配列に基づき、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (HPPD タンパク質) の 336 番目のグリシンをトリプトファンに置換する変異を導入して改変した (参照 7)。

### (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

*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336-1Pa* 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

#### ① *2mepsps* 遺伝子

EPSPS タンパク質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) とリン酸を生ずる反応を触媒する。

*2mepsps* 遺伝子がコードする 2mEPSPS タンパク質は、EPSPS タンパク質の 2 アミノ酸を置換することにより、グリホサートに対する結合親和性を低下させている。その結果、除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示すことができる (参照 8)。

2mEPSPS 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、タンパク質データベース<sup>a</sup>及び毒性タンパク質データベース<sup>b</sup>を用いて相同性検索を行った。その結果、複数種由来の EPSPS タンパク質と相同性が認められたが、これらにおいて毒性は報告されていない。また、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 9)。

#### ② *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子

HPPD タンパク質は、微生物、植物及び哺乳動物のチロシン代謝経路において、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) からホモゲンチジン酸 (HGA) を生じる反応を触媒する酵素である。HPPD 阻害型除草剤の一つである除草剤

<sup>a</sup> NCBI non-redundant protein database: 検索日 2016 年 11 月 2 日

<sup>b</sup> Bayer toxin database: 検索日 2017 年 2 月 13 日

イソキサフルトールは、植物に吸収されるとジケトニトリル構造物 (DKN) へ代謝され、DKN は、HPPD タンパク質の活性部位に結合してその活性を阻害する。その結果、植物体内で HGA の生産ができなくなり、カロテノイドの合成阻害、光合成の不安定化及び葉緑体の破壊を伴った白化症状を示し、植物は枯死する。

*hppdPfw336-1Pa* 遺伝子がコードする HPPD W336 タンパク質は、HPPD タンパク質の 1 アミノ酸を置換することにより、DKN との結合親和性を低下させている。その結果、HPPD W336 タンパク質は DKN による阻害活性を受けずに正常な代謝が行えるため、HPPD 阻害型除草剤を散布しても生育が可能となる (参照 7)。

HPPD W336 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、タンパク質データベース<sup>a</sup>及び毒性タンパク質データベース<sup>b</sup>を用いて相同性検索を行った。その結果、複数種由来の HPPD タンパク質と相同性が認められたが、これらにおいて毒性は報告されていない。また、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 pTSIH09 には、アミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれているが、ワタ GHB811 には検出され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 (参照 11)。

### 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

*2mepsps* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域である Ph4a748 プロモーターである (参照 12)。

*hppdPfw336-1Pa* 遺伝子のプロモーターは、Cassava vein mosaic virus のプロモーター領域である Pcsvmv プロモーターである (参照 13)。

#### (2) ターミネーターに関する事項

*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子のターミネーターは、いずれもシロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域由来の ThistonAt ターミネーターである (参照 12)。

#### (3) その他

*2mepsps* 遺伝子の Ph4a748 プロモーター下流にシロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H3.Ⅲ第Ⅱ遺伝子の第一イントロン (Intron1 h3At) を結合させて植物の分裂組織での発現を高めた (参照 12)。

*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の 上流にヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びトウモロコシ (*Z. mays*) の RuBisCo 小サブユニ

ット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列 (TPotp C 及び TPotp Y-1Pa) をそれぞれ結合させて 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質を色素体に輸送することを可能とした (参照 14)。

#### 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 pGSC1700 に、*2mepsps* 遺伝子、*hppdPFW336-1Pa* 遺伝子等を挿入することにより、導入用プラスミド pTSIH09 を作製した。

#### 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 pTSIH09 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 pTSIH09 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 (参照 15)。

##### (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

導入用プラスミド pTSIH09 の意図する挿入領域は、右側領域 (RB) から左側領域 (LB) 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 pTSIH09 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜により純化されている。また、目的外の遺伝子の混入がないことを、シーケンス解析により確認している (参照 5)。

#### 6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド pTSIH09 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、グリホサートを含む培地で選抜して再生個体を得た後、HPPD 阻害型除草剤であるテンボトリオンに抵抗性を示す個体を選抜した。次に、自殖及び既存品種との戻し交配を行い、ワタ GHB811 が得られた。

表1 挿入 DNA の構成要素

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>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域
(hppdPFW336-1Pa 遺伝子発現カセット)	
<i>ThistonAt</i> ターミナーター	ターミネーター領域 シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 ポリアデニル化により転写を終結させる。
<i>hppdPFW336-1Pa</i>	<i>P. fluorescens</i> 由来の改変 HPPD W336 タンパク質をコードする遺伝子
TPotpY-1Pa	ヒマワリ ( <i>H. annuus</i> ) 及びトウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列 HPPD W336 タンパク質を色素体に輸送する。
<i>PCsvm</i> プロモーター	プロモーター領域 Cassava Vein Mosaic Virus のプロモーター領域 <i>hppdPFW336-1Pa</i> 遺伝子を構成的に発現させる。
(2mepsps 遺伝子発現カセット)	
<i>Ph4a748</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域配列 <i>2mEPSPS</i> 遺伝子を構成的に発現させる。
Intron1 h3At	シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のヒストン H3.Ⅲ第Ⅱ遺伝子の第一イントロン <i>Ph4a748</i> プロモーターとの組み合わせで、構成的に発現レベルを高くする。
TPotp C	ヒマワリ ( <i>H. annuus</i> ) 及びトウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列 <i>2mEPSPS</i> タンパク質を色素体に輸送する。
<i>2mepsps</i>	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 由来の <i>2mEPSPS</i> タンパク質をコードする遺伝子
<i>ThistoneAt</i> ターミナーター	ターミネーター領域 シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列 ポリアデニル化により転写を終結させる。
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>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域

## 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 GHB811 に挿入された T-DNA のコピー数を確認するため、ワタ GHB811 の T1 及び BC2F3 世代並びに非組換えワタの葉から抽出したゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を行った結果、1 コピー挿入されていることが確認された（参照 11、16、17）。

ワタ GHB811 に挿入された DNA の塩基配列及び近傍配列についてシーケンズ解析を行った結果、挿入位置に 13 bp の欠失が確認されたが、導入用プラスミド pTSIH09 の T-DNA 領域及び宿主ゲノムの挿入近傍配列と一致した（参照 18）。

導入用プラスミド pTSIH09 の外骨格領域がワタ GHB811 のゲノムに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結果、ワタ GHB811 のゲノムに検出しないことが確認された（参照 11）。

T-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、5' 末端近傍配列（1,217 bp）、3' 末端近傍配列（1,296 bp）及び欠失した 13 bp を含むゲノム領域について、データベース<sup>c</sup>を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、3つの既知の配列との相同性が確認されたが、5' 側近傍配列及び 3' 側近傍配列にまたがってはならず、また、既知のタンパク質との相同性は確認されなかった。したがって、T-DNA 挿入によって宿主の内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられた（参照 18）。

#### (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 GHB811 の挿入 DNA 領域及び両近傍配列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、GetORF (EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Site) を用いて 6つの読み枠において検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 126 個見いだされた（参照 15）。

検出された 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、アレルゲンデータベース<sup>d</sup>を用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列について 35%以上及び連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 15）。

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、データベース<sup>e</sup>を用いて相同性検索を行った結果、いずれも既知の毒性タンパク質と類似性を示

<sup>c</sup> NCBI nucleotide collection Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB

<sup>d</sup> AllergenOnline (16 版) :タンパク質のアレルギー誘発性及び食物アレルギーを根拠に抽出された NCBI 及び IUIS の配列からなるデータベース。

<sup>e</sup> NCBI non-redundant protein database

さなかつた（参照 15）。

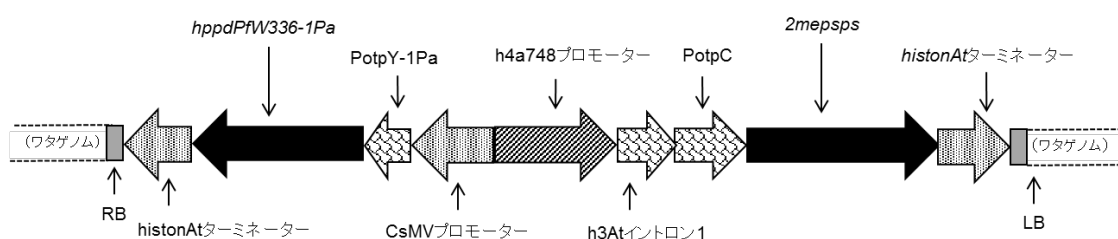


図1 ワタ GHB811 に挿入された DNA (模式図)

## 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

除草剤イソキサフルトール及び除草剤グリホサートを散布したワタ GHB811 の葉、根、花蕾、さく、植物体及び有毛種子における 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 2 のとおりである（参照 19）。

表2 ワタ GHB811 における 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$  乾燥重量)

分析組織*	2mEPSPS タンパク質	HPPD W336 タンパク質
葉	874.63~1269.39	808.10~956.75
根	163.76	25.42
花蕾	506.64	284.52
さく	437.00	125.62
植物体	795.81	297.03
有毛種子	150.88	27.01

\* 葉は第 4-6 葉期より開花 2 週間後、根は第 4-6 葉期、花蕾、さく及び植物体は開花 2 週間後、有毛種子は成熟期における値を示した。

## 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

ワタは、主として綿実油として摂取される。加熱処理綿実油粕、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油において、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質は ELISA 法により検出されなかつたことから、一日蛋白摂取量への影響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

2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays*) に関して、一般的にはアレルギー性食品として認識されていない(参照 20)。また、hspdPFW336-

1Pa 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* に関して、アレルギー誘発性の報告はない（参照 21）。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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

*E. coli* で発現させた 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の人工胃液中での消化性を確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両タンパク質とも、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 22、23）。

② 人工腸液に対する感受性

*E. coli* で発現させた 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の人工腸液中での消化性を確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両タンパク質とも、試験開始直後に速やかに消化されることが確認された（参照 24、25）。

③ 加熱処理に対する感受性

a. 2mEPSPS タンパク質

*E. coli* で発現させた 2mEPSPS タンパク質の加熱処理に対する感受性を確認するため、4、25、37、55、75 及び 95°C で 30 分間処理し、ELISA 法にて分析した結果、2mEPSPS タンパク質の免疫反応性は、55°C の加熱処理で 30.4% となり、75 及び 95°C の加熱処理では検出限界値以下となった（参照 26）。したがって、2mEPSPS タンパク質は加熱処理に対して安定ではなく、タンパク質の高次構造が変化し、抗体との結合性が低下すると考えられた。

また、2mEPSPS 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、酵素活性は 20°C から 60°C までは増加し、60°C 以上では急激に減少し 75°C で失活した。また、60°C で約 10 分の加熱で失活することが確認された（参照 27）。

b. HPPD W336 タンパク質

*E. coli* で発現させた HPPD W336 タンパク質を 4、25、37、55、75 及び 95°C で 30 分間処理し、ELISA 法にて分析した結果、HPPD W336 タンパク質の免疫反応性は、55°C の加熱処理で 29.0% となり、75 及び 95°C の加熱処理では定量限界値以下となった（参照 28）。したがって、HPPD W336 タンパク質は加熱処理に対して安定ではなく、タンパク質の高次構造が変化し、



抗体との結合性が低下すると考えられた。

また、HPPD W336 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、45℃では 20 分後に活性が 50%以下に低下し、60 及び 95℃では 2.5 分以内に失活した（参照 29）。

- (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
- 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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、FASTA アルゴリズムを用いてアレルゲンデータベース<sup>f</sup>に登録されている全てのアレルゲンとの相同性検索を行った。その結果、両タンパク質ともに、連続する 80 アミノ酸以上の配列で 35% 以上の相同性を示す又は連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 9、10）。

上記（1）から（4）及び前項 3 から総合的に判断し、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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 GHB811 に挿入された *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336-1Pa* 遺伝子の安定性を確認するため、5 世代のワタ GHB811 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 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

### (1) 2mEPSPS タンパク質

2mEPSPS タンパク質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩（PEP）とシキミ酸-3-リン酸塩（S3P）と高い基質特異性を有することが示されている。また、2mEPSPS タンパク質の産生により、EPSPS タンパク質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。したがって、2mEPSPS タンパク質の作用機作は独立しており、植物の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### (2) HPPD W336 タンパク質

HPPD W336 タンパク質は、HPPD 阻害型除草剤によって阻害されるワタ内在性の HPPD タンパク質に代わり、チロシン代謝経路において 4-HPP からホモゲンチジン酸（HGA）生成を触媒する酵素であることから、HGA の上流の

---

<sup>f</sup> COMPARE v1: Comprehensive Protein Allergen Resource. ILSI-HESI が管理するアレルゲンデータベース 検索日：2017年2月3日

アミノ酸、HGA 含量及び下流の代謝産物に対する影響を考察した。

HGA の上流に位置するチロシン及びフェニルアラニンの含量は、ワタ GHB811 と非組換えワタの間に統計学的有意差はなく、ワタ GHB811 において、チロシン含量の上昇は認められなかったことから、チロシン生合成に関連するアミノ酸含量や関連する代謝経路に影響はないとしている。非組換えワタ及びワタ GHB811 の HGA 含量を測定した結果、統計学的有意差は認められなかった (参照 31) ことから、HPPD W336 タンパク質を過剰に発現させても HGA 量に差は生じないことが示された。また、フマル酸及びアセトアセテート含量について、ワタ GHB811 のチロシン等のアミノ酸含量及び HGA 含量に変化のなかったことから、影響を受けないと考えられた。したがって、HPPD W336 タンパク質が HGA 下流の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

HPPD W336 タンパク質の基質特異性について、4-HPP 以外に植物体内で基質となる化合物の有無を確認するため、植物体内に存在し、HPPD タンパク質の基質となることの報告がある (参照 32) 4 種類の化合物 (フェニルピルビン酸 (PP)、3, 4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)、 $\alpha$ -ケトイソカプロン酸 (KIC) 及び 2-オキソ-5-チアヘキサン酸 (KMTB)) について検討した。これら 4 種類の化合物及び 4-HPP タンパク質を基質とし、HPPD W336 タンパク質と反応させた結果、3,4-dHPP を除き、反応は認められなかった。3,4-dHPP は、わずかながら反応が認められたものの、競合する基質がない *in vitro* での結果であることから、4-HPP が存在する植物体内において基質として利用される可能性は極めて低いと考えられた。したがって、これらの 4 つの物質が HPPD W336 タンパク質の基質となる可能性は低く、4-HPP 以外に基質となるものはないと考えられた (参照 33、34)。

以上のことから、HPPD W336 タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

## 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 GHB811 の有毛種子及び非組換えワタの有毛種子について、主要構成成分、ミネラル類、ビタミン類、有害生理活性物質、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析を行い、統計学的有意差について検討した。ワタ GHB811 は、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールを散布した処理区及び無処理区を設定した (参照 35、36)。

### (1) 主要構成成分

有毛種子の主要構成成分 (水分、灰分、炭水化物、粗脂質、粗タンパク質、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び総食物繊維) 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商業品種の許容範囲内であった。

(2) ミネラル類

有毛種子のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛）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かった。

(3) ビタミン類

有毛種子のビタミン類（ $\alpha$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール、総トコフェロール、 $\alpha$ -トコトリエノール、総トコトリエノール、ビタミンA及びビタミンK）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商業品種の許容範囲内であった。なお、 $\alpha$ -トコトリエノール及び総トコトリエノールにおいては、1/3以上のサンプルで定量限界値未満のため統計解析は行われなかった

(4) 有害生理活性物質

有毛種子の遊離型ゴシポール、総ゴシポール、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商業品種の許容範囲内であった。

(5) アミノ酸組成

有毛種子のアミノ酸 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は認められなかった。

(6) 脂肪酸組成

有毛種子の脂肪酸 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商業品種の許容範囲内であった。なお、6 種類においては、1/3以上のサンプルが定量限界値未満のため統計解析は行われなかった。

## 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、2017年4月に、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品及び飼料としての安全性審査のための申請が行われ、また、2017年5月に、米国農務省（USDA）に対して無規制栽培のための申請が行われた。

カナダにおいては、2017年8月に、カナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁（Canadian Food Inspection Agency）に飼料としての安全性審査及び環境放出許可の申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、2017年4月に、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、飼料及び輸入に

係る安全性審査の申請が行われた。

#### **9. 栽培方法に関する事項**

ワタ GHB811 の栽培方法は、除草剤グリホサート及び HPPD 阻害型除草剤を使用できることを除いて、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 GHB811 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までの事項により、安全性の知見が得られている。

### **Ⅲ. 食品健康影響評価結果**

「除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」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. Jones L. A. 1981. Natural antinutrients of cottonseed protein products National Cottonseed Products Association, p.559-580.
2. Phelps R. A., Shenstone F. S., Kemmerer A. R., Evans R. J. 1965. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. Poultry science: 44, p.358-394.
3. Gunstone, F. D., Harwood, J. L., Padley, F. B. 1994. "Cyclic acids". The Lipid Handbook. 2nd ed., Chapman & Hall, p.13-146.
4. R. Dreesen. 2015. Description of vector pTSIH09. (社内資料)
5. R. Dreesen. 2015. Sequence determination of plasmid pTSIH09. (社内資料)
6. Lebrun, M., Sailland, A., Freyssinet, G., Degryse, E. 2003. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. U.S. Patent US 6,566,587 B1.
7. Boudec, P., Rodgers, M., Dumas, F., Sailland, A., Bourdon, H. 2001. Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides. U.S. Patent US 6,245,968 B1.
8. M. L. Healy and E. Schönbrunn. 2006. Biochemical characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (wtEPSPS) and its mutated glyphosate-resistant form (2mEPSPS) . (社内資料)
9. A. Capt. 2017. 2mEPSPS protein, amino acid sequence homology search with known allergens and toxins. (社内資料)
10. A. Capt. 2017. HPPD W336 protein, amino acid sequence homology search with known allergens and toxins. (社内資料)
11. P. Back, 2016. Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in cotton GHB811. (社内資料)
12. Chaboute, M.-E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M., Gigot, C., 1987. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 8, p.179-191
13. Verdaguer B, de Kochko A, Beachy RN, Fauquet C.1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. Plant Mol Biol. 31(6):1129-39.
14. Lebrun, M., Leroux B., Sailland A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. U.S. Patent 5,510,471.
15. A. Capt. 2016. GHB811 cotton, Identification of Open Reading Frames and homology search of sequences  $\geq 30$  amino acids to known allergens and toxins. (社内資料)
16. P. Back, 2017. Detailed insert characterization in the BC2F3 generation of GHB811cotton. (社内資料)

17. R. Dreesen. 2015. DNA sequence determination of the transgenic and insertion loci of cotton GHB811. (社内資料)
18. A. van Hoecke. 2017. Bioinformatics analysis of the GHB811 cotton insertion locus. (社内資料)
19. S. Sathischandra and A.-J. Wu. 2017. GHB811 cotton-Summary of protein expression analyses of field samples grown in the USA during 2015. (社内資料)
20. OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*) : Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO (2002) 25.
21. OECD. 1997. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. OCDE/GD (97) 22.
22. D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein; *In vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid. (社内資料)
23. J.B. Rascle. 2009. HPPD W336 protein; *In vitro* digestibility study in human gastric fluid. (社内資料)
24. D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein; *In vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid. (社内資料)
25. J.B. Rascle. 2009. HPPD W336 protein; *In vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid. (社内資料)
26. H. Serrano. 2014. The effect temperature on microbially-produced 2mEPSPS as assessed by ELISA. (社内資料)
27. M. L. Healy and E. Schönbrunn. 2006. Biochemical characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (wtEPSPS) and its mutated glyphosate-resistant form (2mEPSPS) . (社内資料)
28. T. Moore. 2013. The effect of temperature on microbially produced HPPDW336 assessed by ELISA. (社内資料)
29. V. Habex, 2011. The modified 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene product (HPPD W336) description and characterization. (社内資料)
30. R. Dreesen. 2016. Structural stability analysis of cotton GHB811. (社内資料)
31. J. Gottula *et al.*, 2016. GHB811 cotton – Supplemental composition assessment of GHB811 cotton grown in the USA during 2014 and 2015. (社内資料)
32. R. Dreesen. 2015. Literature survey on potential alternative substrates for HPPD. (社内資料)
33. R. Dreesen. 2015. Substrate specificity of the wild type HPPD and HPPD W336 proteins from *Pseudomonas fluorescens*. (社内資料)
34. B. Laber. 2015. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. Enzymatic characterization of the wild-type and G336W mutant enzymes. (社内資料)

35. J. Gottula *et al.*, 2016. GHB811 cotton – Composition assessment of GHB811 cotton grown in the USA during 2014 and 2015. (社内資料)
36. J. Gottula *et al.*, 2016. GHB811 cotton – Supplemental composition assessment of GHB811 cotton grown in the USA during 2014 and 2015. (社内資料)