

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤アリルオキシアルカノエート系及び
グルホシネート耐性ダイズ 68416 系統

2014年3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
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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	19
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	19
<参照>.....	19

<審議の経緯>

- 2013年5月15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0515第1号）、関係書類の接受
- 2013年5月20日 第474回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年6月6日 第115回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 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1月16日 第123回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年3月10日 第506回食品安全委員会（報告）

<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>

2013年9月30日まで		2013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	手島玲子	小関良宏	手島玲子
宇理須厚雄	中島春紫	宇理須厚雄	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
澁谷直人		近藤一成	

（専門参考人）

岡田由美子（第122回遺伝子組換え食品等専門調査会）

要 約

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ 68416 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、*Delftia acidovorans* MC1 株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 遺伝子を導入して作出されており、改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 タンパク質を発現することで、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統には、選択マーカーとして利用するために、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子が導入されている。

「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、非組換えダイズ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、「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ 68416 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：除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ 68416 系統

性質：アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性、除草剤グルホシネート耐性

申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社

開発者：Dow AgroSciences LLC（米国）

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ダイズ 68416 系統」（以下「ダイズ 68416」という。）は、*Delftia acidovorans* MC1 株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 遺伝子（改変 *aad-12* 遺伝子）を導入して作出されており、改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 タンパク質（改変 AAD-12 タンパク質）を発現することで、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統の作出過程において、選択マーカーとして利用するために、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *pat* 遺伝子）が導入されている。

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 (*Glycine max* (L.) Merr.) の Maverick である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*D. acidovorans* MC1 株及び *S. viridochromogenes* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *aad-12* 遺伝子は、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変 AAD-12 タンパク質を発現する。また、改変 *pat* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質を発現し、形質転換体を選択するためのマーカーとして利用された。

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 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

ダイズは、世界的に食用油と家畜飼料として用いられている。アジアでは古くから、食品素材として、豆腐、味噌等に利用されている。

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

ダイズ種子の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 32.0～45.5%、脂質 8.1～24.7%、灰分 3.9～7.0%、炭水化物 29.6～50.2%、酸性デタージェント繊維 7.8～18.6%及び中性デタージェント繊維 8.5～21.3%である（参照 1, 2）。

- (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

ダイズ種子の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、トリプシンインヒビター 19.6～118.7 TIU^a/mg、レクチン 37～323 HU^b/mg、スタキオース 1.2～3.5%、ラフィノース 0.2～0.7%、フィチン酸 0.6～2.7%、イソフラボン類（ダイゼイン 0.06～2.45 mg/g、ゲニステイン 0.14～2.84 mg/g、グリシテイン 0.02～0.31 mg/g）である（参照 1, 2）。

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 68416 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 68416 の摂取部位は、従来のダイズと変わらない。

- (3) 摂取量

ダイズ 68416 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 68416 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

ダイズ 68416 は、改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の導入によって、改変 AAD-12 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。

^a TIU : trypsin inhibitor unit

^b HU : hemagglutinating unit

以上、1～6から、ダイズ 68416 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

ダイズ 68416 は、導入された改変 *aad-12* 遺伝子が改変 AAD-12 タンパク質を発現することによって、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できるとされている。

なお、本系統の作出過程において選択マーカーとして利用するために、改変 *pat* 遺伝子が導入されており、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

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* 属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の Maverick 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

中国を中心とするアジア地域では栽培の歴史が長い。*Glycine* 属には、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属があり、ダイズの祖先であると考えられるツルマメは、*Soja* 亜属に属している。

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、有害生理活性物質であるトリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸が含まれている。

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り、ダイズ貯蔵タンパク質のうち、11S、7S、2S グロブリンが IgE 結合活性を持つことが報告されている（参照 3）。代表的なアレルゲンとして、ダイズ疎水性タンパク質、ダイズプロフィリン、ダイズ液胞タンパク質及びグリシニンなどが同定されている（参照 4）。

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、真菌類、寄生虫及び細菌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

ダイズは、豆腐、味噌などの様々な食品に加工され、ヒトに摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種であるツルマメには、トリプシンインヒビター、フィチン酸、ラフィノースなどの有害生理活性物質が含まれている。

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

ダイズ 68416 の作出に使用した導入用プラスミド pDAB4468 の構築には、プラスミド pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 には、スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*specR* 遺伝子) が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pDAB2407 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 *aad-12* 遺伝子の供与体は、*D. acidovorans* MC1 株である。改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*S. viridochromogenes* である。

(2) 安全性に関する事項

D. acidovorans は香料の製造や医療用の生体材料の生成に利用されていることが報告されている。なお、*D. acidovorans* による日和見感染や角膜感染についての報告が数例ある (参照 5, 6)。*S. viridochromogenes* がヒトや家畜に対して病原性を有するという報告はない。

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 *aad-12* 遺伝子は、*D. acidovorans* MC1 株からクローニングされた *aad-12* 遺伝子の塩基配列に基づき、発現タンパク質のアミノ酸配列を改変せずに、植物での発現が最適となるように塩基配列を改変し、更にクローニングサイトが導入された遺伝子である。クローニングサイトの導入によって、N 末端側の 2 番目に 1 アミノ酸が付加されている。

改変 *pat* 遺伝子は *S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子の塩基配列に基づき、発現タンパク質のアミノ酸配列を改変せずに、植物での発現が最適となるように塩基配列を改変したものである。

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

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 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 *aad-12* 遺伝子

改変 *aad-12* 遺伝子がコードする改変 AAD-12 タンパク質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び S 体^cを特異的に酸化する反応を触媒する酵素である（参照 7）。ダイズ 68416 では、改変 AAD-12 タンパク質の作用によって、アリルオキシアルカノエート系除草剤は酸化され、除草活性のない化合物に変換される。その結果、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育することができるとされている。なお、アリルオキシアルカノエート基を持つ化合物のうち、除草活性を持つものは光学異性体のないもの及び R 体^cのみである。

改変 AAD-12 タンパク質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^d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 8）。

・改変 *pat* 遺伝子

改変 *pat* 遺伝子が 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、ダイズ 68416 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。

^c カルボン酸の隣の炭素の立体配置を示す。

^d Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2011 年 2 月 18 日)

PAT タンパク質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^d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 9）。

(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 pDAB4468 には、スペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が含まれているが、ダイズ 68416 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 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

(1) プロモーターに関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ由来のポリユビキチン 10 プロモーター (*AtUbi10*) である（参照 11）。

改変 *pat* 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 12）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'非翻訳領域 (*AtuORF23 3' UTR*) である（参照 13）。

改変 *pat* 遺伝子のターミネーターは、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'非翻訳領域 (*AtuORF1 3' UTR*) である（参照 13）。

(3) その他

改変 *aad-12* 遺伝子の発現を安定させるために、*AtUbi10* の上流にタバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の核マトリックス結合領域である RB7 Matrix Attachment Region (*RB7 MAR*) が使用された（参照 14, 15, 16）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子をプラスミド pDAB2407 に挿入することによってプラスミド pDAB4468 が構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pDAB4468 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 pDAB4468 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 pDAB4468 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 pDAB4468 の塩基配列は明らかになっており、目的外の遺伝子の混入はない。

表 1 ダイズ 68416 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
Border B	T-DNA を伝達する際に利用される境界配列を含む <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
<i>RB7 MAR</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域 (RB7 Matrix Attachment Region)
(改変 <i>aad-12</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>AtUbi10</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ由来のポリユビキチン 10 (<i>UBQ10</i>) プロモーター配列
改変 <i>aad-12</i>	<i>D. acidovorans</i> 株由来の改変 AAD-12 タンパク質をコードする遺伝子
<i>AtuORF23 3' UTR</i> ターミネーター	ターミネーター領域 アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 非翻訳領域
(改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>CsVMV</i> プロモーター	プロモーター領域 Cassava vein mosaic virus 由来のプロモーター
改変 <i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子

構成 DNA	由来及び機能
<i>AtuORF1 3' UTR</i> ターミネーター	ターミネーター領域 アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の 転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 非翻訳領域
Border A	T-DNA を伝達する際に利用される境界配列を含む <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

プラスミド pDAB4468 の T-DNA 領域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を得た。次に、再分化個体の遺伝子解析により目的の遺伝子が導入されていることを確認後、一般的なダイズの育成プロセスに従って自殖を行い、ダイズ 68416 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

ダイズ 68416 のゲノムに挿入された改変 *aad-12* 遺伝子発現カセット及び改変 *pat* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、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 10、17)。

導入用プラスミド pDAB4468 の外骨格領域がダイズ 68416 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、ダイズ 68416 のゲノム中に検出されないことが確認された(参照 10)。

ダイズ 68416 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pDAB4468 の T-DNA 領域と比較した結果、挿入遺伝子の 3'末端に 9 bp の挿入があることを除き、塩基配列は一致することが確認された(参照 17、18、図 1)。

ダイズ 68416 の挿入 DNA 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に、5'末端近傍配列 (2,730 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,082 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、3'末端近傍配列の 55 bp の欠失を除き、近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられた(参照 18)。

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 (2,730 bp)、3'末端近傍配列 (1,082 bp) 及び欠失した 55 bp を含むダイズゲノム領域 (3,867 bp) について、タンパク質データベース^eを用いて blastx 検索を行った。その結果、5'末端近傍配列領域に 2 個のダイズ未知タンパク質が検出され、ペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様タンパク質をコードする配列が含まれていることが示唆された。3'末端近傍配

^e Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2010 年 6 月 11 日)

列領域に相同性の高い配列は見いだされなかった。ダイズゲノム領域での blastx 検索結果では、5'末端近傍配列領域での検索結果と同様、5'末端側にペルオキシダーゼ又はペルオキシダーゼ様タンパク質をコードする配列が検出されたため、blastn によるさらなる検索を行った。その結果、ペルオキシダーゼスーパーファミリーに属する 1,274 bp のダイズ由来の cDNA クローンが検索され、その転写終結点から挿入遺伝子の開始点までの距離が 322 bp であった。したがって、挿入遺伝子によって、ペルオキシダーゼ様遺伝子が破壊されている可能性はないと考えられた (参照 20)。

さらに、ダイズゲノム領域でオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った結果、30 アミノ酸からなる配列が 1 個見いだされたが、blastp 検索の結果、既知のダイズタンパク質との相同性は認められなかった。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ないと考えられた (参照 19)。

(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

ダイズ 68416 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (2,730 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,082 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。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 2 個見いだされた。

2 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^f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。さらに、既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、FARRP アレルゲンデータベース^g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に、前述のアレルゲンデータベース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。

また、導入用プラスミド pDAB4468 の T-DNA 領域における各遺伝子要素の接合部について、30 アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる意図しない ORF が存在しないかを六つの読み枠について検索した結果、29 個の ORF が検出されたが、既知のアレルゲン及び毒素タンパク質との相同性は認められなかった (参照 19)。

^f Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2010年6月11日)

^g FARRP Allergen database Version10.

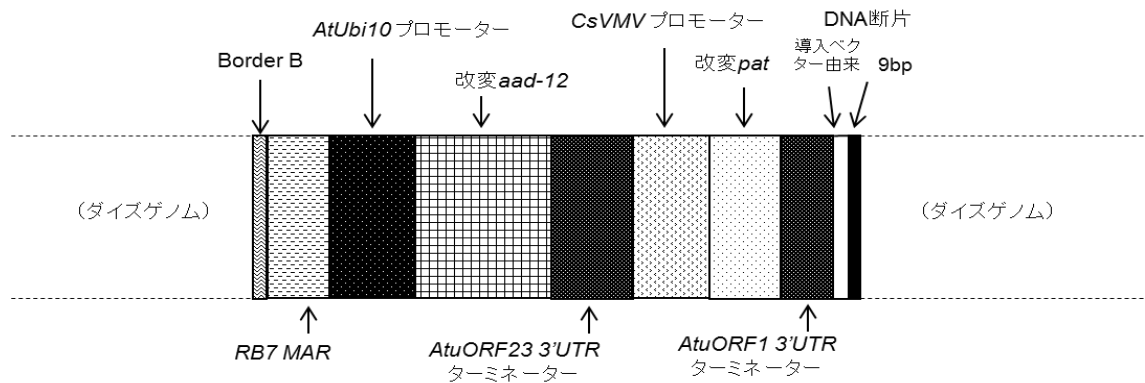


図1 ダイズ 68416 の挿入 DNA (模式図)

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

アリルオキシアルカノエート系除草剤 2,4-D を最大散布薬量で 3 回散布又は無散布で栽培したダイズ 68416 の葉、茎葉、根及び種子における改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析を行った。結果は表 2 のとおりである (参照 21)。

表 2 ダイズ 68416 における改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織	改変 AAD-12 タンパク質		PAT タンパク質	
	無散布	2,4-D 散布	無散布	2,4-D 散布
葉*	74.99	81.62	7.13	7.18
葉**	73.98	77.37	8.16	7.68
茎葉***	41.95	43.76	4.01	4.23
根***	18.60	16.87	1.79	1.90
種子****	22.92	20.19	2.66	2.57

* 5 葉期、**10~12 葉期、***着莢始期、****成熟~完熟期

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

日本人一人が一日あたりに摂取する「大豆・大豆加工品」の平均摂取量 54.0 g (参照 22) を全てダイズ 68416 に置き換えて計算すると、改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質の一人一日当たりの予想平均摂取量はそれぞれ 1.24 mg 及び 0.14 mg となり、一人一日当たりのタンパク質平均摂取量 67.8 g (参照 22) に占める割合は 1.8×10^{-5} 及び 2.0×10^{-6} 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 *aad-12* 遺伝子の供与体である *D. acidovorans* に関して、アレルギー誘発性の報告はない。また、改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* に関するアレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

AAD-12 タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。また、PAT タンパク質についてはこれまでに多くの評価が行われ、ヒトに対してアレルギーを誘発する可能性は極めて低いと結論されている（参照 23）。

(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

Pseudomonas fluorescens で発現させた改変 AAD-12 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結果、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 24）。

② 人工腸液に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-12 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 5 分以内に消化されることが確認された（参照 25）。

③ 加熱処理に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-12 タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するために、SDS-PAGE 分析、ELISA 分析及び酵素活性の測定を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では 50°C、70°C 及び 95°C、30 分の加熱処理で僅かな多量体の形成が見られた以外は変化がなかった。免疫反応性及び酵素活性は、50°C、30 分の加熱処理で失われることが確認された（参照 26）。

PAT タンパク質については、ダイズ 68416 で産生される PAT タンパク質と同一のアミノ酸配列である *Escherichia coli* 由来の PAT タンパク質を用いた試験において、人工胃液中及び人工腸液中で 30 秒以内に消化されることが明らかにされている（参照 27）。また、加熱処理については、90°C で 60 分間加熱しても分子量には変化がないが（参照 27）、50°C 10 分間の加熱処理により酵素活性が失われることが明らかにされている（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 AAD-12 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に、FARRP アレルゲンデータベース^h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。また、抗原決定基の有無を確認するために、FARRP アレルゲンデータベース^g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 29）。

PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの相同性がないことは、既に確認されている（参照 23）。

上記（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 AAD-12 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

ダイズ 68416 に挿入された改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の安定性を確認するために、3 世代のダイズ 68416 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 10）。

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 AAD-12 タンパク質

改変 AAD-12 タンパク質はアリルオキシアルカノエート系除草剤のうち、光学異性体のないもの及び S 体^oを特異的に分解することが報告されている。*in vitro* における改変 AAD-12 タンパク質の基質に対する活性を測定した結果、(R,S)-ジクロルプロップ、(S)-ジクロルプロップ及び 2,4-D に対して高い活性を示した。また、数種類のアリルオキシアルカノエート系除草剤を基質として用いて改変 AAD-12 タンパク質の反応速度の解析を行った結果、アルカノエート基（部位）にあるメチル基が重要であることが示唆された（参照 30）。

改変 AAD-12 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アリルオキシアルカノエート基を持つ化合物と構造及び生理機能が類似する化合物等が改変 AAD-12 タンパク質と反応するか否かについて検討を行った。コハク酸測定法による酵素活性の測定を行った結果、植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体で僅かな反応が見られた。そのため、反応が見られた基質が実際に酸化されているか確認するため、フーリエ変換質量分析 (FT/MS) による酸化物の測定を行った結果、インドール-3-酢酸及び桂皮酸の酸化

^h FARRP Allergen database Version11.

物が検出されたが、その反応速度は非常に遅いことが確認された（参照 31, 32）。また、桂皮酸を前駆物質とするイソフラボン類の分析の結果、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、統計学的有意差が認められた場合であっても文献値の範囲内であった。

以上のことから、改変 AAD-12 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る。

・ PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-グルホシネートを極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他の L-アミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない。また、PAT タンパク質は、L-アミノ酸が過剰に存在する場合においても、L-グルホシネートをアセチル化する活性に影響を受けることはない。したがって、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 23）。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で栽培されたダイズ 68416 の種子及び非組換えダイズの種子について、主要構成成分、ミネラル類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類、栄養阻害物質等の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた（参照 33）。

(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、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び粗繊維）について分析を行った結果、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、統計学的有意差が認められた場合であっても文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル類

ミネラル類 9 種類について分析を行った結果、8 種類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従来の商業品種の分析値の範囲内であった。なお、ナトリウムについては、ダイズ 68416 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(3) 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ダイズ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文献値の範囲内であった。

(4) 脂肪酸組成

脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、8 種類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文献値の範囲内であった。なお、14 種類の脂肪酸についてはダイズ 68416 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 13 種類について分析を行った結果、11 種類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従来の商業品種の分析値の範囲内であった。なお、2 種類のビタミンについては、ダイズ 68416 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(6) 栄養阻害物質等

フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、レクチン、トリプシンインヒビター及びイソフラボン類について分析を行った結果、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、統計学的有意差が認められた場合であっても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、米国食品医薬品局（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査のための申請が行われ、2011 年 11 月に安全性の確認が終了した。また、2009 年 12 月に米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請が行われた。

カナダにおいては、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が行われ、2012 年 10 月に安全性の確認が終了した。また、カナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料としての安全性審査の申請が行われ、2012 年 10 月に安全性の確認が終了した。

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、2011 年 11 月に安全性の確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ 68416 の栽培方法は、生育期の雑草防除にアリルオキシアルカノエート系除草剤を使用できる点を除いて、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 68416 の種子の製法及び管理方法は、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

「除草剤アリルオキシアルカノエート及びグルホシネート耐性ダイズ 68416 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. OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: Key food and feed nutrients and anti-nutrients. 2001
2. ILSI. ILSI Crop Composition Database. Version 3.0., 2006
3. Urisu A. Commonly known allergenic sources (IgE-mediated and non IgE-mediated food allergens as well as environmental allergens). Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy, 2001, FAO/WHO
4. Cordle C. T. Soy protein allergy: Incidence and relative severity. Orlando, FL, 2003-9-21/24, American Society for Nutritional Sciences. The Journal of Nutrition, 2004, 1213-1219
5. Horowitz H., Gilroy S., Feinstein S., Gilardi G. Endocarditis associated with Comamonas acidovorans. Journal of Clinical Microbiology 1990, 28(1), 143-145.
6. Brinser J. H., Torczynski E. Unusual Pseudomonas corneal ulcers. American Journal of Ophthalmology. 1977, 84(4), 462-466.
7. Wright T. R., Lira J. M., Walsh T. A., Melro D. J., Jayakumar P., Lin G. Novel herbicide resistance genes. WO 2007/053482 A2. 2007-05-10.
8. Song P. Sequences similarity assessment of AAD-12 protein to known toxins by bioinformatics analysis. (社内報告書)
9. Song P. Sequence similarity assessment of PAT protein to known toxins by bioinformatics analysis. (社内報告書)
10. Song P., Cruse J., Thomas A. Molecular characterization of AAD-12 soybean event DAS-68416-4. (社内報告書)
11. Norris S. R., Meyer S. E., Callis J. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. Plant Molecular Biology. 1993, 21(5), 895-906.

12. Verdaguer B., de Kochko A., Beachy R. N., Fauquet C. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31(6), 1129-1139.
13. Barker R. F., Idler. K. B., Thompson D.V., Kemp J.D. Nucleotide sequences of the T-DNA region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), 335-350.
14. Hall G. JR., Allen G. C., Loer D. S., Thompson W. F., Spiker S. Nuclear scaffold and scaffolded-attachment regions in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991, 88(20), 9320-9324.
15. Allen G. C., Spiker S., Thompson W. F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), 361-376.
16. Halweg C., Thompson W. F., Spiker S. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell*. 2005, 17(2), 418-429.
17. Zhuang, M. Supplemental molecular characterization of DAS-68416-4 soybean. (社内報告書)
18. Poorbaugh J., Zhou N., Mo J., Cloning and characterization of the DNA sequence for the insert and flanking border regions of AAD-12 soybean event DAS-68416-4. (社内報告書)
19. Song P. Bioinformatics analysis of the insert and its flanking border sequences in soybean event DAS-68416-4. (社内報告書)
20. Gao, Z. Bioinformatics analysis of the insert and its flanking border sequences in DAS-68416-4 soybean. (社内報告書)
21. Phillips A. M., Smith-Drake J. K. AAD-12 and PAT Protein expression in a transformed soybean cultivar containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12)-Event DAS-68416-4. (社内報告書)
22. 厚生労働省 “第1部 栄養素等摂取状況調査の結果” 平成21年国民健康・栄養調査報告。2011
23. OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. 1999, 26p.
24. Embrey S. K., Schafer B. W. *In vitro* simulated gastric fluid digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12). (社内報告書)
25. Embrey S. K., Cruse J. K., Korjagin V. A. *In vitro* simulated intestinal fluid digestibility study of recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12). (社内報告書)
26. Schafer B.W., Embrey S. K. Characterization of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12) protein derived from transgenic soybean event DAS-68416-4. (社内報告書)

27. Hérouet C., Esdaile D J., Mallyon B.A., Debruyne E., Schulz A., Currier T., Hendrickx K., Klis R-J. van der, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2005, 41(2), p.134-149
28. Wehrmann A., Vliet A. V., Opsomer C., Botterman J., Schulz A., The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14(10), p. 1274-1278
29. Song, P. Sequences similarity assessment of AAD-12 protein to know allergens by bioinformatics analysis. (社内報告書)
30. Cicchillo R. M. Substrate scope and kinetic analyses of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12). (社内報告書)
31. Wright T. R., Shan G., Walsh T. A., Lira J. M., Cui C., Song P., Zhuang M., Arnold N. L., Lin G., Yau K., Russell S. M., Cicchillo R. M., Peterson M. A., Simpson D. M., Zhou N., Ponsamuel J., Zhang Z. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107(47), 20240-20245.
32. Cicchillo R. M., Godbey J., Wright T. Substrate specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12). (社内報告書)
33. Phillips A. M., Lepping M. D. Nutrient composition of a transformed soybean cultivar containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (ADD-12)- event DAS-68416-4. (社内報告書)