

食品安全委員会遺伝子組換え食品専門調査会

第 89 回 会 合 議 事 録

1. 日時 平成 23 年 3 月 7 日 (月) 14:00～16:52

2. 場所 食品安全委員会中会議室

3. 議事

(1) 食品健康影響評価について意見を求められた遺伝子組換え食品等の安全性評価について

- ・アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統 (食品・飼料)
- ・pCo1 株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ・除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統 (食品・飼料)
- ・除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統 (食品・飼料)

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、五十君専門委員、石見専門委員、小関専門委員、鎌田専門委員、
橘田専門委員、児玉専門委員、澁谷専門委員、手島専門委員、中島専門委員、
飯専門委員、山崎専門委員、和久井専門委員

(委員)

小泉委員長、熊谷委員、長尾委員

(事務局)

栗本事務局長、中島事務局次長、坂本評価課長、北村課長補佐、松尾係長、
種池技術参与

5. 配布資料

資料

- ①アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統 (食品)
- ②アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統 (飼料)
- ③pCo1 株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ④除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統 (食品)
- ⑤除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統 (飼料)

⑥除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統（食品）

⑦除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統（飼料）

参考資料 1 安全性評価に係る指摘事項

・アрилオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統（食品）

参考資料 2 遺伝子組換え食品等評価書

・*Streptomyces violaceorubar* (pNAG) 株を利用して生産されたキチナーゼ

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから「遺伝子組換え食品等専門調査会（第 89 回）」を開催いたします。

本調査会は議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づきまして、非公開で行います。

本日は所用により、海老澤専門委員が御欠席ということですが。

本日の議題でありますけれども、継続審議品目でありますアрилオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統、新規の品目でありますプロテアーゼ、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統、同じく T304-40 系統についての審議となります。

それでは、お手元の資料の御確認をお願いしたいと思います。事務局からよろしく願います。

○北村課長補佐 配付資料の確認をさせていただきます前に、事務局から御報告がございます。

1 月の専門調査会で御報告させていただきましたけれども、食品安全委員会の見上委員が退任されまして、後任といたしまして、1 月 7 日付けで熊谷委員が就任されましたので、御紹介いたします。

○熊谷委員 熊谷でございます。よろしくお願いいたします。

○北村課長補佐 また、1 月 11 日付けで次長が大谷から中島となりましたので、御紹介いたします。

○中島事務局次長 中島でございます。よろしくお願いいたします。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして、配付資料の確認をさせていただきます。配付資料は議事次第、座席表、専門委員名簿。

資料「食品健康影響評価に関する資料」。

参考資料 1 「安全性評価に係る指摘事項」。

参考資料 2 「遺伝子組換え食品等評価書」。

なお、これら以外の資料につきましては、ファイルにとじまして、委員の皆様の机の上に置かせていただいております。本ファイルにつきましては、調査会終了後に回収させていただきます、次回また配付いたします。不足等がございましたら、事務局までお知らせくだ

さい。

○澤田座長 よろしいでしょうか。それでは、議題（１）の審議に入らせていただきたいと思います。まずトウモロコシ 40278 系統についてであります。この品目は昨年 7 月の専門調査会におきまして審議を行い、指摘事項を出したものであります。指摘事項に対する回答が出てまいりましたので、事務局から御説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、説明させていただきます。お手元に黄色いファイルの「アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性トウモロコシ 40278 系統の安全性評価に係る指摘事項に対する回答書」という資料をお手元に御用意をお願いします。説明は 1 ページから順を追ってさせていただきます。

指摘事項①「アリルオキシアルカノエート系除草剤の除草剤としての作用機作について回答すること」という指摘でございます。

これに対する回答としまして、アリルオキシアルカノエート系除草剤のうち、販売する際に対象とする除草剤は、2,4-D 及びキザロホップです。また、改変 AAD-1 タンパク質が活性を示す除草剤のうち、2,4-D 以外のものにつきまして、本系統の栽培が想定されている米国においては登録がある除草剤はなく、カナダにおいては、メコプロップと MCPA の 2 種類があるということでございます。

合成オーキシシンである 2,4-D、メコプロップ、MCPA は、植物ホルモン作用をかく乱することによって広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示すということでございます。

一方、キザロホップにつきましては、脂肪酸生合成の初期段階であるアセチル CoA からマロニル CoA を生成する反応を触媒する酵素でありますアセチル CoA カルボキシラーゼを阻害してマロニル CoA 生成・脂肪酸生合成を阻害し、分裂組織を破壊することによってイネ科雑草に除草活性を示すということで、以下の図 1 にキザロホップの作用機作が記載されております。

指摘事項②「本品種に対して使用される主要なアリルオキシアルカノエート系除草剤について、本品種における残留量、その代謝物の残留量及び安全性について検討の上、回答すること」という指摘でございます。

これに対する回答といたしまして、指摘事項①に出てまいりました 2,4-D、キザロホップ、メコプロップ、MCPA について検討されております。

2 ページ。まず 2,4-D について検討されております。¹⁴C で標識をしました 2,4-D ジメチルアミンを最大推奨散布量である記載の濃度で 3 回散布いたしまして、2,4-D ジメチルアミンの代謝物について検討されております。表 1 に残留放射能から算出した 2,4-D 換算残留量が示されております。

穀粒の 100 倍程度の残留放射能が検出されました青刈りトウモロコシと収穫後茎葉に含まれる代謝産物について分析を行いました結果、2,4-D、2,4-DCP 及び 2,4-DCP のグルコース結合体は検出されております。また、ペクチンやリグニンからも放射能が検出され

ております。更に、穀粒から抽出したスターチからも放射能が検出されたことから、2, 4-D ジメチルアミンは図 2 のように代謝されると考えられたということです。

続きまして、図 2 の下の文章に行きます。次に、米国及びカナダの圃場におきまして、2, 4-D ジメチルアミンを散布いたしまして、2, 4-D 及び 2, 4-DCP の穀粒中における残留量について調査が行われております。その結果、2, 4-D につきましては、1 か所の圃場に 1 サンプルで検出されました。また、別の圃場の 2 サンプルにつきましては定量限界値未満でありまして、そのほかの 46 サンプルにつきましては、すべて検出限界値未満であったということでございます。また、2, 4-DCP につきましては、1 か所の圃場に 1 サンプルで定量限界値未満でございましたが、ほかのサンプルにつきましては、すべて検出限界値未満であったということでございます。

このように、2, 4-D の代謝産物である 2, 4-DCP は穀粒に残留しないことから、安全性の懸念はないものと考えられるという結論になっております。

3 ページ。2 つ目のキザロホップでございます。キザロホップにつきましても同様に、¹⁴C 標識いたしましたキザロホップ-P-エチルを最大推奨散布薬量である記載の濃度で散布を行いまして、キザロホップ-P-エチル及び代謝産物総残留量について検討がされております。表 2 に残留放射能から算出されたキザロホップ換算残留量が示されております。

残留放射能が検出された青刈りトウモロコシと収穫後茎葉に含まれる代謝産物の分析を行いました結果、キザロホップ-P-エチル及びキザロホップはわずかながら検出されました。また、キザロホップフェノールについては検出されなかったということでございます。また、先ほどと同様にペクチン、リグニン、セルロース等からも放射能は検出されたことから、キザロホップ-P-エチルは図 3 のように代謝されると考えられたという回答になっております。

次に、米国及びカナダの圃場におきまして、キザロホップを散布いたしまして、キザロホップ-P-エチル及びキザロホップの穀粒中の残留量が調査されております。その結果、キザロホップ-P-エチルにつきましては、検出されておらず、また、キザロホップにつきましては 1 か所の圃場の 1 サンプルで定量限界値未満であったものの、ほかのサンプルにつきましては、すべて検出限界値未満であったということでございます。

このようにキザロホップの代謝産物であるキザロホップフェノールは、穀粒中に残留しないことから、安全性の懸念はないものと考えられるという結論になってございます。

4 ページ。メコプロップ、MCPA について検討されております。このメコプロップ、MCPA につきましても、下の図 4 に示すようにメコプロップ、MCPA が改変 AAD-1 タンパク質が作用することによって、これらの除草剤に対して耐性を持つということになるということでございます。

図 4 の下の文章にまいりまして、メコプロップと MCPA の ADI を設定するための無毒性量は、それぞれ 4 mg/kg 体重/日と 4.4 mg/kg 体重/日であること、一方、それぞれの代謝産物であります 4-クロロ-2-メチルフェノールの ADI を設定するための無毒性量につき

ましては、200 mg/kg 体重/日であることから、その毒性量はメコプロップや MCPA の約 50 分の 1 となり、この代謝産物の安全性の懸念がないものと考えられるという記載になっております。

なお以下に、メコプロップと MCPA の使用実績が参考資料として記載されています。

5 ページ。指摘事項③は、本システムに導入した遺伝子の供与体以外に *aad-1* 遺伝子が含まれている細菌、植物等に関する情報について回答することという指摘になっております。

それに対する回答といたしまして、細菌では、グラム陰性細菌の *Delftia acidovorans* MC1 株が *aad-1* 遺伝子と比較して 1 塩基のみ異なる遺伝子を持つことが報告されています。また、同じくグラム陰性細菌の記載の株につきましても、同じ配列の遺伝子を持つことが報告されているということでございます。

指摘事項④は、本システムの T₁ 世代の個体数を回答すること。なお、個体数が 1 でない場合については、安全性評価を行う上で必要な試験が適切な世代で実施されていないことなることから、安全性評価を求める世代について再検討を行い、申請資料を修正することという指摘になっております。

これに対する回答といたしましては、T₁ 世代は 1 個体ですという回答となっております。

指摘事項⑤は、本システムで発現するタンパク質の代謝系への影響及び基質となり得る化合物の代謝物の安全性を考察するに当たり、検討された化合物を選択した理由について、詳細に回答することという指摘になっております。

それに対する回答といたしましては、アリルオキシアルカノエート基を持つ化合物と構造的、生理機能的に似通った植物内在性の化合物が、改変 ADD-1 タンパク質の基質となり得る可能性について検討をしたということでございます。

合成オーキシシンである 2,4-D は植物ホルモンとしての作用を持つため、代表的な天然植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸を選択したということでございます。

改変 AAD-1 タンパク質と約 30% のアミノ酸相同性を持つ TfdA タンパク質は、2,4-D を改変 AAD-1 タンパク質と同様に分解します。この TfdA タンパク質は、植物内在性のフェニルプロパノイド中間体であり、2,4-D と分子構造が似通っている桂皮酸の酵素活性を示すことから、桂皮酸が選択されたということでございます。また、植物内在性のリグニン中間体であるクマル酸とシナピン酸につきましても、桂皮酸と分子構造が似ていることから、これら 2 つの化合物についても併せて検討したということでございます。

アミノ酸につきましても、植物代謝経路において重要な役割を果たしているため、選択したというような理由になっております。

指摘事項⑥は、「7 宿主との差異に関する事項」におきまして、非組換えトウモロコシと比較してタンパク質が有意に増加した理由を回答することという指摘でございます。

これに対する回答といたしましては、トウモロコシ 40278 系統は、非組換えトウモロコシと比較してタンパク質が有意に増加していますが、その差は大きくなく、文献値の範囲

内にあるということでございます。各試験地ごとに本系統と非組換えトウモロコシのタンパク質含有量が比較されておりまして、その結果が6ページの表5に記載されております。

表5を見ていただきますと、試験地によって有意差が認められていたり、認められていなかったり、一定の傾向がないことから、有意に増加した理由といたしましては、生物学的な振れによるものだと考えられるという記載になっております。

以下、修正事項ということで、6～9ページに①～⑩が指摘されておりまして、これら指摘に基づき修正されています。

説明は以上でございます。

○澤田座長 それでは、指摘事項に対する回答につきまして、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思っております。指摘事項①のアリルオキシアルカノエート系除草剤の除草剤としての作用機作について。これは橘田先生と中島先生から御指摘があったように思いますが、いかがでしょうか。

○橘田専門委員 作用機作については説明されているので、このとおりでよろしいかと思っておりますけれども、一番最初のところはわかりにくい文章になっているので、この辺をもう少し詳しく説明していただきたいと思っています。販売する際に対象とする除草剤は2,4-Dとキザロホップですと書いてありますが、登録は2,4-Dしかなくて、キザロホップについては特に言及されていなくて、その辺りがどうなっているのか見えておりません。メコプロップとMCPAについては対象としているのか、していないのか。その辺もわかりづらいので、明確にしていただければと思います。

○澤田座長 中島先生、どうぞ。

○中島専門委員 作用機作については、説明されているとおりでよろしいと思っております。ほぼ同じようなことですが、実際に栽培されるときにキザロホップが想定されないからということなのかもしれないけれども、これが実際にAAD-1で分解されたときに出てくる代謝産物が安全なのかどうかという一番聞きたいことの答えが出ていません。皆が気にしているのだと思っておりますけれども、最初の文章のところで想定されないからいいのかと、彼らはそういう論理なのかなという気もしますが、そこが非常に気になるところです。

○澤田座長 どうぞ。

○鎌田専門委員 この回答の真ん中で、作用機作の合成オーキシンの2,4-Dでオーキシン活性を示して、植物ホルモン作用をかく乱すると。後段に、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすという文言が入ってしまっていますが、これはトウモロコシですね。では、どうしてこんなものを開発する必要があったのか。本文の中に入ってくる開発の目的と全然合わなくなってしまう記載になってしまって、だったら最初から組換えなくたって、耐性があるのではないかという説明になります。本当は多分違うので、本文を直すときに、そこをきちんと説明していただきたい。なぜトウモロコシで組換えを使って、これを開発する必要があったのかということが必要だと思っております。

○澤田座長 回答の修正と要旨の修正の問題があるかと思っておりますけれども、先ほどの橘田

先生の御指摘も要旨は直っていないですね。御指摘いただきましたキザロホップですが、これは実際にまくのはキザロホップではなくて、その前駆体ですね。私はキザロホップが更にこの酵素で代謝物になるという理解ですけれども、それでよろしいですか。

○中島専門委員 私もそういう理解です。

○澤田座長 そうしますと、その代謝物の毒性が問題になるということですね。

○中島専門委員 少し先走りますけれども、4 ページにあるメコプロップと MCPA については分解産物の 4-クロロ-2-メチルフェノールの安全性は大丈夫という話で、これはこれで納得いくのですけれども、キザロホップが分解されると、これよりもっと複雑な化合物が出てきて、見るからに危険そうな気がするのですけれども、これは安全性が担保されていないし、これで枯れないということは、これが当然くっ付いたまま流通することなので、枯れてしまえば問題ないのですけれども、その辺のところ非常に気になります。

○澤田座長 未同定微量成分と書いてありますけれども。

○中島専門委員 キザロホップフェノールというものにまずなると思うのですけれども、キザロホップフェノールが大丈夫なのか。キザロホップフェノールが更に代謝していく途中でできそうなものが大丈夫なのか。心配しているのはその辺です。

○澤田座長 彼らの記載では、検出されませんでしたと書いてありますが。

○中島専門委員 皆さんが納得されるなら、私はいいです。今までは問題がなかったと思いますけれども、これからは当然、それは農薬として使って、キザロホップフェノールが今までとはけた違いに出てくるわけですから、私はとても心配です。

○澤田座長 そのキザロホップフェノールの毒性に関する情報を出していただく。検出されないとありますけれども、定量的にどのくらいきちんとやっているのかを一応追加で資料を出していただくということにしたいと思います。

○中島専門委員 ついでにキザロホップフェノールが分解される途中にも、それなりの代謝産物が出ると思うので、それについてもこの際と私は思います。

○澤田座長 それでは、追加でお願いします。①に関しましては、ほかによろしいでしょうか。

○小関専門委員 細かいことで恐縮ですけれども、ペクチンとかリグニンとか残渣から放射能が検出されたということですが、ここにある残留量は残渣分も含めているのか、それとも有機溶媒で抽出されたものだけなのかということを書いてもらわないと、例えば残渣であっても、ヒトも場合によっては食べるわけですから、消化して出てくるとすると、人工的な残留量はこれを上回る可能性があると思うので、そここのところの定量と記載をしっかりとっていただきたいと思います。

○澤田座長 それも含めてお願いしたいと思います。

それでは、②の指摘事項で、除草剤及びその代謝物の残留量、安全性について。①と関連しますけれども、これは小関先生と鎌田先生から御指摘をいただいておりますが、いか

がでしょうか。

○鎌田専門委員 さっきのものに関わっていることも多いですが、1つは一般的に2,4-Dは2,4-DCPで分解される系とは別に、アミノ酸などとの複合体を形成することはよく知られていて、広葉植物だと多分80%くらいがそちらに行くので、イネ科も知られているので、本当にこの数値なのかというのはすごく気になります。それから、過去のデータとして、2,4-Dが細胞壁に結合してしまいます。それもよく知られていて、それは多分溶出されてこなくなってしまうので、さっきの小関先生ではないけれども、本当に残留しているのがどれだけなのかは、実は何かで溶出してしまうと見えない部分が非常にたくさんあるので、そこら辺も含めて、きちんと残留量を出していただいた方がいいのかなと思います。それが1点です。

これも①と関わるのですが、ここでは2,4-Dとキザロホップを中心にやられているのですが、売る側は確かにそれを想定しているけれども、後ろの方に基質がいっぱいあることが、除草剤として使える可能性が山のように記載があるわけで、これをどう扱うのか。売る側と使う側は必ずしもイコールではないことが想定される場合に、その代謝物はどうするのかということは議論をしていただいた方がいいかなと思います。

○澤田座長 小関先生、追加で何かございますか。

○小関専門委員 私の先ほどの発言は、今の鎌田先生の②の部分と全く同じです。

○澤田座長 ほかの先生方から御意見はございますか。

○児玉専門委員 先ほど中島先生もおっしゃられましたけれども、分解されていく途中で主要骨格にキノキサリン環というのがありますが、キノキサリン環はかなり生理活性を持つ化合物の基質としてよく使われるとなっていますので、途中でそういったものがモディファイされて、そういった生理活性を持つような物質に変換されることがあるのかなのかは、調べていただきたいと思います。

○澤田座長 ほかにありますでしょうか。それでは、①に関係する追加の情報を出していただくという点と、もう一つ、ここでは想定している農薬以外のものが使われたときもあり得るということで、それをどういうふうに考えたらいいかという懸念をいただきましたけれども、これに関しまして、先生方から御意見はいかがでしょうか。

○小関専門委員 1点よろしいでしょうか。この審議のときに私はお休みをされていて、意見書ということで出したのですけれども、ここではピュアなものを使っていますね。だけれども、除草剤でいったときには、100%ピュアなものをまくかということがあります。ベトナム戦争で米軍がまいて大変なことになったということは有名な話ですから、そういう意味で言った場合に活性を示す除草剤というものが、要するに今回使われているものの中にこれらが残留物として入ってくるのか来ないのか。来るのだとしたら、その安全性は確実に押さえておいていただかないとまずいだらうとは思いますが、その点が一番懸念される場所だと思います。

○澤田座長 懸念はいろいろあるかと思いますが、実際にどこまで検討すればいい

かという話になると、ちょっと難しい問題があります。

○小関専門委員 ですから、私が申し上げたのは、添付資料5で、活性を示す除草剤とありますね。今回は一部しか見ていないわけですがけれども、合成の際に副生成物としてできてくる可能性も、私は有機化学は詳しくないのでわかりませんが、少なくともここにリストアップされたものについて、鎌田先生がおっしゃることと同じような意味で、代謝産物とその安全性は回答していただきたいと思います。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。添付資料5で30近くありますけれども、エーテルの部分が切れて、切れた残りのものに関する毒性学的な情報をとりあえず出すということによろしいでしょうか。実際に一個一個やり出すと、かなり大変なことになるかと思えます。

○小関専門委員 最低限、そのところは押さえておいていただきたいということです。

○澤田座長 実際に国際的に使われていない農薬も多分あると思いますので、どういう基準で選択すればいいかということになりますけれども、世界中で使われる可能性がある。

○小関専門委員 ですから、問題は世界中で使われるという問題もそうですけれども、まぐとときにこれらが入ってくる可能性があるということ想定してほしいということで、本当に再結晶の再結晶の繰り返した2,4-Dなりをおまきになるのだったら、やってください。私はもう薬品として買った2,4-Dは自分で精製しています。売っているものは、もともとの色は茶色です。ちゃんと再結晶すれば透明になる。ですから、その辺のところを含めて、最大限でも添付資料5の部分については、見ておいていただきたいと思います。

○澤田座長 一応できる限りそろえてですね。

○飯専門委員 この案件に直接というのではなく、将来的に気になることでどう考えるのかという意味での質問なのですけれども、農薬は次々と開発されてきて、この系統の農薬はまた新たにつくられる可能性が十分あると思いますが、そのときにその農薬がこの酵素の基質になるかどうかということは、どの段階で判断していくことになるのでしょうか。

○小関専門委員 開発段階で新たな科学的知見の一つとして出てきたらやるとしか言いようがないと思います。そうでないと無限大の可能性が出てきてしまうと思います。

○澁谷専門委員 この残留をどういう立場で見るとかは、最初のとくに議論をしましたね。大変難しく、農薬としてどうかというのは、農薬の方でやらないと結局はだめなので、新しい農薬を一個一個、そういう目で見られるはずですね。飯専門委員が言われたように、これは酵素としては同じようなものだったら切っていくと思うので、将来は新しい後ろの方を変えたものが出てくると、それも切れることになります。そういうことも含めて、全部を組換え体という窓口で評価することは多分できないので、その残留農薬についても一方では除草剤耐性をしているから、普通の植物ではない残留の問題が起こるから、チェックしていこうというスタンスなのだけれども、同時に代謝物のすべての毒性までをカバーしたことを、この組換えの変化で全部カバーすることは恐らく非常に難しいです。やはりある意味で限界であるところ、代表的な事例で見るとはならないのでしょうか。

○澤田座長 代表的な事例が今、一番悩んでいるところですがけれども、いただいた意見を向こうにお伝えしまして、できる限りの回答をいただきたいと思います。

○鎌田専門委員 今の議論は結局、ここの委員会で議論できることに限界があるのには目に見えていて、逆に我々が知りたいのは、農薬の審査の中で本当は現在そこまでやっていたらいいのならば、何も気にすることがなくて、我々はすべてが片付くのですが、現在そうはっていない部分で議論をされているので、本当の解決策が出てこないということになるのだろうと思います。

将来にわたってと言われると、それは何とも言えないけれども、基本的には現在のことしかあり得ないので、現在少なくとも世界的にもある程度の量が使われているものはカバーしておいてもらわないと、現時点で保証できないことになるので、その可能性のあるもの全部とは言わないけれども、少なくとも世界的に見て、ある程度の量で使われているものについては、会社が売るときに幾ら条件を付けても、それで食品として流通するかどうかは保証されていないので、そこだけ担保すればいいのではないかと思います。

○澤田座長 結論のようなことをいただきましたので、大体その辺りで回答していただければと思います。ほかによろしいでしょうか。

○山崎専門委員 小関先生の質問に関連して、具体的にどんな資料を出してもらうかですが、もし可能であれば、この GM 作物を開発した会社が使いたいと想定している農薬に関してでいいので、その市販農薬の成分分析表を出していただいた方がいいと思います。

○澤田座長 現在はここにリストしたものだけしか考えていないわけですね。将来的にもっと広げるつもりがあるのかという御質問ですか。

○山崎専門委員 現在想定しているものだけでいいので、実際に市販している製品の純度とか不純物がわかるような成績書が多分あると思うので、それを参考資料として出してもらった方がいいです。将来使うかもしれないというものに関してはわからないので、それは無理だと思います。

○澤田座長 不純物の情報があれば、出していただいた方がいいかと思います。それから、米国とカナダの情報しか出していただけていないので、世界的にどこの国で何が使われているかというリストがもしあれば。

それでは、次の指摘事項③に参りたいと思います。これは *aad-1* 遺伝子を持つ生物に関する情報について、山崎先生の御指摘です。

○山崎専門委員 回答としてはこれでいいのですが、これを見てどう考えるかです。この微生物が自然界にどのくらい存在しているかはよくわからないのですが、特別なところから見つけましたと書いてあるので、この遺伝子を持つ生物は自然界に広く存在するものではないだろうと考えていいのかなという気がします。ここは微生物関係の専門家の先生の御意見もいただければ、私としてはありがたいです。

○澤田座長 ほかに何かコメントはありますか。これはよく調べれば、まだ出てくる可能性はあると思いますけれども、少なくとも植物にはないということによろしいで

すね。

では、指摘事項④で T₁ 世代の個体数で、これは 1 個体ということです。これは鎌田先生、小関先生、飯先生ですけれども、よろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 これですら問題ありません。

○澤田座長 それでは、次の指摘事項⑤。これは代謝系への影響を検討するために用いた化合物を選んだ根拠ということで、飯先生。

○飯専門委員 回答に書いてあることは、実は前から提出されていた資料の英語の部分を日本語に訳しただけということとして、新しい知見が書かれている感じはしないのですけれども、そういう意味では指摘の意図が伝わっていないのではないかとこのところがあります。

先ほどの①と②もそうですが、ここでの回答は要旨の方にほとんど反映して書かれていないところがあって、そちらの場合もここでの回答と同時に、要旨に書いてほしいという気持ちが皆さんにあったのではないかと思います。もう一つは、議事録の前後の議論も踏まえて回答していただけていないのではないかとこのところを非常に強く受けるところがあります。

指摘の際に気にしたことは、この AAD-1 タンパクは恐らく初めて上がってきたタイプのものなのだろうということがあって、それが酵素なので本当に何をくわえ込むのだろうかという、気持ち悪さといいますか、そこら辺が残ってしまっていて、要旨の 24 ページの 6 の 1 段落目ですが、ここにアリルオキシアルカノエート基を持つもののうち、こういう化合物に対して、こういう反応を触媒する酵素であると断定して書いてあるのですけれども、それに対する引用がしっかりとあるわけではなくて、本当にこの反応だけを触媒するのでしょうかということの確認をまずしたかった。それから、このタンパク質を取ってきているのが、この回答の真ん中辺りになりますけれども、TfdA タンパク質の相同性に基づいているようですが、相同性が 30% であって、一方その TfdA タンパク質は別のものも基質にしている。

そういう情報しかないところで、AAD-1 は本当にここの除草剤として使っているものだけを基質にすると断定して考えていいのですかというのが一つ大きな疑問として持っていたことで、こういうものを調べたという意味での酵素学的なものであるとか、酵素タンパク質としての生化学的な背景について、しっかり説明してくださいというつもりで質問をしたのですが、実際の回答は、似ているから調べてみましたという、前から提出されていたもの以上のものが出てきていない。要旨の方も元々あった引用文献が社内報告書に変わっただけで、実質的には何も新たな情報が付け加わっていないということがあります。

指摘の最後のところで、もし基質となり得る化合物がある場合、その安全性についても回答して下さい、という部分に関しては、あり得るのかどうか結局のところは回答されていない。元に戻ると、最初の除草剤がどう代謝されるのか、反応するのかということが、ある意味、酵素の基質特異性を知るための知見にもなるかというところがあったのです

が、そこからも、新たな知見は得られません。例えば、これは基質になりませんというものははっきり出してもらえれば、構造的にこういう骨格を持っているものだったら基質になるのでしょうかということがわかってきて、それによって初めて植物の中での基質となるものの可能性が見えてくるのかなと思っています。もしそれがどうしてもできないのであれば、やはり動物に与えて、安全性の評価をしてもらうしかないような気もしているところです。

○澤田座長 少しうろ覚えですけれども、特許の資料がついておりまして、そこでかなり物を並べて、一応、反応性の数字が出ていたように思います。

○飯専門委員 前に質問をしたときには、特許の公開情報も見た上で、ある程度それを根拠にすれば、もうちょっとしっかりした基礎データ込みで回答できるのかなと思っていたのですが、全く対応してきていないです。

○澤田座長 あのデータを使えば納得できる説明になりますか。

○飯専門委員 ポジティブのデータしか特許には出していないので、恐らくネガティブなデータも込みでやっているのではないかと思います。基質にならないものが特許の実施例には入ってきていないと思います。そういうのを併せれば、この酵素がどういうタイプの酵素なのかということをもっと正確に説明できるのではないかという気持ちを持って、こういう指摘をしました。

○澤田座長 この酵素の基質特異性について、もうちょっと論理的かつ包括的な情報を出してもらおうと。

○飯専門委員 ほかの除草剤耐性でも、酵素に関しては、過去に形質転換体の評価に当たっては、かなりぎちぎちにやっけてきているのではないかと思います。それを考えると、初めての場合は慎重になった方がいいかという気持ちがあります。

○澤田座長 ほかによろしいでしょうか。

それでは、指摘事項⑥です。これはタンパク質が統計学的に有意に増加した理由でありまして、石見先生の御指摘です。

○石見専門委員 回答では、このタンパク質が有意に増加している理由として、生物学的な振れによるものと考えられますということで、このばらつきが地域によってかなり違うということで、代謝系がどのように変化をして、このような有意差が出たかというところまでは、回答はしていただけなくて、それもなかなかメカニズムまでつかむのは大変かなということで、ばらつきのうちの一つということで納得したいと思います。

修正案の方で8ページです。日本人の一日一人当たりのトウモロコシ加工品の摂取量が0.5 gということでそんなに多くなくて、日本人の摂取しているタンパク質に対する割合は、増加分はほとんど影響しないということなので、了解したいと思います。

○澤田座長 それでは、事務局的な修正事項がその後にありますけれども、この修正にしまして、何かコメントがあればお願いしたいと思います。

○飯専門委員 1つよろしいですか。修正の③のコピー数ですが、回答の1行弱の部分だ

けが加えられているだけで終わりとなっています。全体についてはほとんど手を入れているということがあるのですけれども、もともと要旨の書き方を問題にしたのは確かですけれども、ここで書かれているロジックだとコピー数が1という結論は恐らく出し切ることはできないのではないかとということがあって、この書き方ではどうなのだろうということとして、回答では検討したという文が加わっているだけで、コピー数が1であることが確認されたということをも文として加えただけでOKとは、簡単には言いづらいというのが正直なところであります。

サザンをたくさんやっていて、そのパターンを見て1だということは、原理的にはできると思いますが、実際のデータを見ますと、例えば添付資料2が生データの一つにあたるのですけれども、その最初の、添付資料2の5ページのパネルA、Bとありますが、それをざっと眺めただけで分かるかと思うのですが、ここで量のマーカーがこれらのパネルのレーンの2番ですが、レーン2のバンドとほかのレーンのバンドの濃さを見比べると、パネルAではマーカーの方が濃く、パネルBではマーカーの方が薄いです。こういうレベルの実験結果しか出てきていないということがありまして、パターン全体を平均すると1なのかかなとなるかもしれませんが、こういうことでいいのかなというところがあって、もうちょっとしっかりと説明してくださいという気持ちがありました。

あと、これはウイスキー法で入れているということですが、ディレクトジーントランスファーの方法なので、トランスジーンが入った時に染色体がどんなリアレンジメントが起きるかは簡単には想像できないこともあって、例えば、一旦入った後に、回りの配列込みでどこかに転座することも無いわけではないと思うので、そうするとサザンだけでコピー数を言い切るためには、確信の持てるきれいなデータを提出して貰いたいというところがあります。

一方で、コピー数が1だろうが2だろうが、安全性に関しては特に問題が生じるわけではないのですけれども、1なら1なりの出し方、今だったら定量PCRを1回やれば、それで終わり、というところがあるわけなので、もう少し理屈を考えた上で修文していただきたいというところです。

○澤田座長 定量PCRをやるのが一番早いかもしれません。

○飯専門委員 前の指摘にまた戻ってしまうのですけれども、T₁の世代でしっかり見ているかといったところに実は問題がさかのぼるところがなくはないので、本当はそこで定量PCRを1回やっておいてくれれば、一番いいと思います。

○澤田座長 ほかに追加でコメントはございませんでしょうか。手島先生、どうぞ。

○手島専門委員 ⑦で細かいところですが、加熱処理をするということで、前回までは加熱した後のウェスタンだけ、SDS-PAGEだけだったのが、ELISAと酵素活性のデータを入れたということで、そういう意味では修正されているのですけれども、免疫反応性の方もタンパク質の酵素活性の方も50℃、70℃、95℃で30分をやっていますが、95℃で少し活性が残っているのは不思議な感じがします。これはばらつきの範囲なのかもしれないですが、

n数とかも書かれていないので、実験のばらつきも含めてコメントしていただいた方がよろしいかと思いました。

○澤田座長 一番低いはずのところはちょっと上がっていますね。

ほかによろしいでしょうか。それでは、いただいた回答で不十分なところが多々あったようでありまして、ただいまいただきました御意見、御指摘等をまとめまして、先生方に再度御確認をいただいた上で、厚生労働省を通じて申請者に対して指摘を出したいと思えます。

それでは、次はプロテアーゼに移りたいと思います。この添加物は安全性評価基準の対象とならない、いわゆるナチュラルオカレンスに該当するというものであります。したがって、この添加物が安全性評価基準の対象となるか否かについて確認をいただきまして、もし対象とならない場合には、次の評価書（案）の審議に移りたいと思います。対象となる場合には、安全性評価を行うための評価基準に沿った資料を再度提出していただくということを指摘したいと思います。

それでは、事務局から御説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、説明させていただきます。緑色の紙ファイルで「pCo1株を利用して生産されたプロテアーゼ」という資料をお手元に御用意願います。

2ページから説明させていただきます。「1. 本プロテアーゼの使用・開発目的」でございます。既存添加物であるプロテアーゼは、動物、魚類及び植物などに存在する各種タンパク質を加水分解する添加物でございます。本プロテアーゼは、2つ目の段落の上から5行目辺りですが、コラーゲンやゼラチンは、ほかのタンパク質と異なりプロリンやヒドロキシプロリンを多く含むアミノ酸配列のため、一般的なプロテアーゼでは分解しにくいタンパク質であるということとして、本プロテアーゼは、コラーゲンやゼラチンに対して分解活性が高く、その辺りの問題点を解決できる酵素であるということでございます。

「2. 宿主」。pCo1株に用いました宿主ですが、記載のとおり *Streptomyces violaceoruber* 1326株を用いられております。

「2.1 非病原性」。当該宿主におきましては、国立感染症研究所病原体等安全管理規定におきまして、バイオセーフティレベル1に該当するということとございます。

「2.2 その他の有害生理活性物質」。当該宿主につきましては、有害生理活性物質を生産することは知られていないということとございまして、以下、抗菌活性物質に関しまして、実際に生産していないことが実験的に確認されております。

3ページ「2.3 食経験について」。 *Streptomyces* 属細菌が基原となる既存添加物につきましては、既に豊富な食経験があるということとございます。

3つ目の段落「更に」から御覧いただきたいと思いますが、更に、当該宿主微生物に由来のキチナーゼ遺伝子と *S. cinnamoneus* 由来の PLD プロモーター及び PLD ターミネーターをそれぞれ導入して得られた形質転換体 pNAG につきましては、組換え DNA 技術応用添加物の安全審査を経た結果、組換え体と同様の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場

合に該当すると判断されたという記載がございまして、今回の pCo1 株につきましては、この pNAG 株と同じ組み合わせの微生物を使って作出されました生産菌を利用して生産されたプロテアーゼということでございます。

「3. プラスミドについて」。

「3.1 名称」、「3.2 由来」といたしまして、*S. violaceoruber* ATCC35287 株が用いられております。

「3.3 塩基配列、非有害性に関して」。当該プラスミドの塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかになっており、ヒトに対して有害ではないことが知られている。

「3.4 薬剤耐性」。当該プラスミドにはチオストレプトン耐性遺伝子が含まれておりますが、この遺伝子が発現するタンパク質につきましては、アミノ酸配列のみならず、3次元立体構造も明らかとなっており、球状構造を有していることがわかっております。本タンパク質につきましては、分解酵素の作用を受けやすいことが知られておりまして、本タンパク質の消化性につきまして、アミノ酸配列を用いて解析が行われております。その結果、ヒトの消化管に存在するタンパク質分解酵素であるキモトリプシン及びトリプシンによって認識、切断される部位が多数存在することが判明したということです。加えて、ヒトの胃に分泌されるペプシンは、ランダムにタンパク質分解を行うことが知られていることから、他に複数の切断部位が存在すると考えられるということです。

以上のことから、本タンパク質は容易に消化されると考えられるということです。また、本耐性タンパク質のアレルギー性は報告されていないということとして、4 ページの図 1 にチオストレプトン耐性タンパク質の切断箇所が記載されています。

「3.5 伝達性」。当該プラスミドは、伝達性がないことが知られている。

「3.6 宿主依存性」。当該プラスミドは *Streptomyces* 属以外の微生物では複製されないことが知られております。

「4. 発現プラスミドに関して」。

「4.1 挿入遺伝子の供与体」。表に pCo1 プラスミドの目的遺伝子及びその供与体に関してまとめられておりまして、一番上がプロモーターで、由来が *S. avermitilis*、次にプロテアーゼの構造遺伝子となっておりまして、由来が *S. violaceoruber*、最後ですが、これがターミネーターになっておりまして、由来が *S. cinnamoneus* でございます。

「4.1.1 挿入遺伝子供与体の安全性について」。これら 3 つの菌につきましては、いずれも病原性、毒素、産生性は報告されておらず、また、先ほど説明いたしましたが、バイオセーフティレベル 1 に該当するということでございます。

「4.1.2 挿入遺伝子供与体の安全な摂取経験について」。 *Streptomyces* 属細菌が基原となる既存添加物につきましては、豊富な食経験があり、広く既存添加物の製造に利用されているということでございます。

「4.2 発現プラスミドの性質」。得られた pCo1 プラスミドにつきましてはの詳細は、図 2 に示されているということでございます。

5 ページ「5.3 プロモーターの使用について」。本プロモーターを使用した理由がここに記載されています。幾つかのプロモーターを用いて発現量を測定したところ、一番高い発現量を得た本プロモーターを使用したというようなことが記載されております。

6 ページ。図 3 がプロテアーゼの生産性について調べた分析結果になっています。

「4.4 発現プラスミド (pCol) の構築」。本プロテアーゼ遺伝子は、*S. violaceoruber* の染色体を鋳型とし、構造遺伝子を PCR 法によって増幅させて取得されました。これを pIJ702 から記載の遺伝子を除去し、そこにプロモーターとターミネーターを挿入することによりまして、発現プラスミド pCol を得たということでございます。

「4.5 発現プラスミドの宿主への導入方法」。これはプロトプラスト法を用いて、発現プラスミドを導入することによりまして、pCol 株を得たということでございます。

「5. 本件製品の生産菌株 pCol の生産するプロテアーゼと遺伝子供与体 *S. violaceoruber* NBRC 15146 株のプロテアーゼの同一性について」。3 行目辺りですが、開始コドン以外は、遺伝子配列がすべて一致していることが確認されているということでございます。ただし、開始コドンは変わっていますが、最終的に生産するプロテアーゼのアミノ酸配列については、全く同じものであると記載されております。

7 ページ「6. 本件製品の製造について」。製造に用いられる原料や器材はすべて食品衛生法に準じた添加物製造に合致したものを使用しているということでございます。

「7. *Streptomyces* 属に属する微生物が自然界において遺伝子交換を行う事について」。本生産菌に用いました *S. avermitilis*、*S. violaceoruber*、*S. cinnamoneus* の 16SrRNA の塩基配列は、それぞれ高い相同性を示しているということでございます。

3 つ目の段落に行きまして、その根拠としては、宿主からプラスミドが取り除かれた TK 24 株の 16SrRNA 配列が *S. violaceoruber* NBRC 15146 株の配列と 100% 相同性を示すためであるということが記載されております。

「7.1 *Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われることに対する遺伝学上の根拠」。参考文献 9 を見ますと、*Streptomyces* 属の多くが自然界において、菌と菌との接合による遺伝子交換を行うことが記載されているということが書かれております。3 行目ですが、その理由といたしまして、ほとんどの *Streptomyces* 属の微生物に接合性プラスミドが存在するからであって、その結果、供与体菌株から染色体断片が受容体菌株に取り込まれることが行われているということでございます。

「7.2 *Streptomyces* 属間でプラスミドの転移と染色体遺伝子交換が行われていることに対する実験室の証明」。 *S. violaceoruber* 由来の接合性プラスミドは *Streptomyces* 属間で転移することが知られておりまして、pIJ101 より派生した非接合性である pIJ702 も多種の *Streptomyces* 属間細菌で転移されることが知られていると記載されています。

「7.3 自然界において、*Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われる根拠」。この項につきましては、系統学的な観点から説明されておりまして、1 つの例といたしまして、*Streptomyces* 属に広く分布される 99 の菌株を土壌より分離し、これらの 16SrRNA 情報を元に

得られた系統樹と、芳香族ポリケタイド生合成に関わる遺伝子情報を元に得られた系統樹について比較を行った結果、相同性の高い芳香族ポリケタイド生合成に関わる遺伝子が、分類学上近縁ではない *Streptomyces* 属の菌株に存在することが示されているということです。

「8. 諸外国の規制、認可について」。諸外国の規制、認可に関して記載されております。

最後の段落に行きまして、以上に示したように、遺伝学上、実験的及び系統学上の証明により、自然界において、*Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われることは明らかであると考察されます。更に、*S. cinnameus*、*S. violaceoruber* 及び *S. avermitilis* の間では自然に遺伝子交換がなされていると考えられる科学的知見もあることから、本生産菌により生産されるプロテアーゼにつきましては、組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合に該当すると考えられるという結論になっております。

説明は以上でございます。

○澤田座長 それでは、申請書につきまして、項目ごとに御意見をいただきたいと思ます。申請書の2～4ページの前半。使用、開発目的、宿主、プラスミドについて。この辺りに関しまして、何かコメントがありましたらお願いしたいと思ます。

○鎌田専門委員 前にも似たようなものがある、よく覚えていないのですが、プラスミドが pIJ702 というのは前の pNAG のときに使っていると書かれていて、ところが下のところに3.4項で今回は薬剤耐性が突然出てきて、*azureus* という前回には多分出てきていなかった菌株が突然出てきて、これのチオストレプトン耐性遺伝子ということについて、タンパクの形状的には消化されやすいということが書いてあって、それで全体として全部 *Streptomyces* 属だからと。いろいろな説明の中に、*azureus* という菌株が二度と出てこなくて、どうするのでしょうか。 *Streptomyces* であることは確かだけれども、ほかの3つの菌株についてはすべて遺伝子交換の状況証拠もあるということが書いてあるのに、それだけ書いていないです。

プラスミドのコンストラクションを見ると、途中でその耐性遺伝子を使っていろいろな遺伝子を入れて、最後に元に戻して、タンパク質として発現する状態に戻しています。それを *Streptomyces* 全部は近縁だからいいと言ってしまえば、このことも全く無視できる。でも、そこまで保証されているのかと言われると、全体としては文章的には保証されていないので、これはどうしようかと非常に困った状況で、前回のものがどうなっていたかもよくわかりません。

○澤田座長 このチオストレプトン耐性タンパクは、参考資料に付いています pNAG の場合は、このタンパクは入ってなかったですか。

○松尾係長 この表現はこの社でよく出てくるもので、過去にも同じ内容について御審議をいただいていることもあります。

○鎌田専門委員 チオストレプトン耐性というものをやりましたか。

○澤田座長 私もよく覚えていないですけれども、この pIJ702 自身の由来として自然に最初からあるのか。ここら辺は確認をしないと、よくわからない点があります。

○鎌田専門委員 今のことで言うと、この会社は今までだと薬剤耐性はわざわざ書かなくて、タンパクの毒性がどうしたこうしたと消化性までわざわざ書かないのに、ここだけ書いてあって、しかも可能性があるということだけで実験データは勿論ないので、何となくほかの部分と書き方がここだけ違うのがすごく気になります。

○澤田座長 手島先生、キモトリプシンとトリプシンの消化は記憶がおありですか。今回初めて出てきましたか。

○手島専門委員 余り記憶にないです。あえてここに書かなくてもいいのではないかという気がします。私は初めて見たように思います。

○澤田座長 昔にさかのぼって見てみないとわからないですけれども、今、昔のものは出ますか。

○松尾係長 同じ内容のものを以前に御審議していただいたことがありますので、記載内容とは全く同じ内容になっています。

○澤田座長 では、前は全く似たような内容で通っているということですね。

○松尾係長 そうです。

○澤田座長 わかりました。

○五十君専門委員 私はこの記述を見た記憶がないので、恐らく今回入れてきているのだと思います。初めて出る場合は属名を省略しないで書いていただかないといけないので、これは本当に *Streptomyces* なのかが不安になるところで、確認していただいた方がいいのではないかと思います。

○澤田座長 pNAG の書類はすぐに出ますか。

○松尾係長 すぐに出ます。

○澤田座長 では、お願いします。とりあえずそれ以外の点で、残りの 4 ページ後半から 8 ページの発現プラスミド、同一性、製造、自然界において遺伝子交換を行うこと、諸外国の規制、認可につきまして、後半部分でコメントがありましたらお願いしたいと思いません。よろしいでしょうか。

では、さっきの問題だけですね。pNAG の食品健康影響評価の 3 ページは pIJ702 を基に作製されたものであると書いてあるのですけれども、タンパクが書いてありましたか。

○鎌田専門委員 見る限りは、タンパクのチオストレプトン耐性遺伝子とは書いてありませんが、実は何に由来するかは何も書いていません。もともとプラスミドであったかのごとくに書いてあるのですが、今回の記載を見ると、あえてほかから入れたように見えます。

○児玉専門委員 これは平成 22 年 8 月 24 日にやったグルカナーゼのときに、たしか私がチオストレプトン耐性の遺伝子はどこからか持ってきているので、その由来をちゃんと明らかにするよという指摘をした記憶があるので、そのときは載ってなくて、*azureus* から持ってきました。たしか、*azureus* から持ってきていますねと言った記憶があります。

そういう指摘をしているので、今回は多分最初から書いてきたのだと思います。

○澤田座長 この *S.* は *Streptomyces* で間違いありませんね。

○児玉専門委員 それは間違いありません。

○澤田座長 そうすると、形としてはナチュラルに該当するとなりますけれども、それでよろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 今ので了解ですが、*cinnamoneus* とか、ほかは全部後ろの方に結論のところきちんと遺伝子交換をすると書いてあるので、*azureus* も同じように入れていただかないと多分根拠がなくなるので、そうしていただければと思います。

○澤田座長 それは実際のデータがなくても、文章的には *Streptomyces* 属に属する旨をどこかに書いていただくということでお願いします。

それでは、問題は決着が付きまして、特に問題があるわけではないということで、続きまして、評価書（案）の審議に入りたいと思います。事務局の方から説明をお願いします。

○松尾係長 それでは、評価書（案）を説明させていただきます。「食品健康影響評価に関する資料」をお手元に御用意していただきまして、プロテアーゼの評価書（案）が 23 ページからになっております。26 ページから説明をさせていただきます。

「Ⅰ．評価対象添加物の概要」。名称、用途、申請者、開発者を記載させていただいております。

28 行目。本添加物は、プロテアーゼの品質を高めるため、*Streptomyces violaceoruber* 1326 株を宿主として、*S. violaceoruber* NBRC 15146 株由来のプロテアーゼ構造遺伝子に *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267 株由来のプロモーター及び *Streptomyces cinnamoneus* NBRC 12852 株由来のターミネーターを結合した挿入 DNA を含む発現プラスミドを導入して作製された pCol 株を利用して生産されたプロテアーゼという記載にしております。

「Ⅱ．食品健康影響評価」。

「1．pCol 株の作製について」。41 行目に宿主に関して、42 行目から挿入 DNA に関して記載させていただいております。

45 行目。ここでは発現プラスミドに関して記載させていただいております、*S. violaceoruber* ATCC 35287 株由来のプラスミド pIJ702 を基に作製されたものであると記載させていただいております。

48 行目。pCol 株は、発現プラスミド pCol をプロトプラスト法を用いて形質転換することによって作製されたと記載させていただいております。

51 行目「2．pCol 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在するか否かについて」。pCol 株の作製に用いました 3 種類の菌の間では、自然に遺伝交換が行われていると考えられる。この根拠となる科学的知見につきましては、pNAG を利用して生産されたキチナーゼの評価において既に確認されている。

57 行目。したがって、pCol 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在すると考えられる。

以上 1 及び 2 の結果から、本添加物については、遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準の第 1 章総則第 3 対象となる添加物及び目的のうち、組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合に該当することから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断したという記載にさせていただいております。

説明は以上でございます。

○澤田座長 それでは、評価書（案）につきまして、御意見、コメントをいただきたいと思っております。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただければと思っております。

○鎌田専門委員 さっきの件で、1 つは 51 行目からの中に、*S. azureus* も是非記載しておいていただきたいということが 1 つ。それから、*azureus* のストレプトン耐性遺伝子は 45 行目からのところに本当は入っていないといけないことになるのではないかと思います。

○澤田座長 表現としては pCo1 は同等の遺伝子を含み、更にそれ以下につなげるということによろしいですか。

○鎌田専門委員 はい。

○澤田座長 ほかに御意見がもしありましたら、お願いしたいと思います。

それでは、ただいまいただきました修正につきましては、事務局の方で修正していただきまして、先生と私の方で確認をして、食品安全委員会に報告し、パブリックコメントの手続に入りたいと思っております。ありがとうございました。

それでは、次にワタ GHB119 系統について審議を行いたいと思っております。では、事務局の方から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統について、御説明いたします。お手元にブルーの紙ファイルの ID202 と書いてある食品の方の御用意をお願いいたします。

1 ページ「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」から御説明いたします。

「1. 宿主及び導入 DNA に関する事項」でございます。

宿主の種名は、アオイ科、ワタ連、ワタ属に属するワタの商業品種 Coker312 でございます。

DNA 供与体につきましては放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* 由来の改変ピアラフォス耐性遺伝子（以下「*bar* 遺伝子」とする。）及び土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* 由来の *cry2Ae* 遺伝子が導入されてございます。

挿入 DNA の性質等でございます。改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（以下、「改変 PAT タンパク質」とする。）は、除草剤グルホシネート耐性を付与します。また、*Cry2Ae* タンパク質は、チョウ目害虫抵抗性を付与します。ワタゲノムへの導入には、アグロバクテリウム法を用いております。

2 ページ「2. 宿主の食経験に関する事項」。ワタ属は古くから綿実油として用いられてきた食経験がございます。綿実の殻に含まれますヘミセルロースは、キシロースやキシリトールの原料として利用されてございまして、綿実の地毛（リントー）はセルロースの原料として食品や医薬品に使用されてございます。

「3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項でございます。

「(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」は記載のとおりでございます。有害生理活性物質としまして、ゴッシポール及びシクロプロペン酸が含まれてございます。

3 ページ。「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」。収穫時期、貯蔵方法、摂取部位、摂取量、調理及び加工方法につきましては、従来のワタと相違はございません。

5 は、宿主以外のものを比較対象としてございません。

「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」。除草剤グルホシネート耐性が付与されていること。チョウ目害虫抵抗性が付与されていること。これ以外を除きましては、従来のワタと相違はなく、食品としての利用方法にも相違はないと考えられるということでございます。

以上、1～6によりまして、GHB119 系統の安全性評価におきまして比較対象となり得るのは、既存のワタであると判断されてございます。

4 ページ「第2 無組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項」。除草剤グルホシネートを散布されても影響を受けずに生育することができ、そのため、生育時期を問わず、農作物への付着を避けるための措置を講ずることなく除草剤グルホシネートを散布することができ、効率的な雑草防除が可能になります。また、Cry1Ac タンパク質によりまして、チョウ目害虫に対して抵抗性を示しまして、害虫防除のための殺虫剤散布量を軽減することが可能となるということでございます。

5 ページ「第3 宿主に関する事項」。宿主はワタの商業品種 Coker312 でございます。

「2. 遺伝的祖先及び育種開発の経緯に関する事項」は記載のとおりとなっております。

「3. 有害生理活性物質の生産に関する事項」につきましては、ゴッシポールやシクロプロペン脂肪酸を生産することが知られてございます。

「4. アレルギー誘発性に関する事項」。ワタが原因となる明確な食物アレルギーが生じたという報告はございません。

5 の病原性外来因子につきましては、ワタの病気として、記載のとおりのもも知られてございますけれども、それらがヒトや動物に感染することは知られてございません。

「6. 安全な摂取に関する事項」。ワタの有害生理活性物質でありますゴッシポールは搾油工程で一部の遊離ゴッシポールは原油にも移行しますが、精製工程で無害となりまして、脱ガム、脱酸、脱色の各工程で除去されます。シクロプロペン脂肪酸は、製油工程を

経た後では著しく減少します。よって、食品として利用される精製工程を経た綿実油におきましては、ゴッシポール、シクロプロペン脂肪酸は除去または削減されてございます。

「7. 近縁の植物種に関する事項」。記載のとおりとなっております。

7 ページ「第4 ベクターに関する事項」。GHB119 系統の作出に用いましたプラスミドは、pGSC1700 由来のプラスミド pTYG50 で、図 4-1 に示されているとおりでございまして、構成要素及びそれらの由来、機能につきましては 8 ページに記載がございまして、

9 ページ。ベクターの性質に関する事項でございまして、

(1)、pTYG50 の塩基数は 8,026bp でございまして、各構成要素のサイズは 8 ページに示されているとおりでございまして、

「(2) 制限要素による切断地図に関する事項」でございまして、7 ページに制限酵素切断地図が示されてございまして、

(3)、pTYG50 に存在するすべての構成要素は、その特性が各々明らかにされてございまして、既知の有害な塩基配列を含んでございませぬ。

(4) ベクター中の薬剤耐性遺伝子でございまして、選択マーカー遺伝子 *aadA* を有してございまして、また、ネオマイシンリン酸基転移酵素をコードしますトランスポゾン Tn903 由来の *nptI* 遺伝子の断片が含まれてございまして、断片であるため機能しないということにございまして、

これらの遺伝子は T-DNA 領域の外部に存在してございまして、ワタゲノム中に挿入されていないことがサザンブロット分析により確認されてございまして、

「(5) 伝達性に関する事項」でございまして、pTYG50 には伝達性はないということにございまして、

10 ページ「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」。GHB119 系統には、改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子が導入されてございまして、*bar* 遺伝子は、*S. hygrosopicus* から単離されてございまして、*cry2Ae* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *dakota* から単離されてございまして、

「(2) 安全性に関する事項」。Streptomyces 属は、土壌、飼料、肥料等に存在し、直接的な食経験はございませぬけれども、病原性等の問題は報告されてございませぬ。また、*B. thuringiensis* は、微生物農薬として長年にわたり、穀物、飼料、果実、野菜、繊維作物等に安全に利用されてございまして、

「2. 挿入 DNA 又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項」。

「(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項」。改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygrosopicus* からクローニングされた野生型の *bar* 遺伝子がコードする野生型 P AT タンパク質の N-末端の 2 つのコドンに植物で使用頻度の高いコドンに適合するように変更してございまして、翻訳の効率を上げるために AGC→GAC にそれぞれ置換されてござい

ます。なお、GTG→ATG の置換では翻訳されるアミノ酸はメチオニンのまま変化してごさいませんが、AGC→GAC の置換ではセリンからアスパラギン酸に変化してごさいます。

cry2Ae 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *dakota* からクローニングされてごさいまして、ワタにおける発現に適しますように合成 DNA を用いて部位特異的な変異を導入し、コドンが改変されてごさいます。しかしながら、これらの改変によりコードされるアミノ酸は変化してごさいません。

11 ページ「(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素に関する切断地図に関する事項」でごさいます。挿入 DNA は、導入用プラスミド pTEM12 の T-DNA 領域であります 4,345bp でごさいます。11 ページの表 5-1 に構成要素が記載されてごさいます。

15 ページに制限酵素による切断地図が示してごさいます。

12 ページ「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」。改変 *bar* 遺伝子でごさいますけれども、植物は窒素代謝の過程でアンモニアを生成しますが、生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的な役割を果たしてごさいます。グルホシネートによりグルタミン合成酵素が阻害されるとアンモニアが蓄積するため、グルホシネートを散布されると植物は枯死しますけれども、改変 PAT タンパク質はグルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素に対する阻害活性を不活化します。よって、アンモニアの蓄積は回避され、植物はグルホシネートの影響を受けずに生育できるということでごさいます。

また、改変 PAT タンパク質のアミノ酸配列に基づきまして、BLASTP アルゴリズムを使いまして、種々のデータベースに登録されてごさいますすべてのタンパク質との相同性検索を行ってごさいます。その結果、複数のアセチル基転移酵素のアミノ酸配列との相同性が認められてごさいますけれども、これらのタンパク質に関連する毒性は報告されておらず、改変 PAT タンパク質と既知の毒素タンパク質との相同性は認められていないということでごさいます。

cry2Ae 遺伝子に関する事項でごさいます。チョウ目害虫でごさいますニセアメリカタバコガなどに殺虫活性を示します。Cry2Ae タンパク質を含む *Bt* タンパク質は、標的昆虫に摂取されると中腸において特異なプロテアーゼにより消化されて活性化したコアタンパク質となりまして、中腸上皮の特異的な受容体と結合しまして、イオンチャンネルを形成して穴を開けます。その結果、標的昆虫は飢餓状態に陥るか、敗血症を引き起こし、死に至るとのことでごさいます。

Cry2Ae タンパク質のアミノ酸配列に基づきまして、BLASTP アルゴリズムを用いまして、データベースに登録されていますタンパク質との相同性検索を行ってごさいます。その結果、複数の *Bt* タンパク質のアミノ酸配列との類似性が認められてごさいますけれども、これらのタンパク質の哺乳類に対する毒性は報告されておらず、Cry2Ae タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかったということでごさいます。

13 ページ「(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 pTE

M12 は、選択マーカー遺伝子 *aadA* を有します。また、*nptI* 遺伝子断片を有します。これらの配列が GHB119 系統に挿入されていないことは、サザンブロット分析において確認されてございます。

「3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」。

「(1) プロモーターに関する事項」。改変 *bar* 遺伝子のプロモーターには、Cassava Vein Virus 35S RNA のプロモーター Pcsvmv XYZ が用いられてございます。*cry2Ae* 遺伝子のプロモーターには、Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA のプロモーター P35S2 が用いられてございます。

「(2) ターミネーターに関する事項」。改変 *bar* 遺伝子のターミネーターには、プラスミド pTiT37 の T-DNA より得ましたノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域由来で、転写を終結させ、3' 末端のポリアデニル化を生じさせる 3' nos を用いてございます。*cry2Ae* 遺伝子のターミネーターには、Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA の 3' 非翻訳領域由来で、転写を終結させ、3' 末端のポリアデニル化を生じさせます 3' 35S を用いてございます。

(3) その他でございますけれども、*cry2Ae* 遺伝子の発現レベルを増加させるために、*cry2Ae* 遺伝子上流に *P. hybrida* 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダー配列であります 5' cab22L を配置してございます。また、成熟しました *Cry2Ae* タンパク質が色素体に移行できるようにするために、*A. thaliana* 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子 *ats1A* の輸送ペプチドのコード領域でございます TPssuAt を配置してございます。

14 ページ「4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項」。図 5.1 に示してございますとおりでございます。プラスミド pTYG50 由来の中間プラスミド及び改変 *bar* 遺伝子発現カセットを組み込みました中間プラスミド 2 を制限酵素で処理しまして、改変 *bar* 遺伝子発現カセットを挿入しました中間プラスミド 3 を作製してございます。更に、*cry2Ae* 遺伝子発現カセットを組み込みました中間プラスミド 4、中間プラスミド 3 を制限酵素に処理しまして、*cry2Ae* 遺伝子発現カセットを中間プラスミド 3 に挿入しまして、導入用プラスミド pTEM12 を得てございます。

15 ページ「5. 構築された発現ベクターに関する事項」。図 5.2 に切断地図を示してございますけれども、塩基数は 12,266bp でございます。切断部位につきましては図 5.2 に示しているとおりでございますが、T-DNA 領域外に関しましては、p.7 の図 4.1 に示してございます。

16 ページが図 5.2 で、導入用プラスミド pTEM12 の構成要素、サイズ、由来及び機能となっております。

17 ページ。(2) オープンリーディングフレームに関する事項でございます。導入プラスミド pTEM12 の塩基配列はすべて明らかになってございまして、目的以外のタンパク質を発現しますオープンリーディングフレームは含まれてございません。

(3) 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とということでございますが、宿主に導入される領域は、導入用プラスミド pTEM12 の左側境界配列から右側境界配列までの T-DNA 領域でございます。

(4) 目的外の遺伝子の混入がないように純化されていることとということでございますけれども、T-DNA 領域内の遺伝要素は塩基配列、大きさ及び由来が明らかでございますして、導入用プラスミドの塩基配列から目的外の遺伝子が混入していないことが確認されてございます。また、導入用プラスミドは抗生物質耐性マーカーにより選抜されてございます。

「6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項」。宿主への導入は、アグロバクテリウム法を用いて行ってございます。グルホシネートを含む再生培地を用いまして、グルホシネート耐性株を選抜してございます。更に、圃場において選抜を繰り返しまして、最終的に優良系統を選抜しまして、GHB119 系統としてございます。育種過程は 18 ページの図 5.3 に示してございます。申請の対象につきましては、18 ページの図の四角で囲った部分とその後代ということとでございます。

19 ページ「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」。まずコピー数でございますけれども、T3 世代の葉から抽出しました DNA につきまして、図 6.1 に示してございますプローブを使いまして、サザンブロット分析を行ってございます。その結果、1 コピーの T-DNA 領域が GHB119 系統に導入されていることが確認されてございます。

また、GHB119 系統に導入されました DNA の塩基配列及び近傍配列につきまして、シーケンス解析を行いました結果、LB の 20bp、RB の 23bp の欠損を除きまして、導入用プラスミド pTEM12 上の T-DNA 領域と完全に一致することが確認されてございます。

20 ページが表 6.1 になってございまして、サザンブロット分析の結果の表になってございます。

22～23 ページがサザンブロット分析の結果になってございます。

24 ページ「T-DNA 領域外配列の有無の確認」。導入プラスミド pTEM12 の T-DNA 領域外側のプラスミド配列が存在するかどうかにつきまして、T3 世代の葉から抽出しました DNA について、図 6.3 に示してございますプローブを用いまして、サザンブロット分析を行ってございます。その結果、5 つのプローブとのハイブリダイズは認められず、本系統に pTEM12 の T-DNA 領域外配列は挿入されていないことが確認されてございます。

25 ページがサザンブロット分析の結果の表になってございます。

26～27 ページがサザンブロットの結果になってございます。

28 ページ「近傍配列の解析」。シーケンス解析によりまして、挿入 DNA の 5' 側近傍配列及び 3' 側近傍配列と宿主ワタにおけます挿入部位配列を比較しました。その結果、挿入箇所の 8 bp の欠失を除きまして、5' 側近傍配列及び 3' 側近傍配列は、宿主ワタゲノムと一致することが確認されてございます。

図の下にまいりまして、挿入前配列にワタの遺伝子が存在する可能性を確認するために、BLASTx アルゴリズムを用いまして、5´側近傍配列と 8 bp の欠失部位、3´側近傍配列を含みます合計 2,053bp の配列につきまして、データベースに登録されている既知のタンパク質の相同性検索を行ってございます。その結果、本システムの挿入前配列におきまして、既知のタンパク質の相同性を示す配列は確認されてございません。挿入 DNA の組込みによりまして、既知のワタ内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられるということでございます。

29 ページ。(2) オープンリーディングフレームに関する事項でございます。挿入 DNA と近傍配列の境界領域に関しまして、オープンリーディングフレームの検索を行ってございます。その結果、5´側境界領域におきまして 5 つ、3´側におきまして 6 つ、合計 11 のオープンリーディングフレームが検出されてございます。

図 6.6 はオープンリーディングフレームの概略図になってございます。

図の下にまいりまして、11 個のオープンリーディングフレームのうち、8 アミノ酸以上の長さを持ちます 10 個のオープンリーディングフレームのアミノ酸配列につきまして、BLASTP アルゴリズムを用いまして、データベースにより既知の毒性タンパク質の相同性検索を行ってございます。その結果、登録されておりますタンパク質との相同性は認められなかったということでございます。更に、アレルゲンデータベースに登録されている既知のアレルゲンとの相同性検索を行いました結果、アレルゲンデータベースに登録されておりますアレルゲンとの相同性について、連続する 8 アミノ酸の範囲でエピトープの検索を行ってございます。その結果、相同性検索、エピトープ検索のいずれにおきましても、既知のアレルゲンとの相同性は認められてございません。

以上から、仮にこれらのオープンリーディングフレームにより新たなタンパク質がつけられたとしても、毒性及びアレルギー性を示す可能性は低いと考えられるということでございます。

更に、境界領域で検出されましたオープンリーディングフレームの発現の可能性について調べるために、組換え体、非組換え体の各組織につきまして、5´側境界領域、3´側境界領域のそれぞれ正逆方向の RNA プローブを用いまして、ノーザンブロット分析を行ってございます。

その結果、図 6.7 に示してございますように、P3、P5、P6 のプローブでは、いずれの組織におきましても、転写産物は認められてございません。また、P4 プローブでは花粉以外の各組織で約 1,300 nt の非常に弱いバンドが検出されてございます。これは改変 *bar* 遺伝子の転写による読み過ごしにより生じた、長い改変 *bar* 遺伝子転写産物と P4 プローブがハイブリダイズしたものと考えてございます。この読み過ごしにつきましては、改変 *bar* 遺伝子に対しまして相補的なプローブを用いた分析において、改変 *bar* 遺伝子転写産物と思われる約 900 nt のバンドのほかに、約 1,300 nt の弱いバンドが検出されたということから、3´nos を越えて 5´側近傍配列の一部まで起きたものと考えてございます。よって、P

4 プローブは 5´側近傍配列の一部とハイブリダイズしたものと考えてございます。なお、ウェスタンブロット分析におきましては、この読み過ごしにより生じたと考えられるタンパク質は確認されてございません。したがって、遺伝子導入により新たにつくられたオープンリーディングフレームからタンパク質が生じる可能性は低いと考えるということでございます。

31 ページの表 6.3 が遺伝子発現解析の表になってございます。

32～35 ページがノーザンブロット分析の結果になってございます。

36 ページ「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」。2 段落目。4-6 葉期、開花期及び開花終了後におきまして、改変 *bar* 遺伝子、*cry2Ae* 遺伝子の発現を分析しました結果、改変 *bar* 遺伝子に関しましては、検出限界以下であった花粉を除くすべての組織で 900 nt 及び 1,300 nt の改変 *bar* 遺伝子転写産物が確認されてございます。約 900 nt のバンドは、polyA 付加された改変 *bar* 遺伝子転写産物と考えられるということでございます。また、検出されました約 1,300 nt の弱いバンドは、転写が 3´nos ターミネーターを過ぎ、更に 5´側境界領域まで読み過ごしが起きたものと考えられるということでございます。

また、*cry2Ae* 遺伝子は、すべての組織で発現することが確認されてございます。開花期、葉及び茎におきまして、約 4,000 nt のバンドが確認されてございますが、これは RNA の変性が不十分だったためと考えられてございます。また、開花期の葉、茎及び根において確認された分子量の小さなバンドは転写産物の分解物と考えられるということでございます。

36 ページの表 6.4 に発現解析の表が載ってございます。

37～39 ページにノーザンブロット分析の結果が示されてございます。

40 ページ。改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の発現量を測定したという記載がございませぬ。植物の各組織におきまして改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の含有量に関する事項でございます。通常の温室条件で栽培しました本系統の各組織、根、茎、花蕾、頂端、全地上部、花粉、蜜、花及び種子におきまして改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質の発現量を測定してございます。

41 ページの表 6.5 に検出限界と定量限界を示してございまして、表 6.6 にその結果が示されてございます。分析の結果、改変 PAT タンパク質はすべての組織におきまして、Cry2Ae タンパク質は、蜜を除くすべての組織において検出されてございます。

42 ページ「未加工種子における改変 PAT タンパク質量及び Cry2Ae タンパク質量に関する事項」。米国の 6 試験地におきまして栽培しました本系統と宿主の未加工種子におきまして改変 PAT タンパク質と Cry2Ae タンパク質を測定してございます。表 6.7 が検出限界及び定量限界になってございます。

表 6.8 にその結果が示されてございませぬけれども、改変 PAT タンパク質は GHB 系統の穀実及び地毛外皮の両画分で検出されまして、98%以上が穀実で検出されてございます。Cry2Ae タンパク質も本系統の穀実及び地毛外皮の両画分で検出され、90%以上が穀実で検出

されてございます。

43 ページが PAT タンパク質量でございまして、44 ページが Cry2Ae タンパク質量になってございます。

45 ページ「加工種子における改変 PAT タンパク質量及び Cry2Ae タンパク質量」。加工種子のサンプルは、本系統と宿主につきまして、合計 2 試験区において栽培されたものを用いてございます。

46 ページの表 6.10 が同様に検出限界及び定量限界でございまして、表 6.11 にタンパク質量が示されてございます。本系統におきまして、改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質は脱地毛綿実、綿実油粕、加熱処理綿実油粕、種子外皮で検出されてございます。

47 ページ「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、主に綿実油として食品に利用されてございます。第 6、2 に示しましたように、ELISA による試験では GHB119 系統の精製・脱色・脱臭綿実油におきまして、改変 PAT タンパク質、Cry2Ae タンパク質は検出されてございません。したがって、一日一人当たりの平均油脂摂取量 9.9 g につきまして、仮に改変 PAT タンパク質、Cry2Ae タンパク質を検出限界値で計算しましても、一人当たりの平均タンパク質摂取量に対して、それぞれ $8.5 \times 10^{-8} \%$ （改変 PAT タンパク質）、 $2.7 \times 10^{-8} \%$ （Cry2Ae タンパク質）でございまして。

「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」。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見につきましては、それぞれアレルギーを誘発するという報告はございません。

（2）それぞれタンパク質につきましても、アレルギーを誘発するという報告はなされてございません。

「（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」。感受性に関する試験には、*E. coli* で生産しました改変 PAT タンパク質と *B. thuringiensis* で生産をしました Cry2Ae タンパク質をそれぞれ用いてございます。これらのタンパク質とワタ植物内で発現しているタンパク質の同一性が確認されてございます。

48 ページ「改変 PAT タンパク質の物理化学的処理に関する感受性」。

「人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理」。SDS-PAGE 用ゲルで電気泳動をした結果、人工胃液中で反応開始直後におきまして、約 21 kDa に位置します改変 PAT タンパク質を示すバンドが示されてございますが、0.5 分後及びその後のすべての処理時間におきましては、改変 PAT タンパク質を示すバンド、もしくはその分解物と考えられるバンドは認められてございません。

ウェスタンブロット分析におきましては、開始直後及び 0.5 分処理をした試料におきまして、改変 PAT タンパク質のバンドが示されてございますが、0.5 分後に確認されたバンドは 0.1 倍量の改変 PAT タンパク質試料で検出されるバンドよりも薄かったということでございます。

以上より、改変 PAT タンパク質は、人工胃液中で 0.5 分以内に 90% 以上が分解されることが確認されてございます。

49 ページが SDS-PAGE 分析の結果です。

50 ページがウェスタンブロットの結果になってございます。

51 ページ「人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理」。SDS-PAGE では反応開始直後に約 21.5 kDa の改変 PAT タンパク質のバンドが消失しています。ウェスタンブロット分析の結果、反応開始直後、改変 PAT タンパク質を示すバンドはほぼ消失しましたが、分解物と考えられる 6 kDa のバンドが認められてございます。2 分後以降は、これらのバンドは認められなかったということでございます。

以上の結果から、改変 PAT タンパク質は、人工腸液中におきまして速やかに分解が開始され、2 分以内に完全に分解されるということが確認されたということでございます。

52 ページが SDS-PAGE 分析。

53 ページがウェスタンブロット分析の結果でございます。

54 ページ「加熱処理」。

「a：熱処理による影響」。60℃、70℃、90℃でそれぞれ 10 分、30 分、60 分間処理をさせていただきます。SDS-PAGE 分析の結果、加熱した試料におきましても、改変 PAT タンパク質を示すバンドは確認されてございます。

ウェスタンブロット分析の結果、90℃、30 分及び 60 分処理で 35 kDa から 55.4 kDa の間に二量体あるいは多量体と思われるバンドが確認されてございますが、各温度で加熱処理したいずれの試料におきましても、改変 PAT タンパク質のバンドに変化は認められてございません。

以上より、改変 PAT タンパク質は 90℃で 60 分間処理を行っても安定であることが確認されてございます。また、ウェスタンブロット分析の結果から、抗体との反応性に対する熱処理の影響は認められてございません。

55 ページが SDS-PAGE 分析。

56 ページがウェスタンブロット分析の結果になってございます。

57 ページ「b：酵素活性に対する影響」。PAT タンパク質の反応速度と温度の関係を調べるために 10℃から 55℃の間の温度で活性を測定してございます。10℃から 45℃までは活性が増加してございますが、45℃以上では増加は認められてございません。更に PAT タンパク質をあらかじめ 15 分間、種々の温度で保温した後、活性を測定して熱安定性を調べた結果、35℃より高い温度で 15 分間保温した際に、熱処理による PAT タンパク質の失活が認められてございます。図 6.18 のとおりでございます。

58 ページ「Cry2Ae タンパク質の物理化学的処理に対する感受性」。

「人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理」。SDS-PAGE 分析では反応直後には Cry2Ae タンパク質を示すバンドが認められてございますが、2 分間の処理によりまして、0.1 倍量の Cry2Ae タンパク質で検出されるバンドよりも薄くなりまして、5 分間処理では

完全にバンドが消失しています。

ウェスタンブロット分析におきましては、Cry2Ae タンパク質を示すバンドは 2 分間処理によりまして、0.1 倍量の Cry2Ae タンパク質で検出されるバンドよりも薄くなりまして、5 分間処理では完全に消失することが確認されてございます。

以上より、Cry2Ae タンパク質は、37℃ 条件下におきまして、人工胃液中で 2 分以内に 90% 以上が分解されることが確認されてございます。

59 ページが SDS-PAGE の結果。

60 ページがウェスタンブロット分析の結果となっております。

61 ページ「人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理（バンクレアチン）処理」。SDS-PAGE では、反応直後から 60 分間のいずれの処理時間におきましても、Cry2Ae タンパク質のバンドは薄い濃度で確認されてございます。

ウェスタンブロット分析の結果では、反応直後から 60 分のいずれの処理時間におきましても、Cry2Ae タンパク質のバンドがやや薄い濃度で認められてございます。59.3 kDa と 30.4 kDa の間に位置するバンドは、Cry2Ae タンパク質の分解物と考えられまして、30.4 kDa に確認されたバンドは、Cry2Ae タンパク質に存在した不純物が抗体と反応したものと考えられるということでございます。

以上より、Cry2Ae タンパク質は、37℃ 条件下におきまして、人工腸液中で 60 分処理を行ってもほとんど分解されないことが確認されてございます。

62 ページが SDS-PAGE の結果。

63 ページがウェスタンブロット分析の結果になってございます。

64 ページ「加熱処理」。

「a：熱処理による影響」。SDS-PAGE 分析の結果では、90℃、30 分処理によりまして、Cry2Ae タンパク質を示すバンドは薄くなりまして、90℃、60 分処理によりまして消失することが確認されてございます。

ウェスタンブロット分析を行った結果では、SDS-PAGE と同様の傾向を示してございますが、レーン上部におきまして試料の一部の移動度は低下する現象が認められてございます。この現象は、60℃、10 分処理から見られまして、75℃、30 分から 90℃、10 分処理で顕著でございました。

以上から、Cry2Ae タンパク質は、加熱処理により凝集が生じている可能性が示唆されたということでございます。

65 ページが SDS の結果。

66 ページがウェスタンブロットの結果になってございます。

67 ページ「b：殺虫活性に対する影響」。B. *thuringiensis* で生産した Cry2Ae タンパク質を 45℃ 及び 60℃ で、それぞれ 0、5、10、30、60、120、240 分及び一晩処理を行ってございます。これらの試料溶液を混入した餌を標的昆虫でありますアメリカタバコガに与えまして、1 週間後の死亡率を測定して半数致死濃度 (LC₅₀) を決定し、殺虫活性を評

価してございます。

45℃では処理時間にかかわらず同程度の LC₅₀ 値を示したのに対しまして、60℃では徐々に LC₅₀ 値が上昇しまして、240 分以上の処理によりまして、約 6 倍にまで至ることから、60℃処理では殺虫活性が低下することが確認されたということでございます。図 6.25 にグラフが示されてございます。

68 ページ「(4) 遺伝子産物 (タンパク質) と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項」。

「改変 PAT タンパク質」。アレルゲンデータベースを用いまして、すべてのアレルゲンとの相同性検索を行ってございます。その結果、改変 PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの相同性は認められてございません。エピトープ検索におきまして、連続する 8 アミノ酸配列と既知のアレルゲンのアミノ酸配列との 100% の一致は認められてございません。

「Cry2Ae タンパク質」。アレルゲンデータベースに登録されていますすべてのアレルゲンとの相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められてございません。エピトープ検索におきまして、Cry2Ae タンパク質の連続する 8 アミノ酸と既知のアレルゲンのアミノ酸配列の 100% の一致は認められてございません。

69 ページ。グリコシル化され、アレルギー誘発性が付与される可能性について、検討されてございます。PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質のアミノ酸配列中にグリコシル化されるアミノ酸配列が存在するか否かについて検索を行った結果、改変 PAT タンパク質には *N*-グリコシル化部位が存在する可能性は確認されてございません。一方、Cry2Ae タンパク質には、*N*-グリコシル化部位が 12 箇所存在する可能性があることが確認されてございます。しかしながら、グリコシル化は小胞体中で行われる反応でありまして、本系統の *cry2Ae* 遺伝子は小胞体への移行シグナルをコードする配列を持たないこと、また、糖タンパク質染色分析におきまして、タンパク質が染色されなかったということから、改変 PAT タンパク質及び Cry2Ae タンパク質が、ワタ植物体中でグリコシル化される可能性は極めて低いと考えられるということでございます。

以上、(1) ~ (4) までの事項を総合的に検討しました結果、改変 *bar* 遺伝子産物であります改変 PAT タンパク質と *cry2Ae* 遺伝子産物であります Cry2Ae タンパク質はアレルギー誘発性は示さないと判断されたということでございます。

70 ページ「5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項」。安定性を確認するため、本系統の 4 世代につきまして、葉から抽出しました DNA について、図 6.26 に示しましたプローブを用いまして、サザンブロット分析を行ってございます。この結果、すべての世代におきまして、表 6.12 に示しましたように、すべてのサイズの断片が確認されまして、本系統に挿入された DNA は世代間で安定して伝達されることが確認されてございます。

71~72 ページがサザンブロット分析の結果になってございます。

73 ページ「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」。

「PAT タンパク質」。

「(1) 各種類縁体に対する親和性」。PAT タンパク質の各種類縁体に対する親和性が表 6.13 に示してございます。L-グルホシネートからリンに直接結合したメチル基がなくなったジメチルーグルホシネートにおきましては、Km 値が約 33 倍で親和性が顕著に減少すること。そのほか、表に示した類縁体に関しましても、Km 値が L-グルホシネートより非常に大きくなっているという結果が 6.13 に示されてございます。

表の下の a の注に書いてございますように、ピアラフォスに関しましては、見かけ上反応が生じているように見えますが、L-グルホシネートの微量混入のせいであると思われるという記載がございます。

74 ページ「(2) PAT 酵素反応に対する各種アミノ酸の阻害作用」。PAT の基質であります L-グルホシネートは L-アミノ酸に分類されることから、PAT の基質になります可能性がある物質として考えられるのはアミノ酸ということでございまして、各種 L-アミノ酸を用いまして、競合アッセイを実施してございます。その結果、L-グルホシネートによるアセチル基転移反応に影響は認められなかったことから、L-グルホシネートとの競合は見られなかったということでございます。このことから、PAT タンパク質は生体内に存在する L-アミノ酸を基質としてアセチル基転移を行うことはないと考えられるということでございます。

以上の検討から、PAT タンパク質は非常に高い基質特異性を有しまして、L-グルホシネート以外に GHB119 系統中で基質となる物質は考えられず、ワタが持っている本来の代謝経路に影響を与える可能性は極めて低いと考えられるということでございます。

Cry2Ae タンパク質につきましては、このタンパク質が酵素活性を持つという報告はございませんで、宿主の代謝系から独立して機能しているため、宿主の代謝系に影響し、新たに有害生理活性物質を産生するおそれはないと考えられるということでございます。

75 ページ「7. 宿主との差異に関する事項」。本系統と宿主の栄養成分及び有害生理活性物質の分析を行ってございます。スペインにおきまして、2007 年、2008 年の 16 試験値で典型的なワタ栽培条件で処理されたものを用いてございます。成分データの統計学的解析は、本系統未処理区と宿主 Coker312 区及び GHB119 系統の未処理区と Coker312 区において、試験地ごとに t 検定による統計解析を行いまして、有意差が確認された試験地は全試験地の過半数を示すかどうかを確認してございます。有意差が確認された試験地が過半数を示した場合、差異はないという評価にしたということでございます。

76 ページ「(1) 一般成分」。表 6.14 が結果になってございまして、粗タンパク質、炭水化物、中性デタージェント繊維につきまして、過半数の試験地で有意差が認められたか、同数だったという結果になってございまして、いずれの分析値も平均は文献値の範囲内であったということでございます。

77 ページ「(2) 主要無機塩類及び総トコフェロール」。結果は表 6.15 に示されてございますが、カルシウム、マグネシウムにつきまして、有意差が確認された試験地数と確

認められなかった試験地数が同数でございました。しかし、いずれも得られた分析値の平均値は文献値の範囲内であったということでございます。

78 ページ「(3) 有害生理活性物質」。表 6.16 に結果が示されてございますけれども、ステルクリン酸、ジヒドロステルクリン酸につきましては、過半数の試験地で有意差が認められたということでございます。これらについても平均はいずれも文献の範囲内ということでございます。

79 ページ「(4) アミノ酸」。シスチン、メチオニン、チロシン以外につきましては、過半数の試験地で有意差が認められたが、同数でございます。ヒスチジン、セリン、トリプトファンにつきましては、同数であったということでございます。しかし、いずれの項目におきましても、分析値の平均は文献値の範囲内でございます。

80 ページ「(5) 脂肪酸」。オレイン酸、リノール酸におきまして、過半数の試験地で有意差が認められてございます。これらにつきましては、平均値は文献値の範囲内であることから、栄養学的に問題が生ずる差ではないと考えるということでございます。リグノセリン酸は、いずれにおきましても文献値を下回っておりますが、相対的存在量が低いということになってございます。

81 ページ。脂肪酸の含有量になってございます。

82 ページ「8. 諸外国における認可、食用等に関する事項」。本系統は掛け合わせの系統の交配親として使用されるため、単独で商品化する予定はないということです。よって、米国及びカナダにおきまして、単独での承認申請を行ってございません。

以下は、米国及びカナダにおけます GHB119 系統と T304-40 系統の掛け合わせ系統の申請状況となっております。米国におきましては、2008 年 11 月に USDA、2008 年 12 月に FDA にそれぞれ申請を行ってございます。2009 年 4 月に EPA にも申請が行われてございます。カナダでは 2008 年 12 月に Health Canada 及びカナダ食品検査庁に申請が行われてございます。

「9. 栽培方法に関する事項」。従来の栽培方法と相違はないということでございます。

「10. 種子の製法及び管理方法に関する事項」。従来のワタ品種と同様の方法を適用しているということでございます。

第 7 は、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おり、安全性に関するその他の試験は必要ないと考えられるということでございます。

以上です。

○澤田座長 それでは、ただいまの申請書につきまして、項目ごとに御意見をいただきたいと思っております。

まず第 1 ～第 4、申請書の 9 ページまでで御意見がありましたら、お願いしたいと思います。

○鎌田専門委員 5 ページの「5. 病原性外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項」の書き方で、「それらが人や動物に感染することは知られていない」と

というのは、病気が感染するわけがないので、それらの原因となる植物病原菌とかいうことをきちんと書いていただいた方がいいと思います。

○澤田座長 それは直していただきます。ほかによろしいでしょうか。

それでは、次に第5で10～18ページにわたります。この部分に関しまして、御意見がありましたら、コメントをお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 今回使われている遺伝子ですが、改変 *bar* 遺伝子の方は言わば評価済みということになっていますね。そうすると、*cry2Ae*の方が新しい遺伝子ということだと思います。これまでも *Bt* タンパクの場合、ドーズベースとは言っても、ある程度は特異性とかを見て、担保するようなデータを出してもらっていたかと思います。

今回は12ページに、*Bt* タンパクはみんな一緒ですよという書き方が少し書いてあるだけなので、これは名前前のネーミングからすると、これまでの *cry2A* と近いだろうと思いますが、この *cry2Ae* に関しても今まで言われているような特異的な受容体に結合して、イオンチャンネルを形成して穴を開けてということは、こういう作用機作で特異性が担保されると考えていいという根拠をもう少し丁寧に説明してもらった方がいいのではないかと思います。

○澤田座長 今まで *cry1* と *cry3* が既に出てきていまして、*cry2* は今回初めてかなと思います。選択性とか作用機作に関して、もう少し情報を追加していただいた方がよろしいかと思います。ほかによろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 18ページの図ですが、系統の確認の仕方を見ると、T1、T2、T3のところ初めてサザン等でコピー数やT-DNAの中、外骨格を調べているのですが、T0から全然別に発生した、多分商業的に一番使う部分については、そのデータはどこでも取っていません。特にT-DNAの領域外に関するデータは全く取っていないので、これだとT-DNA領域外が商業品種になるべき右側の方で全く保証されていないことになってしまうので、どこでやるのがいいのかは難しいのですが、今さらT0に戻れるのかどうか分かりませんが、本当はF1くらいのところに戻してデータを出していただかないと、保証がどこでも取れなくなってしまうので、そこだけはすごく気になるところです。

○澤田座長 18ページの図5.3の右側のラインで、いわゆる(b)のテストをどこかでやらないと困りますね。

○鎌田専門委員 そのとおりですね。最低限それだけはしていただかないと。

○澤田座長 ほかはいかかでしょうか。それでは、第6は長いのですが、19～46ページの真ん中までで、コメントがありましたら、お願いしたいと思います。

○児玉専門委員 36ページ目にノーザンハイブリダイゼーションで4,000 ntのバンドが検出されましたということで、ここは多分RNAの変性が不十分だったからでしょうということが書いてありますが、30ページ目でも長いバンドがあって、こちらは読み過ぎしだと言っています。読み過ぎしの方はデータを見るとそうかなと思える節はあるのですが、4,000 ntの方のRNAの変性はそうかなとは思えないというか、根拠を示してほしい。単に変

性が不十分だから長いよと言われただけでは、そうですかとは思えないので、根拠を示してほしいと思います。

○澤田座長 それは根拠を出していただくということにします。ほかによろしいでしょうか。

続きまして、83 ページまで第 6、第 7 にわたりまして、コメントがありましたらお願いしたいと思います。

○手島専門委員 64 ページになります。これは PAT タンパク質に関しては以前からあるタンパク質ということで、Cry2Ae に関しては新しいタンパク質ということで、こちらの加熱処理の方もデータを正確に出していただきたいと思います。加熱処理はアレルギー性試験の中で入れているというのは、熱によって抗体との反応性がどうなるかを見るのが目的ですが、64 ページで Cry2Ae に関しては 60℃、60 分あるいは 90℃、90 分処理でタンパクが見えなくなるので、凝集が生じているのだろうと書いてあるのですが、凝集が生じているということの一つの根拠。

あとはウェスタンブロットでのデータになりますが、67 ページは殺虫活性のデータがありますが、抗体との反応性という意味では、ELISA 法を使ったようなデータも併せて出していきたいと思いました。

○澤田座長 多分これは沈殿ができていると言いたいのだと思います。

○手島専門委員 沈殿ができていということのデータを示していただきたいです。

○澤田座長 これはオリジンを見るか、遠心をするということですか。

○手島専門委員 はい。

○澤田座長 ウェスタンブロットは ELISA を追加してやってほしいということですか。

○手島専門委員 そうです。

○澤田座長 ほかにコメントはございますか。

○児玉専門委員 47 ページの(3)の同一性の確認のところの添付資料を見てみたのですが、こちらには載っていないのですが、植物体から取った Cry2Ae と *B. thuringiensis* でつくらせた Cry2Ae の SDS-PAGE とウェスタンが載っていますが、植物側から取った方には高分子の方に 130 か 140 kDa くらいのところにきれいなバンドがウェスタンで出てきまして、それを読むとダイマーだと書いてありますが、本当にそれはダイマーなのか。植物体の中でダイマーが形成されているのかどうか。小さい方の分子量にも 17~18 kDa のところにバンドが出てきてしまうのですけれども、今まで考えてみると植物体の中でどういうタンパク質ができていのかは、この委員会でもあまり見ていなかったと言えは見ていなかったのですが、添付資料に載ってしまっているのも、植物体の中でできているタンパク質の高分子と低分子のものが本当にダイマーと分解産物と言っているのかどうかを示してほしいと思います。*B. thuringiensis* から取った方のタンパク質にはきれいに何もないので、ダイマーが試験管の中で形成されにくいということなのかもしれませんけれども、そこら辺をもう少し根拠を示してほしいと思います。

○澤田座長 それは一応きちんと示した方がいいかと思います。ほかに全体を通じて、前に戻っていただいても結構ですので、何かありましたら、お願いしたいと思います。

ちょっとだけ気になったことは安定性のところですが、レストリクシオンエンザイムを1個しか使っていないのですが、これはいいのでしょうか。

○鎌田専門委員 何とも言えないのですが、基本的にはプローブを、一応全領域を使ってやっではいるので、パターンの的に合っていれば、一応、全 T-DNA としてはカバーされたとは見ていました。

○澤田座長 わかりました。ほかにございますか。

○児玉専門委員 非常に細かいところですが、73 ページの(1)の親和性の上から8行目に「ジメチル-グルホシネート」と出てきますが、これは多分「デメチル」です。「ジ」と「デ」では意味が違うので、下を見るとメチルが取れている「デメチル」になっています。

○澤田座長 これはどちらが正しいかわからないので、確認していただきたいと思います。よろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 この人工腸液の分解で、ほとんど壊れていないですね。今までのものは一部切れて、コアのところが残るので、今までのものと違うのかなという気がします。最初の特異性なども関わりますが、これはつまりこれまでのタイプと構造的にかなり違うと考えていいのかも確認したいと思います。

○澤田座長 これは前半だけにして、全長ではないので、最初から短いのだと思います。ですから、トリプシンとかキモトリプシンで切っても、ちょっとしか切れない訳です。ほかによろしいでしょうか。

それでは、何点か御意見をいただきましたので、先生方からいただきました意見等、確認事項を指摘事項案としてとりまとめまして、確認いただいた上で厚生労働省を通じて申請者に対して指摘を出したいと思います。

それでは、ワタ T304-40 も大分似た点が多いかとは思いますが、そこまで行く時間がないので、議題(1)に関しましては、これまでにしたいと思います。

議題「(2)その他」でありますけれども、事務局から何かありますでしょうか。

○松尾係長 特にございません。

○澤田座長 それでは、本日の議題に関しましては、これで終了ということになります。今後の予定につきまして、事務局からお願いしたいと思います。

○松尾係長 次回4月の調査会ですが、日程調整をさせていただきました結果、4月25日月曜日の午後を予定しておりますので、日程の確保等をよろしく願いいたします。

○澤田座長 それでは、次回4月25日の午後ということでよろしく願いします。

以上をもちまして「遺伝子組換え食品等専門調査会(第89回)」を閉会いたします。