

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統」に係る食品健康影響評価(平成 24 年 4 月 6 日付け厚生労働省発食安 0406 第 2 号)については、平成 24 年 4 月 25 日に開催された第 103 回遺伝子組換え食品等専門調査会(座長:澤田純一)において審議され、審議結果(案)が取りまとめられた。

審議結果(案)については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

- ### 2. 「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統」の食品健康影響評価についての意見・情報の募集について
- 上記品目に関する「審議結果(案)」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 24 年 7 月 23 日(月)開催の食品安全委員会(第 440 回会合)の翌日の平成 24 年 7 月 24 日(火)から平成 24 年 8 月 22 日(水)までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール(ホームページ上)、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び
除草剤グリホサート耐性トウモロコシ
MON87427 系統

2012年7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.....	5
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.....	6
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.....	7
第4. ベクターに関する事項.....	7
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.....	8
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.....	9
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.....	11
第6. 組換え体に関する事項.....	11
1. 遺伝子導入に関する事項.....	11
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事	

項.....	13
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	13
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.....	15
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.....	15
7. 宿主との差異に関する事項.....	15
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	16
9. 栽培方法に関する事項.....	17
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	17
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.....	17
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	17
<参照>.....	17

<審議の経緯>

2012年4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0406第2号）、関係書類の接受

2012年4月12日

第427回食品安全委員会（要請事項説明）

2012年4月25日

第103回遺伝子組換え食品等専門調査会

2012年7月23日

第440回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2012年6月30日まで

小泉直子（委員長）

熊谷 進（委員長代理）

長尾 拓

野村一正

畑江敬子

廣瀬雅雄

村田容常

2012年7月1日から

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>

澤田純一（座長）

鎌田 博（座長代理）

五十君静信 手島玲子

宇理須厚雄 中島春紫

橘田和美 飯 哲夫

児玉浩明 和久井信

澁谷直人

要 約

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 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行った。

本系統は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できるとされている。本系統に導入された *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せは改変 CP4 EPSPS タンパク質を組織特異的に発現させ、特定の雄性生殖組織では発現されないか、発現されても微量である。そのため、雄性生殖組織は除草剤グリホサートに耐性を持たず、グリホサート散布条件下で雄性不稔の形質を有することとなる。

「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、挿入遺伝子の供与体の安全性、挿入遺伝子が発現するタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、挿入遺伝子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の比較の結果等について確認した結果、非組換えトウモロコシ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誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 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：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統

性質：除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 系統」(以下「トウモロコシ MON87427」という。)は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できるとされている。本系統に導入された *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せは改変 CP4 EPSPS タンパク質を組織特異的に発現させ、特定の雄性生殖組織では発現させないか、発現させても微量である。そのため、雄性生殖組織は除草剤グリホサートに耐性を持たず、除草剤グリホサート散布条件下で雄性不稔の形質を有するとされている。

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、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Zea mays* L.) のデント種である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、*Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現する。

改変 *cp4 epsps* 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

トウモロコシの栽培起源は、およそ紀元前 5,000 年前と考えられている。その後、育種、品種改良が行われ、紀元前 3,000 年～1,500 年頃には、現代の栽培型に近いトウモロコシが本格的に栽培されるようになった。現在、トウモロコシは小麦、イネと並ぶ三大穀物の一つであり、世界各地で栽培されている。

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

トウモロコシ種子（デント種）の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 6.2～17.3%、総脂質 1.7～5.8%、総食物繊維 8.8～35.3%、灰分 0.6～6.3%、炭水化物 77.4～89.5%である（参照 1）。

- (2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

トウモロコシ種子（デント種）の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.1～1.6%、ラフィノース 0.02～0.32%である（参照 1）。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

- (1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

トウモロコシ MON87427 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (2) 摂取（可食）部位

トウモロコシ MON87427 の摂取部位は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (3) 摂取量

トウモロコシ MON87427 の摂取量は、従来のトウモロコシ（デント種）と変わらない。

- (4) 調理及び加工方法

トウモロコシ MON87427 の調理及び加工方法は、従来のトウモロコシ（デント種）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

トウモロコシ MON87427 は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の導入によって、改変 CP4EPPSPS 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により、トウモロコシ MON87427 の安全性評価においては、既存のトウモロコシ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

トウモロコシ MON87427 は、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子が改変 CP4

EPSPS タンパク質を発現することによって、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することができるとされている。

また、導入された *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せは、特定の雄性生殖組織において改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現させないか、発現させても微量であり、本系統は除草剤グリホサート散布条件下で雄性不稔となるとされている。この形質を利用して、ハイブリッド種子生産における雌親として用いられる。

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、イネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシ (*Z. mays* L.) のデント種である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの植物学的起源についての決定的な説はないが、育種過程でテオシントから派生した説が有力とされている。トウモロコシの育種は、古くから集団選抜法が行われていたが、1920年代に一代雑種トウモロコシの育種方法が生まれ、様々な品種が作出された。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシ種子には、フィチン酸、ラフィノースが含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

トウモロコシによるアレルギー誘発性の報告は少なく、重要なアレルギー誘発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

トウモロコシには、ウイルス、細菌及び糸状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

トウモロコシは、食品分野においてコーン油、コーンフレーク、コーングリッツ等の原料として幅広く利用されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種には、*Tripsacum* 属及び *Zea* 属に分類されるテオシントがあるが、いずれも安全性に懸念があるとの報告はない。また、テオシントは現在の栽培用トウモロコシの起源であると考えられており、栽培用トウモロコシに至る過程で摂取された経験がある。

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

トウモロコシ MON87427 の作出に使用した導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の構築にはベクターB が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

ベクターB の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

ベクターB の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ベクターB の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

ベクターB にはアンピシリンに対して耐性を付与する *blaTEM* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターB には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに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 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は *Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株が属する *Agrobacterium* sp. は、ヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

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 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現が最適となるように *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列を改変することによって構築された遺伝子である。クローニングの過程で、*cp4 epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

挿入 DNA の構成要素は表 1 のとおりである。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入遺伝子の塩基数、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 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする改変 CP4 EPSPS タンパク質は、CP4 EPSPS タンパク質の改変タンパク質である。CP4 EPSPS タンパク質は、EPSPS 活性を阻害する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 2)。

なお、トウモロコシ MON87427 に導入された *e35S* プロモーターと *hsp70* イントロンの組合せによって、特定の雄性生殖組織において改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現させないか、発現させても微量である。

改変 CP4 EPSPS タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース (TOX_2010¹) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 3)。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PV-ZMAP1043 はストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有するが、トウモロコシ MON87427 には導入されていないことがサザンブロット分析によって確認されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルスの CaMV 35S プロモーターを基に作製された *e35S* プロモーターである (参照 4)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域である (参照 5)。

(3) その他

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、発現を高めるためにトウモロコシの熱ショックタンパク質 70 遺伝子由来の *hsp70* イントロンが挿入されている

¹ TOX_2010: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版, 2009 年 12 月 15 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) をもとに作成したデータベースで、8,448 配列のサブセット。

(参照 6)。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質を細胞質から葉緑体へ移動させるために、シロイヌナズナの 5-エノールピルビルシキミ酸合成酵素 (EPSPS) をコードする *ShkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする *CTP2* 標的配列が挿入されている (参照 7,8)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの構成 DNA 及び *hsp70* イントロン配列を含むプラスミドにベクター B に含まれる *e35S* プロモーター配列を挿入後、ベクター F 由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び *CTP2* 標的配列と置き換えることによって、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 が作製された。

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 PV-ZMAP1043 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 PV-ZMAP1043 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

導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の意図する挿入領域は、左側境界領域 (LB) から右側境界領域 (RB) 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 PV-ZMAP1043 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表 1 トウモロコシ MON87427 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>e35S</i> プロ	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列)

モーター	カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター配列
<i>hsp70</i>	トウモロコシの熱ショックタンパク質遺伝子由来のイントロン
<i>CTP2</i>	シロイヌナズナの EPSPS タンパク質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS タンパク質をコードする遺伝子
<i>nos</i> ターミ ネーター	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の <i>nos</i> 遺伝子の 3' 非翻訳領域
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した後、グリホサートを添加した培地で選抜して再生個体が得られた。次に、優良トウモロコシ自殖系統との戻し交配及び自殖を行い、自殖により得た個体について、定量 PCR 分析によりホモ接合体を選抜した後、一般的なトウモロコシの育成プロセスにしたがって、既存の品種との戻し交配及び自殖を行い、トウモロコシ MON87427 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

トウモロコシ MON87427 のゲノムに挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることが確認された（参照 9）。

導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の外骨格領域が導入されていないことを確認するために、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は導入されていないことが確認された（参照 9）。

トウモロコシ MON87427 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-ZMAP1043 の T-DNA 領域と比較した結果、LB 領域の 190 bp の欠損及び RB 領域の 321 bp の欠損を除き、塩基配列は一致することが確認された（参照 9）。

トウモロコシ MON87427 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、トウモロコシ MON87427 の塩基配列に基づいて、5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列に対して挿入 DNA を挟むようにプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、宿主である非組換えトウモロコシのみに特異的な PCR 産物が増幅された（参照 9）。また、増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、トウモロコシ MON87427 の 5' 末端近傍配列及び 3' 末端

近傍配列の塩基配列と比較した結果、DNA の挿入に伴う 140 bp の欠失、5'末端近傍配列の DNA 断片 (41 bp) の挿入及び 3'末端近傍配列の DNA 断片 (24 bp) の挿入を除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主ゲノムの塩基配列は一致した (参照 9)。これらのことから、挿入 DNA の近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された。

トウモロコシ MON87427 のゲノムに DNA を挿入すること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 (962 bp)、欠失した 140 bp 及び 3'末端近傍配列 (1,068 bp) について、公的に利用できる EST データベース (EST_2011²)、核酸データベース (NT_2011³)、アミノ酸配列データベース (NR_2011⁴) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索においていくつかのトウモロコシ由来の配列と相同性が認められたが、これらの配列と欠失した 140 bp を含む DNA 挿入領域との相同性は示されなかった (参照 10)。また、blastx 検索において、相同性を示す既知のトウモロコシ由来のタンパク質は見いだされなかった (参照 10)。したがって、DNA の挿入によって既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた。

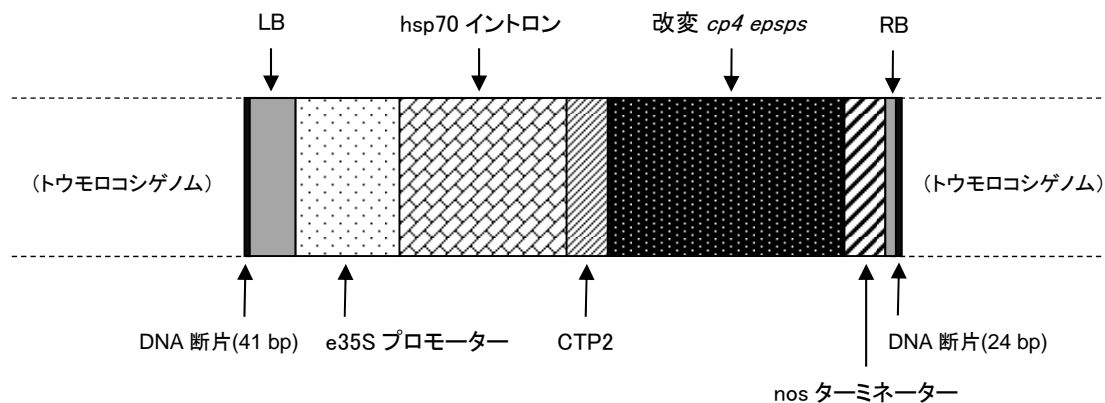


図1 トウモロコシ MON87427 に挿入された DNA (模式図)

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

トウモロコシ MON87427 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (1,003 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,092 bp) との接合部において意図しない ORF が生じ

² EST_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) EST 配列のデータベースで、64,526,527 配列のサブセット。

³ NT_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) 塩基配列のデータベースで、10,498,010 配列のサブセット。

⁴ NR_2011 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2009 年 12 月 31 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、10,272,453 配列のサブセット。

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 8 アミノ酸以上の ORF が 14 個見いだされた（参照 11）。14 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース（AD_2010⁵）、毒性タンパク質データベース（TOX_2010）及びタンパク質データベース（PRT_2010⁶）を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質及びアレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2010 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配列は見いだされなかった（参照 11）。

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

トウモロコシ MON87427 の葉、根、地上部、穀粒、茎葉、絹糸及び花粉について、改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析を行った。結果は表 2 のとおりである（参照 12）。

表 2 トウモロコシ MON87427 における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量
(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)

分析組織*	改変 CP4 EPSPS タンパク質
葉	17~140
根	4.9~29
地上部	8.3~66
穀粒	2.6~5.3
茎葉	5.9~26
絹糸	8.1~11
花粉	検出限界以下**~1.1

* 葉は 2 葉期~雄穂抽出期、根は 2 葉期~成熟期、地上部は 2 葉期~黄熟期、穀粒は収穫期、茎葉は成熟期、絹糸及び花粉は受粉期の値を示した。

**検出限界は 0.099 $\mu\text{g/g}$ である。

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

日本人一人が一日に摂取するトウモロコシ及びトウモロコシ加工品の摂取量 0.5 g (参照 13) をすべてトウモロコシ MON87427 に置き換えて改変 CP4 EPSPS タンパク質の摂取量を計算すると、1.8 μg となり、一人一日当たりのタンパク質

⁵ AD_2010: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、1,471 配列のサブセット。

⁶ PRT_2010: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版, 2009 年 12 月 15 日) に登録されているタンパク質のアミノ酸配列から構成されるデータベースで、17,815,538 配列のサブセット。

摂取量 69.8 g (参照 13) に占める割合は 2.6×10^{-8} となる。したがって、一日蛋白質摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

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 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 CP4 EPSPS 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

Escherichia coli で発現させた改変 CP4 EPSPS の人工胃液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析においては、試験開始後 15 秒以内に消化されることが確認された。ウェスタンブロット分析においても、試験開始後 15 秒以内に消化されることが確認された (参照 14)。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始後 10 分以内に 50%以上が消化され、100 分で完全に消化されることが確認された (参照 15)。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS 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、ELISA 分析を行った結果、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、75°C、15 分間及び 30 分間の加熱処理に対して免疫反応性が失われることが確認された (参照 16)。

(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 CP4 EPSPS タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、AD_2010 を用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見いだされなかった (参照 3)。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2010 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配列は見いだされなかった (参照 3)。

上記（１）～（４）及び前項３から総合的に判断し、改変 CP4 EPSPS 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

挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ MON87427 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 9）。

また、改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現の安定性を確認するために、5 世代のトウモロコシ MON87427 の葉及び穀粒についてウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの世代でも発現していることが確認された（参照 17）。

さらに、トウモロコシ MON87427 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のトウモロコシ MON87427 について除草剤グリホサート散布試験を行い、挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが示された（参照 18）。

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 CP4 EPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路（芳香族アミノ酸合成経路）の律速酵素ではなく、EPSPS 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。また、改変 CP4 EPSPS 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）と特異的に反応することが知られている。したがって、改変 CP4 EPSPS 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。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたトウモロコシ MON87427 と宿主である非組換えトウモロコシについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、二次代謝産物及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 19）。

（１）主要構成成分

穀粒及び茎葉の主要構成成分（水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維、総食物繊維（穀粒のみ））について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

（２）脂肪酸組成

穀粒の脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、8 種類については、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。残りの 14 種類については定量限界以下であった。

(3) アミノ酸組成

穀粒のアミノ酸 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トウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ミネラル類

穀粒のミネラル類（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、亜鉛）及び茎葉のミネラル類（カルシウム、リン）について分析を行った結果、ナトリウム以外は対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。ナトリウムについては定量限界以下であった。

(5) ビタミン類

穀粒の葉酸、ナイアシン、ビタミン A、ビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ビタミン E について分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(6) 二次代謝産物

穀粒のフェルラ酸、*p*-クマル酸及びフルフラールについて分析を行った結果、フェルラ酸及び *p*-クマル酸については、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差は認められなかった。フルフラールについては定量限界以下であった。

(7) 有害生理活性物質

穀粒のフィチン酸及びラフィノースについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えトウモロコシとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業トウモロコシ品種（デント種）の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、2010 年 12 月に米国食品医薬品庁（FDA）に対する食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2010 年 10 月に米国農務省（USDA）に対する無規制栽培のための申請が行われた。

カナダにおいては、2011 年 1 月にカナダ保健省（Health Canada）に対する

食品としての安全性審査の申請が行われ、2011年1月にカナダ食品検査庁(CFIA)に対する飼料・環境の安全性審査の申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、2011年8月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)に対する食品としての安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

トウモロコシ MON87427 の栽培方法は、生育期に除草剤グリホサートを使用できることを除いて、従来のトウモロコシ(デント種)と同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

トウモロコシ MON87427 の種子の製法及び管理方法は、従来のトウモロコシ(デント種)と同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6までにより、安全性の知見が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「除草剤グリホサート誘発性雄性不稔及び除草剤グリホサート耐性トウモロコシ MON87427 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ものと判断した。

なお、トウモロコシ MON87427 は雄性不稔の形質を利用してハイブリッド種子の生産に利用されることから、今後、トウモロコシ MON87427 を用いた遺伝子組換え植物との掛け合わせ品種の安全性評価の際には、追加のデータを求める場合がある。

<参照>

- 1 ILSI. Crop Composition Database. International Life Science Institute, 2007. <http://www.cropcomposition.org>.
- 2 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York.
- 3 Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases (MSL0022522) (社内報告書)
- 4 Odell, J. T., Nagy, F., Chua, N. H. Identification of DNA sequences required for

- activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985, 313, 810-812.
- 5 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Reseach* 11: 369-385.
 - 6 Brown, S.M. and C.G. Santino. 1997. Enhanced expression in plants. Patent 5,593,874, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
 - 7 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
 - 8 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442
 - 9 Molecular Characterization of MON 87427 (MSL0021822) (社内報告書)
 - 10 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87427: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0023321) (社内報告書)
 - 11 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87427: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0022911) (社内報告書)
 - 12 Assessment of CP4 EPSPS Protein Level in Corn Tissues Collected from MON 87427 Produced in U.S. Field Trials During 2008 (MSL0022370) (社内報告書)
 - 13 健康・栄養情報研究会編、2010 国民健康・栄養の現状 平成 19 年国民健康・栄養調査報告 第一出版
 - 14 Assessment of the in vitro digestibility of purified E. coli-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL17566) (社内報告書)
 - 15 Assessment of the in vitro digestive fate of CP4 EPSPS synthase (MSL12949) (社内報告書)
 - 16 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764) (社内報告書)
 - 17 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Corn Leaf and Seed Samples of MON 87427 Across Multiple Generations by Western Blot Analysis (MSL0022026) (社内報告書)
 - 18 Heritability and Stability of Coding Sequences Present in MON 87427 Across Multiple Generations (RPN-09-275) (社内報告書)
 - 19 Compositional Analyses of Corn Forage and Grain of MON 87427 Treated with Glyphosate Grown in the United States during the 2008 Field Season (MSL0022340) (社内報告書)