

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第115回会合議事録

1. 日時 平成25年6月6日（木） 14：00～15：59

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

- ・LEU-No.3株を利用して生産されたL-ロイシン
- ・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（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、宇理須専門委員、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、和久井専門委員

(食品安全委員会委員)

佐藤委員、山添委員

(事務局)

本郷事務局次長、山本評価第二課長、池田評価情報分析官、北村課長補佐、小倉係員、松井技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①LEU-No.3株を利用して生産されたL-ロイシン
- ②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（食品）
- ③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（飼料）

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただ今から第 115 回遺伝子組換え食品等専門調査会を開催いたします。

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」に基づいて非公開で行います。

本日の議題であります、新規の品目で LEU-No.3 株を利用して生産された L-ロイシン、それから除草剤アシ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、これは食品と飼料、以上の安全性についての審議となります。

それでは、お手元の資料の確認をいたしたいと思います。事務局からお願いします。

○北村課長補佐 配布資料を確認させていただきます前に、事務局の組織再編に関わる御報告をさせていただきます。

5 月 16 日付で評価課が評価第一課と評価第二課に分かれました。評価第一課は、添加物、農薬等の化学物質系、評価第二課は、動物用医薬品、プリオン等の主に生物系となりました。遺伝子組換え食品等の担当は評価第二課に所属することとなっております。この組織再編に伴いまして、評価課長の磯部は評価第一課長となりまして、勧告広報課長でございました山本が評価第二課長として着任してございます。

○山本評価第二課長 今度、評価第二課長になりました山本と申します。よろしく申し上げます。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして配布資料の確認をさせていただきます。

配布資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料といたしまして、食品健康影響評価に関する資料となっております。これら以外の参考資料につきましては、ファイルに綴じまして委員の皆様のお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、調査会終了後回収させていただき、次回また配布いたします。

不足等ございましたら、事務局までお願いいたします。

○澤田座長 それでは、事務局から「食品安全委員会における調査・審議方法等について」に基づき必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告をお願いします。

○北村課長補佐 本日の議事に関します専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただいた確認書を確認いたしましたところ、平成 15 年 10 月 2 日委員会決定の 2 の (1) に規定する「調査・審議等に参加しないこととなる事由」に該当する専門委員はいらっしゃいません。

以上でございます。

○澤田座長 提出いただきました確認書について、その後、相違等ございませんでしょうか。

それでは、早速、議題 1 の審議に入らせていただきたいと思います。

まず、LEU-No.3 株を利用して生産された L-ロイシンについてであります。

事務局から御説明をお願いします。

○小倉係員 それでは、説明させていただきます。

お手元にピンクのファイルをお願いいたします。

LEU-No.3 株を利用して生産された L-ロイシンについてでございます。

ページをめくっていただきまして、資料本文の 1 ページをお願いいたします。

1. L-ロイシンの食品添加物としての概要でございます。

L-ロイシンは、食品添加物公定書に記載された既存添加物に該当いたしまして、成分規格は下記のとおりとなっております。

めくっていただきまして、3 ページ目からが今回の遺伝子組換え株の説明となります。

2. L-ロイシンの製造方法の概要でございます。

L-ロイシン生産菌 *E. coli* LEU-No.3 株は、生産能力が向上した生産菌株を構築することを目的として、平成 19 年に安全性審査された LEU-No.1 株の構築途中株 2805 株を基に改変して作成され、平成 23 年に安全性審査された LEU-No.2 株を更に改変したものでございます。

改変の概略につきましては、資料中段のところにあるとおりでございます。

こちらの LEU-No.1 株、LEU-No.2 株につきましては、*E. coli* K-12 株由来の突然変異株を宿主として、L-ロイシン生合成関与遺伝子の導入、プロモーター配列の導入等を行っております。

2805 株と LEU-No.2 株の作製方法の概略につきましては、こちらの 3 ページから 5 ページまで記載されておりました、以前提出されたものと同様でございます。

6 ページをお願いいたします。

LEU-No.3 株の作製方法でございます。

親株は、LEU-No.2 株としておりました、各ベクターについてでございますけれども、各遺伝子の組込みにおいては、mini-Mu を使用するか、あるいは相同組換えを利用した方法を使用しております。構築途中においては一時的にヘルパープラスミドを使用しておりますが、LEU-No.3 株では除去されております。

(3) 挿入遺伝子についてでございますけれども、*E. coli* K-12 株を由来とする L-ロイシン生合成経路に関与する遺伝子を 3 つ挿入しております。変異型●●●遺伝子は、1 塩基 (1 アミノ酸残基) が置換されておりました、●●●されております。こちらの変異型の遺伝子は突然変異型より単離したものでございます。また、●●●遺伝子及び変異型●●●遺伝子の上流には、*E. coli* K-12 株由来の●●●遺伝子のプロモーターを導入してございます。

(4) プロモーターについてでございますけれども、こちらは *E. coli* K-12 株由来の DNA、*E. coli* を宿主とするバクテリオファージ由来の DNA よりなるものでございます。

有害な影響を及ぼす可能性が低いか、または生理活性を有さない配列であると考えられると記載されてございます。

(5) LEU-No.3 株に関しては、以上の改変に加えまして、●●●オペロン遺伝子上流配列の *E. coli* 由来●●●プロモーターである●●●プロモーターへの置換、●●●遺伝子上流へのバクテリオファージ●●●由来の●●●プロモーター配列の挿入、●●●オペロン遺伝子上流への *E. coli* K-12 株由来の●●●遺伝子のプロモーター配列の挿入を行っております。

なお、こちらの生産菌株は、抗生物質耐性マーカーを有しておりません。

10 ページをお願いいたします。

2-2 L-ロイシンの製造方法でございませう。

製造方法は、図 1 のとおりでございまして、発酵により得られた L-ロイシン発酵液を●●●粗製工程で●●●を得て、●●●発酵副生物を系外に除去してございませう。●●●晶析、分離することで高純度の L-ロイシンを取得するとございませう。

11 ページにまいりませう。

3. 申請品目と現行製品の品質の比較、(1) 食品添加物公定書規格分析結果でございませう。

表にありますとおり、公定書規格において、申請品目の品質は現行製品と同等と考えるということでございませう。

なお、こちらの現行製品でございませうが、LEU-No.2 株を用いて製造された製品ということでございませう。

12 ページにまいりませう。

(2) 不純物プロファイル比較結果でございませう。

先ほど申し上げた成分規格に加えまして、3 つの分析法、アミノ酸自動分析計、HPLC 法 2 モードで、申請品目と現行製品の不純物プロファイル比較を実施してございませう。

i) アミノ酸自動分析計による比較でございませうけれども、表にありますとおり、検出限界以上の新規不純物として L-イソロイシンが検出されてございませう。また、申請品目中に検出された既存不純物の中では、現行製品の最大不純物量を超えるものはなかったということにございませう。

13 ページにまいりませう。

ii) 不純物検出 HPLC-1 法による比較でございませう。

こちらは、親水性の不純物を検出することを目的としてございませうして、表にありますとおり、新規不純物は、申請品目中に検出されず、既存不純物では、現行製品の最大不純物量を超えるものはなかったということにございませう。

14 ページにまいりませうして iii) 不純物検出 HPLC-2 法による比較でございませう。

こちらは、疎水性の不純物を検出することを目的としてございませうして、分析の結果でございませうけれども、検出限界以上の不純物は、申請品目中に観察されなかったということに

ございます。

以上の結果より、申請品目中には新規不純物として L-イソロイシンが検出されましたが、L-イソロイシンは安全性が確認され、使用基準がないアミノ酸でございまして、食品添加物公定書に記載された指定添加物で有害性はないと記載されております。

15 ページにまいりまして、(3) L-ロイシン製品の残存タンパク質についてでございます。

タンパク質が残存しないことを確認するために、膜濃縮ブラッドフォード法により測定した結果、検出限界 1 ppm で、申請品目中には検出されないことを確認したということでございます。

以上より、申請品目 L-ロイシンは「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物のうち、アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」の要件を満たすと考えると記載されてございます。

説明は以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

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っております。

まず、食品添加物としての概要と、製造方法の概要までで、ページにしまして 1~10 ページまでで御意見、コメントありましたらお願いしたいと思っております。

○中島専門委員 6 ページなのですが、この挿入遺伝子で、●●●遺伝子、これは●●●なのですが、●●●遺伝子で、これで●●●されているって、これどういう機構なのかなと、少々奇異なので、できればこの点については説明していただきたいと思っております。

○澤田座長 これは説明の追加、本文に追加ですか。

○中島専門委員 本文に追加で、納得のいく説明ならいいのですが、普通、●●●ならわかるのですが、●●●となると何がどうなっているのかちょっとわからないので。

○澤田座長 ほかにいかがでしょうか。

それでは、残りの 15 ページまででコメント、御意見ございましたらお願いしたいと思っております。よろしいですか。

それでは、ただいま 1 つだけ追加の説明が要ることでもありますけれども、特に安全上の問題がないということでもありますので、引き続き評価書（案）の審議に入りたいと思っております。

事務局から御説明をお願いします。

○小倉係員 お手元にお配りしております資料の右肩に四角で「資料」と書いてある評価書（案）をお願いいたします。

ページをめくっていただきまして、1 ページ、右肩に「①」と書かれているものがこちらの申請品目の評価書（案）となります。

4 ページをお願いいたします。

22 行目、I. 評価対象添加物の概要でございます。

名称、用途、申請者、開発者については、記載のとおりとなっております。

28 行目から、本添加物は、L-ロイシンの生産性を高めるため、*E. coli* K-12 株由来の突然変異株を宿主として、L-ロイシン生合成に関与する遺伝子及びプロモーター配列の導入を行った LEU-No.3 株を用いて生産された L-ロイシンでございます。L-ロイシンは、食品添加物としての使用が認められており、成分規格が食品添加物公定書に記載されております。なお、平成 23 年に安全性評価を終了した LEU-No.2 株を基に作成されたものでございます。

宿主である *E. coli* K-12 株は、有害な影響を及ぼす毒素の産生性や病原性は知られておらず、OECD では GILSP が適用できる宿主微生物として認定されております。

また、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有しないと記載させていただいております。

39 行目、II. 食品健康影響評価でございます。

1. 本添加物は、製造工程により使用微生物及び副生成物が除去され、晶析により結晶として高度に精製されており、食品添加物公定書の含量規格を満たしていると記載させていただいております。

44 行目、2. 本添加物の非有効成分については、最終製品において、(1) タンパク質は検出限界未満、(2) 食品添加物公定書の成分比較を満たしている。(3) 分析の結果、従来品に存在しない非有効成分である L-イソロイシンが検出され、また、従来品に存在する不純物の実測値は、従来品の最大値を上回っていなかった。(4) L-イソロイシンは、食品添加物に記載されている指定添加物で、使用基準は設定されていない、と記載させていただいております。

以上の結果より、53 行目でございますけれども、「従来品と比較して既存の非有効成分の含有量が安全上問題となる程度にまで増加しておらず、かつ、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有していないと考えられる。」とさせていただいております。

57 行目、3. でございますけれども、以上の結果から、本添加物については、「添加物の安全性評価基準」の附則「アミノ酸等の最終産物が高度に精製された非タンパク質性添加物の安全性評価の考え方」に基づきまして安全性が確認されたと判断したとさせていただいております。

したがって、本添加物については、本則である「添加物の安全性評価基準」による評価は必要ないと判断したとしております。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、ただいまの評価書（案）につきまして御意見、コメントを承り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きたいと思っております。いかがでしょうか。

それでは、特に御意見がございませんので、先ほどいただきました追加説明だけ修正が

入ると思いますけれども、私と中島先生のほうで確認をして、その後、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。どうもありがとうございました。

それでは、次になりますけれども、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 系統についての審議に移りたいと思います。

事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、お手元に水色の紙ファイルをお願いいたします。

3 枚ほどめくっていただきまして、ページが 1 と振られておりますところからお願いいたします。

まず、第 1 になりますけれども、比較対象として用いる宿主等の性質に関する事項になります。

宿主でございますけれども、マメ科のダイズ、**Maverick** というものを使用しております。

DNA 供与体につきましては、改変 *aad-12* 遺伝子については、グラム陰性桿菌であります *Delftia acidovorans* MC 1 株に由来します。改変 *pat* 遺伝子につきましては、グラム陽性放線菌であります *Streptomyces viridochromogenes* に由来します。

挿入 DNA の性質等につきましては、改変 *aad-12* 遺伝子については、改変アリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼを発現しまして、これを改変 AAD-12 タンパク質と略しますが、アリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換することによりまして、アリルオキシアルカノエート系除草剤への耐性を付与します。また、改変 *pat* 遺伝子につきましては、除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することによりまして、除草剤グルホシネート耐性を付与するものでございまして、選抜マーカーとして使用されてございます。

2 の宿主の食経験につきましては、ダイズについては、豆腐、醤油等に加工されて安全な食品として長い食経験がございます。

2 ページにまいります。

宿主の構成成分等に関する事項になりますけれども、(1) で主要栄養素等、(2) で毒性物質・栄養阻害物質等の概要が記載されてございます。

4 に宿主と組換え体としての利用方法及びその相違に関する事項になりますけれども、収穫時期、貯蔵方法、摂取部位、摂取量、3 ページにまいりまして、調理・加工方法については、従来のダイズと変わらないという記載になってございます。

5 で宿主以外のものは比較対象としてございません。

6 で安全性評価において検討される相違点については、改変 *aad-12* 遺伝子により発現する改変 AAD-12 タンパク質、改変 *pat* 遺伝子により発現する改変 PAT タンパク質の産生を除きまして、従来のダイズと相違ないということでございます。

第 2 の組換え体の利用方法になりますけれども、アリルオキシアルカノエート系除草

剤と除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されておりまして、これらの除草剤を使用することができます。なお、販売する際に対象とする除草剤は 2,4-D (2,4-ジクロロフェノキシ酢酸) でありまして、グルホシネートは選抜マーカーであります。

第 3、宿主に関する事項で、分類学上の位置付け等でありまして、マメ科 *Glycine* 属のダイズ (*Glycine max*) であります。

2 の遺伝的先祖、育種開発の経緯については、3 ページの下から 4 ページにかけて記載されているとおりであります。

4 ページにまいりまして、3 の有害生理活性物質の生産に関する事項になりますが、ダイズの種子には、栄養阻害物質として、トリプシンインヒビター、レクチン、スタキオース、ラフィノース、フィチン酸、イソフラボン類が含まれてあります。

トリプシンインヒビター及びレクチンについては、加熱処理により失活することが知られてあります。そのほか、スタキオース、ラフィノースは低分子の炭水化物で、腸内でガス化し、腹部を膨満させる原因物質となること、フィチン酸については、単胃動物においてミネラル吸収を阻害することが知られている等の記載がされてあります。

アレルギー誘発性につきましては、ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要植物の一つでありまして、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あります。そのほか、ダイズの代表的なアレルゲンについて、4 ページの終わりから 5 ページに記載がされてあります。

5 ページにまいりまして、病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項になりますけれども、ほかの植物と同様に、ダイズに感染する可能性のある病原菌、病原ウイルスは存在しますが、ヒトや動物に感染することは知られておりません。

6 番の安全な摂取に関する事項ですけれども、豆腐、醤油等に加工されまして、安全な食品としての長い利用の歴史がであります。

7 番の近縁の植物種について、野生種でダイズ近縁種のツルマメがあり、ツルマメはダイズと同様に栄養阻害物質としてトリプシンインヒビターを含むことが報告されてありますが、ツルマメは食用に供されることはございません。

6 ページにまいります。

第 4 のベクターに関する事項になります。

プラスミド pDAB2407 に含まれる T-DNA 領域は、*Agrobacterium tumefaciens* に、外骨格領域は *E. coli* に由来します。

性質に関する事項になりますけれども、塩基数、塩基配列は、添付資料に示されているとおりで明らかになってあります。

(2) の制限酵素による切断地図については、図 1 に示されているとおりであります。

7 ページにまいりまして、薬剤耐性遺伝子については、スペクチノマイシン耐性遺伝子が含まれておりますが、T-DNA の外側に位置しますので、本ダイズには導入されてございません。この耐性遺伝子の有無については、サザンブロット法によりまして、本ダイズ

中に存在しないことが確認されてございます。

伝達性については、このプラスミドの伝達を可能とする配列は含まれてございません。

第5になりますけれども、挿入 DNA の供与体に関する事項になります。

名称等につきましては、記載されているとおりでございますが、*D. acidovorans* MC 1 株については、土壌や淡水中などに存在するグラム陰性桿菌でございます。分類について、*Comamonas* として単離されましたが、以下のように分類が変わっておりまして、現在は *Delftia* 属に分類されてございます。

改変 *pat* 遺伝子については、*S. viridochromogenes* に由来しまして、この菌は、土壌中に存在するグラム陽性放線菌でございます。

安全性に関する事項になります。

まず、①になりますけれども、この菌につきましては、食品産業においてフェルラ酸を香料成分であるバニリンに変換する方法が確立されているということ、医療用の生体材料として応用可能でありますポリヒドロキシアルカノエート（プラスチックの一種）を生成することが報告されているという記載になっております。

8 ページにまいりまして、日和見感染や角膜感染についての報告があるという記載がございまして。

②になりますけれども、ヒトやその他の動物に対して病原性を有するという報告はございません。

2 になります。

(1) のクローニング、合成方法につきましては、改変 *aad-12* 遺伝子は野生型をもとに植物での発現を高めるために最適化するように合成したものでございます。GC 含量を、植物における発現に適したコドンに変更してございまして、そのほか、制限酵素部位、転写を阻害する可能性がある部分を除くようにコドンが変更されてございます。なお、クローニングサイトの導入によりまして、アミノ酸配列において、N-末端側の 2 番目にアラニンが追加されてございます。

改変 *pat* 遺伝子については、開始コドン、GC 含量について、植物における発現に適したコドンに変更してございますけれども、アミノ酸配列に対しては改変されてございません。

(2) になりますけれども、塩基数と制限酵素による切断地図については明らかになってございまして、9 ページの図 2 に制限酵素切断部位を示した T-DNA 領域の図がございまして。

9 ページの (3) で、挿入遺伝子の機能に関する事項になります。

改変 AAD-12 タンパク質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素でございます。本システムのダイズについては、このタンパク質の作用によりまして、アリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換して、除草剤耐性を

示します。例えば、2,4-D を除草活性のない 2,4-DCP とグリオキシル酸に変換します。この反応につきましては、10 ページの図 3 に作用機作として化学構造とともに説明がございませぬ。

戻っていただきまして、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、除草剤活性を持つ化合物は光学異性体のないもの及び光学異性体である R 体のみであるということ、S 体については除草活性がございませぬ。この改変 AAD-12 タンパク質は、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、光学異性体のないものと S 体に特異的ということ、このダイズについては、光学異性体のある除草剤に対して耐性を持つことはございませぬ。また、改変 AAD-12 タンパク質が活性を示す除草剤のうち、現在、ダイズへの登録がされているものはございませぬ。2,4-D については、現在、米国において申請中ということとございませぬ。

10 ページにまいりまして、毒性タンパク質等との相同性になります。

アミノ酸配列の比較について、データベースが GenBank non-redundant protein データベースという記載になってございませぬけれども、詳細を申請者に確認しましたところ、non-redundant protein データベース、GenBank の CDS translation, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB というデータベースだということでした。すみませぬ、記載が漏れてございませぬ。このデータベースを用いまして、毒素タンパク質を含みます既知タンパク質のアミノ酸配列と BLASTp で相同性検索を行ってございませぬ。

その結果、幾つかのものとの相同性がみられましたけれども、毒性タンパク質に相当するものはなかつたということとございませぬ。

次のパラグラフになりますけれども、除草剤の代謝物質の安全性について確認がされてございませぬ。

まず、2,4-D ジメチルアミンを最大散布薬量であります 1,120 g ae/ha で 3 回散布をしまして、代謝について検討がされてございませぬ。その結果、種子から 0.005 mg ae/kg の 2,4-D 換算残留量の放射能が検出されてございませぬ。また、2,4-DCP と 2,4-DCP のグルコース複合体がそれぞれ 0.001 mg ae/kg 未満及び 0.021 mg ae/kg 換算残留量で検出されてございませぬ。

その次に、米国とカナダのほ場で同様に農薬を散布しまして、2,4-D と 2,4-DCP の残留量が確認されてございませぬ。その結果、2,4-D については全てのサンプルで検出限界 0.003 ppm 未満でございませぬ。2,4-DCP については、20 カ所のほ場で検出されまして、最大平均残留量が 0.047 ppm というということとございませぬ。

現在、日本では、食品としてのダイズにおける 2,4-D の暫定残留基準値が 0.05 ppm というということとございませぬ。2,4-DCP については、現在のところ規制対象とはなつてございませぬ。また、これまでに報告されております 2,4-D と 2,4-DCP の毒性評価によりまして、2,4-DCP の毒性は 2,4-D の毒性を上回らないと考えるということとございませぬ。

11 ページの 2 番目のパラグラフになりますけれども、PAT タンパク質について記載さ

れてございます。PAT タンパク質は、グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない代謝物であります N-アセチル-L-グルホシネートに変換するものでございます。

既知の毒性タンパク質と PAT タンパク質のアミノ酸配列の相同性を検討しました結果、1,063 個のタンパク質の相同性が認められまして、E-value が 0.01 以下だったものが 941 個あったということでございますけれども、これらはホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルトランスフェラーゼ、その類似のタンパク質でございまして、既知の毒素タンパク質に相当するものはなかったという記載でございまして。

12 ページにまいりまして、T-DNA 領域の遺伝要素について説明がございまして。

13 ページが抗生物質耐性マーカー遺伝子でございましてけれども、ダイズ中には、スペクチノマイシン耐性の遺伝子は存在しません。それについてはサザンブロット分析で確認されてございます。

3 になりますけれども、(1) でプロモーター、(2) でターミネーター、(3) でその他の挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列について説明がございまして。(3) で、改変 AAD-12 タンパク質の発現を安定させるために、*AtUbi10* プロモーターの上流にタバコ由来の核マトリックス領域を組込んでございまして。核マトリックス結合領域が導入遺伝子のいずれかに隣接していると、導入遺伝子の発現を高めたり、ジーンサイレンシングを減少させることが報告されているという記載がございまして。

14 ページにまいりまして、4、ベクターの組込方法、5 で構築された発現ベクターに関する事項の記載がございまして。

図 4 がプラスミドの構成図、制限酵素切断部位になります。

15 ページになりますけれども、オープンリーディングフレームについて記載されてございます。

最終的に宿主に導入されると考えられます T-DNA 領域の塩基配列は明らかになっておりまして、それぞれの遺伝子の機能が明らかでありますことから、目的以外のタンパク質を発現する ORF は含まれていないと考えられるということでございまして。また、コネクションサイトについて ORF 検索を行い、アレルゲンと毒素タンパク質について検討がされてございますけれども、既知のアレルゲンと毒素タンパク質との相同性については認められなかったという記載になってございまして。

16 ページにまいりまして、挿入遺伝子の領域と ORF の概要が記載されてございまして。

17 ページにまいりまして、意図する挿入領域については、プラスミド pDAB4468 の T-DNA Border B から T-DNA Border A までの T-DNA 領域ということでございまして。

(4) で、挿入領域に目的外の遺伝子は含まれていないということでございまして。

6 の宿主への導入方法、交配に関する事項でございましてけれども、プラスミドを用いまして、アグロバクテリウム法により行われてございまして。各選抜培地にグルホシネートを添加することによりまして、形質転換個体の選抜が行われてございまして。

18 ページの図 6 に育成図がございまして、評価を求める世代については、●●●以降

の後代系統であるということでございます。

19 ページに、以降の安全性評価試験に供しましたサンプルの世代の記載がございます。

19 ページの第 6、組換え体に関する事項になります。

まず、1 の (1) の④コピー数になります。コピー数については、サザンブロット分析が行われてございます。20 ページの図 7 が各プローブの位置と制限酵素の位置になります。

21 ページの図 8 にプラスミドの T-DNA 領域の各制限酵素の切断位置、予想断片サイズが記載されてございます。

表 4 のほうに、サザンブロットに使用したプローブの説明がございます。

22 ページの表 5 に、断片サイズの予測値及び実測値の記載がございます。

23 ページにまいりまして、まず、核マトリックス *RB7 MAR* と改変 *aad-12* カセットに関して説明がされてございます。これらについては、24 ページからの図 9 から図 16 までになります。結論といたしましては、本ダイズ系統に導入されました改変 *aad-12* カセットについては 1 コピーということでございます。

23 ページの 2 パラ目が改変 *pat* カセットになります。このサザンブロットの図につきましては、33 ページの図 18 から 37 ページの図 22 までになります。結論としましては、改変 *pat* カセットは 1 コピーであると考えられるということになってございます。

38 ページになりまして、完全性になります。

導入に用いましたプラスミドの T-DNA 領域におけます個々の遺伝要素の挿入を確認するために、宿主ゲノム境界領域を含みます本系統における挿入遺伝子の全体のクローニングと塩基配列の決定が行われてございます。挿入遺伝子の領域は 6,400 bp、5' 末端については 2,730 bp、3' 末端については 1,082 bp の全体として 10,212 bp の塩基配列が確認されてございます。その結果、挿入遺伝子領域は完全な形でダイズゲノム中に挿入されていることが確認されてございます。一方、挿入遺伝子の 3' 末端で 9 bp の挿入、ダイズゲノムの 55 bp が欠失していることがわかってございます。

③で抗生物質耐性マーカーと外骨格領域が挿入されていないことが確認されてございます。こちらもサザンブロット分析を行ってございまして、表 6 にプローブ、39 ページの表 7 に断片サイズの記載がございます。図 23 からサザンブロットの図が記載されてございます。結果としましては、供試しました全ての世代においてバンドは検出されないということで、スペクチノマイシン耐性遺伝子と外骨格領域については導入されていないことが確認されてございます。

44 ページにまいりまして、近傍配列につきましては、挿入遺伝子領域の 5' 末端と 3' 末端の近傍配列を宿主のダイズゲノムの配列と比較をしましたところ、ダイズゲノムから 55 bp が欠失していること以外は一致したということで、近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられるということでございます。

⑤で内在性遺伝子の破壊の有無になります。

5' 末端と 3' 末端の近傍配列に対しまして、BLASTx 検索が行われてございます。こちらは 16 ページの図 5 になります。まず、5' 末端側になりますけれども、図 5 の Region 1 の 2,730 bp について検索を行いましたところ、高い相同性を示します 2 つのダイズ未知タンパク質が検出されてございます。この 2 つのアラインメントはダイズの 5' 末端の 571~2,178 bp に存在してございました。そのほかに、ワタのペルオキシダーゼ、マメ科のタルウマゴヤシのペルオキシダーゼが検出されまして、それぞれこのダイズの 5' 末端の 559~2,178、583~2,178 の領域に存在してございました。アミノ酸の相同性は 78%であったということから、この 2 つのタンパク質はペルオキシダーゼまたはペルオキシダーゼ様タンパク質である可能性が考えられました。しかしながら、これらについては、このアラインメントが終結します 5' 末端の 2,178 bp の位置は、挿入遺伝子の開始点からは 553 bp の距離があるということで、挿入遺伝子の領域をまたがっていないと考えられたということでございます。

次に、3' 末端の近傍配列であります Region 3 の 1,082 bp について BLASTx 検索を行ってございます。その結果、カイコのヘモリタンパク質とアメーバ鞭毛虫の一種でありますグルーバーネグレリアの機能未知タンパク質、ショウジョウバエの一種の GI 14470 タンパク質が検索されましたけれども、E-value がいずれも高いということで、相同性は低いと考えられたということでございます。

次に、宿主ゲノムの 3,867 bp について BLASTx 検索を行いました結果、最初の Region 1 と同じに 2 つの機能未知のダイズタンパク質が検出されてございます。

45 ページにまいりまして、先ほどの 5' 末端の結論と同じように、これらのタンパク質をコードする遺伝子は、挿入遺伝子の導入された位置から離れておりまして、導入位置をまたがっていなかったということでございます。

さらに、宿主ゲノムでありますダイズゲノム領域について、ORF 検索を行いました結果、30 アミノ酸からなります ORF と考えられる配置が 1 個見つかってございます。これについて、既知のダイズタンパク質と関連性があるかどうかを BLASTp 検索した結果、相同性のある配列は見つからなかったということでございます。

以上のことから、ダイズ本系統の挿入遺伝子による既知の機能を有するダイズ内在性遺伝子の破壊の可能性はないと考えるという結論になってございます。

(2) は、ORF の有無、転写・発現の可能性に関する事項になります。

5' 末端と 3' 末端の近傍配列につきまして ORF 検索が行われてございます。こちらにつきましては、FARRP のアレルゲンデータベースで、バージョン 10 ということでございます。これに登録されていますアレルゲンとの間で、連続する 8 アミノ酸の一致と 80 アミノ酸以上で 35%以上の一致について検索が行われてございます。その結果、既知のアレルゲン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。毒素タンパク質につきましては、non-redundant protein データベースを用いまして、相同性検索を行いました。既知の毒素タンパク質の相同性は認められなかったという結果でございます。よって、

これらの ORF から生ずるタンパク質がアレルギー性または毒性を示す可能性は低いと考えられるという結論になってございます。

45 ページの 2 になりますけれども、発現部位、発現時期、発現量に関する事項になります。このダイズの●●●世代を用いまして、ELISA 法によりまして改変 AAD-12 タンパク質、PAT タンパク質の発現量を確認してございます。このダイズにつきましても、アメリカとカナダのほ場で、除草剤 2,4-D を発芽前、4 葉期、開花期に、登録時に想定される最大散布薬量で 3 回散布しまして、それぞれの時期でサンプルを採取してございます。あと、無散布区についても確認されてございます。表 8 に改変 AAD-12 タンパク質の発現量、表 9 に PAT タンパク質の発現量があります。

47 ページにまいりまして、タンパク質の一日摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項になります。日本人の一人当たりの「大豆・加工品」の摂取量は 54.0 g ということで、これを全て本ダイズに置き換えて計算がされてございます。まず、AAD-12 タンパク質については、最大で 22.92 ng/mg という値を用いまして、一日の一人当たりの予想摂取量が 1.24 mg となり、この改変 AAD-12 タンパク質の一日蛋白摂取量の占める割合が 0.0018% となります。改変 PAT タンパク質につきましても、最大で 2.66 ng/mg という数値を用いまして、一人当たりの予想摂取量が 0.14 mg となります。そこから計算をしまして、PAT タンパク質が、一日蛋白摂取量に占める割合が 0.0002% となりまして、いずれのタンパク質についても、一日蛋白摂取量の有意な量を占めていないことが示されたという記載になってございます。

47 ページの 4 が、アレルギー誘発性に関する事項になります。

供与体につきましても、いずれもヒトに対してアレルギー誘発性を持つことは報告されてございません。

(2) のタンパク質についてのアレルギー誘発性でございましてけれども、AAD-12 タンパク質については、ヒトに対してアレルギー誘発性を持つことは報告されていないということでございます。

PAT タンパク質につきましても、これまでに多くの評価が行われてございまして、PAT タンパク質が既知のアレルゲンでないこと、人工胃液中で 15 秒以内に消化されること、哺乳類の胃内環境を模した条件下では 1 分以内に活性を失うということと、データベースに登録されております既知アレルゲンとアミノ酸の相同性はないということ、加熱や酸性環境下で速やかに変性する可能性等が報告されてございまして、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ございます。

48 ページにまいりまして、物理化学的処理に対する感受性になります。

この試験に用いたタンパク質については、*Pseudomonas fluorescens* により産生したタンパク質を供試してございまして、本ダイズで産生されるタンパク質との同等性は確認されてございます。

PAT タンパク質については、これまで行われております試験を引用してございます。

まず、①ですが、人工胃液による処理になります。

こちらは全て、これ以降は AAD-12 タンパク質に関するものになります。

SDS-PAGE とウェスタンブロット分析を行いまして、SGF 中で 30 秒以内に速やかに消化されまして、免疫反応性ポリペプチドは検出されなかったという結果になってございます。49 ページに図がございます。

50 ページが、人工腸液によりまず処理になります。

こちらにも、SDS-PAGE とウェスタンブロット分析が行われてございまして、51 ページの図 28 に結果がございます。AAD-12 タンパク質は、SIF 中で 5 分以内に速やかに消化されると考えられたという結果になってございます。

52 ページになりまして、加熱処理に関する事項になります。

加熱処理によりまして、分子量と免疫反応性がどう変化するか確認するために、SDS-PAGE 法、ELISA 法と酵素活性測定が行われてございます。加熱は 50℃、70℃、95℃ でそれぞれ 30 分間行ってございます。

まず、SDS-PAGE でございますけれども、95℃、30 分で加熱をしても、分子量で変化はなかったということと、目的の分子量以外にわずかながら多量体の形成が認められたという結果になってございます。

53 ページの ELISA になりますけれども、50℃、70℃、95℃ で 30 分間の加熱処理によりまして、改変 AAD-12 タンパク質の免疫反応性が失われてございます。

酵素活性につきましては、50℃、70℃、95℃、30 分で酵素活性が失われたという結果になってございます。

54 ページになりまして、既知のアレルゲンとの構造相同性に関する事項になります。

FARRP のデータベースを用いて相同性の検索が行われてございます。また、連続する 8 アミノ酸の配列についても確認がされてございまして、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。

PAT タンパク質についても、同じく FARRP のアレルゲンデータベースを用いて確認が行われまして、8 つの連続したアミノ酸と 80 アミノ酸の 35% 以上の相同性は認められてございません。

5 の安定性になりますけれども、●●●と●●●、●●●世代の葉を用いましてサザンブロット分析を行って検討がされてございます。その結果、いずれの世代でも同じバンドが検出されておりまして、世代間及び同一世代内で安定していることが確認されたという記載になってございます。

6 の代謝経路への影響に関する事項になります。

この供与体の菌株から得られました合成オーキシシン型除草剤ジクロロプロップ及びメコプロップを分解するタンパク質 (RdpA タンパク質と SdpA タンパク質) については性質が明らかになっておりまして、RdpA タンパク質が R 体の特異的に分解します。また、SdpA タンパク質については S 体の特異的に分解しまして、さらに、光学異性体のない

2,4-D にも活性を示すということでございます。これが、AAD-12 タンパク質という名前になってございます。

先ほども若干御説明をいたしましたけれども、3 パラ目になりまして、この改変 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光学異性体のないものと S 体を特異的に分解します。

微生物から得られました改変 AAD-12 タンパク質を用いまして、*in vitro* におけます異なる基質に対する活性が測定されてございます。その結果、AAD-12 タンパク質については、56 ページの図 30 の棒グラフになりますけれども、(R,S) -ジクロロプロップと (S) -ジクロロプロップ、2,4-D に高い活性がありまして、R 体のジクロロプロップに対する活性はわずかということで、以前の報告を支持するものであったということでございます。

次に、数種類のアリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物を基質としまして、触媒効率の解析を行ってございます。用いました化合物は、表 12 のとおりでございます。2,4-D の側鎖にメチル基を持ちます (S) -ジクロロプロップの活性は、2,4-D に対して 2 倍ということと、2,4-D のクロロ基の 1 つがメチル基に置き換わりました MCPA の活性は、2,4-D の活性と同程度ということで、アルカノエート部位にありますメチル基が AAD-12 タンパク質の活性に重要な部位であるということが示されてございます。また、AOPP 型の除草剤であります (R,S) -キザロホップ、(R,S) -フルアジホップ、(R,S) -フェノキサプロップ、(S) -シハロホップ及び (R,S) -ハロキサホップの活性は、合成オーキシシン型であります 2,4-D、(S) -ジクロロプロップ及び MCPA よりもいずれも低い値であったということで、合成オーキシシン型のほうが活性が強いということでございます。

また、このタンパク質は、アリルオキシアルカノエート系除草剤のうちベンゼン環に窒素を 1 つ持つトリクロピルやフルロキシピルにも反応しますが、これらの活性は、2,4-D と比べまして、4%、16%であることが報告されてございます。

58 ページの表 13 に、その類似体に対する相対活性が示されてございます。

この相対活性からもわかりますように、側鎖にメチル基を持つ化合物の活性が高いということで、アルカノエート部位にありますメチル基が活性に重要な部位であるということが示されてございます。また、ベンゼン環の置換基の変化については、活性にはあまり影響はないということでございます。

以上によりまして、この改変 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光学異性体のないものと、光学異性体の S 体に特異的でありまして、メチル基がこのタンパク質の活性に重要な部位であるということが考えられてございます。また、AAD-12 タンパク質は、AOPP 型よりも合成オーキシシン型に対して強い活性がありまして、合成オーキシシン型の中でもベンゼン環に窒素を 1 つ持つ化合物に対しては活性が低下するという傾向があるということが示されてございます。

58 ページにまいりまして、植物の代謝経路に対する影響になります。

まず、植物の代謝経路におきましては、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られてございません。そのため、このタンパク質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられますけれども、このアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と似た構造と生理機能的に似た植物体内に存在する化合物について、代謝への影響が考察されてございます。対象としましたのは、まずは植物ホルモンとしての作用が 2,4-D にはあることから、作用が似ているということで、代表的な天然の植物ホルモンでありますインドール-3-酢酸とアブシジン酸、ジベレリン酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸が選択されました。また、TfdA タンパク質は、改変 AAD-12 タンパク質とアミノ酸配列に相同性があり、2,4-D を改変 AAD-12 タンパク質と同様に分解し、桂皮酸類にも活性を示すと報告がされていることから、桂皮酸と構造が似ているクマル酸、シナピン酸を対象としてございます。それと、アミノ酸については、植物の代謝経路において重要な役割を果たしているということから選択がされてございます。

まず最初に、コハク酸測定により検討されてございます。20 種類のアミノ酸については、1 μM の改変 AAD-12 タンパク質の濃度においては反応がなかったということです。植物ホルモンとフェニルプロパノイド中間体に作用させました結果、クマル酸と桂皮酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸について、コハク酸の生成が認められてございます。さらに、5 μM と 6 μM の改変 AAD-12 タンパク質を作用させました結果、インドール-3-酢酸とジベレリン酸、アブシジン酸、クマル酸、桂皮酸、シナピン酸について、コハク酸の生成が認められてございます。しかしながら、この方法では、基質の酸化を経なくてもコハク酸生成を誘発する可能性があるということで、実際に基質が酸化されるかを確認するために、フーリエ変換質量分析によりまして一次酸化物の測定が行われてございます。その結果、10 μM の改変 AAD-12 タンパク質を作用させた場合に、インドール-3-酢酸と桂皮酸の酸化物のみが検出されてございます。このインドール-3-酢酸と桂皮酸の触媒効率を測定しまして、2,4-D と類似の化学構造を持ちます *S*-ジクロロプロップとの比較を行ってございます。その結果、桂皮酸については、ジクロロプロップに対して 0.52%、インドール-3-酢酸については、ジクロロプロップに対して 0.027%でありまして、非常に緩慢であるということが示されてございます。

さらに、一番最後のパラになりますけれども、植物体内に存在する桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼとイネのインドール-3-酢酸についての触媒活性について記載されてございまして、60 ページにまいりますけれども、植物体内にあるこれらの酵素による桂皮酸とインドール-3-酢酸の代謝については非常に効率的に行われるということで、植物体内の既存の経路において、効率的かつ特異的に利用されていると考えられるということでございます。

以上によりまして、改変 AAD-12 タンパク質には桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性がありますけれども、その触媒効率は非常に低く、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられるということでございます。

PAT タンパク質につきましては、これまでに幾つか評価はされてございますけれども、グルホシネートの活性成分であります L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素でありまして、他の L 型アミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはないということで、PAT タンパク質が植物の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられるということでございます。

7 の宿主との差異に関する事項になります。

分析につきましては、2009 年に米国の 8 カ所のほ場で栽培された●●●世代の種子を供試してございます。本系統については、除草剤の無散布区と除草剤の 2,4-D 散布区を設定してございまして、登録時に想定されます最大散布薬量であります 1,120 g ae/ha で 3 回散布されてございます。また、参考品種としまして、本系統と対象の非組換えダイズと成熟期が同等であります 6 種の非組換え従来商業品種を供試してございます。

結果につきましては、(1) 主要構成成分については、タンパク質について有意差が認められてございますけれども、文献の範囲内であったということでございます。

(2) ミネラル類については、カルシウムについて有意差がございましたけれども、一般の非組換えの商業ダイズ品種の分析値の範囲内であったということでございます。

62 ページにまいりまして、62 ページの表 15 はミネラルの結果でございます。

(3) アミノ酸でございますけれども、一部のアミノ酸について有意差がありましたけれども、全て文献値の範囲内でございます。

63 ページの表 16 が結果になりまして、アラニン、アルギニン、バリンについては、無散布区と 2,4-D 散布区、アスパラギン酸、グルタミン酸、グリシン、フェニルアラニン、トレオニンについては無散布区、メチオニン、プロリンについては 2,4-D 散布区について有意差がございました。けれども、文献の範囲内であったということでございます。

(4) 脂肪酸になりますけれども、64 ページにありまして、オレイン酸とリノール酸、リノレン酸について有意差がありましたけれども、文献の範囲内であったということでございます。

65 ページがビタミン類になりまして、パントテン酸について無散布区で有意差がございましたけれども、一般の商業ダイズ品種の分析値の範囲内であったということでございます。

66 ページが栄養阻害物質等になりまして、67 ページの表 20 にありますように、総グリシテインについて有意差がありましたけれども、文献値の範囲内であったということでございます。

67 ページの 8 の諸外国における許可等に関する事項になりますけれども、米国とオーストラリア、ニュージーランド、カナダにおいて食品としての安全性確認が終了してございます。

68 ページの栽培方法、種子の製法に関しては、記載のとおりになります。

第 7 については、第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られており、下記に記さ

れた試験は必要ないと考えられるということでございます。

説明は以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして項目ごとに先生方から御意見をいただきたいと思います。

まず、第1から第4、ベクターに関する事項までで、申請書の1ページから7ページの前半まで、ここまでに關しまして御意見、コメントございましたらお願いしたいと思いません。

○児玉専門委員 6ページの(3)既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項ですけれども、スペクチノマイシンの遺伝子と *trfA* というのがプラスミドに入っていますので、*trfA* の説明もここに簡単に入れていただきたいと思います。安全性には関係していませんけれども、説明が全くないので、そこにに入れていただきたいと思います。

○澤田座長 これは、なお書的に書けばよろしいですか。

○児玉専門委員 そうですね。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

○澁谷専門委員 この部分かどうかはわからないのですが、今回のやつは、以前にアシルオキシアルカノエート系除草剤耐性のトウモロコシがあったと思うのですが、そこの関係はどういうふうになっているのかどこにも書いていないのですが、これは会社が違っていましたっけ。

○北村課長補佐 同じ会社のものでございます。トウモロコシのものは AAD-1 タンパク質で、それは R 体に特異的だという違いです。

○澁谷専門委員 ちょっと全然書いていないので、結局、前回かなり議論があつて、二、三年かかっていたかと思うのですけれども。だから、どこまで前の議論が使えて、全く一からやらなければいけないか、そこがこれを読んでいるだけではわからなかったのです。

○北村課長補佐 遺伝子の供与体も違います。

○澁谷専門委員 違ってきますよね。

○北村課長補佐 はい。

○澤田座長 新規のものでございますので、丁寧に見なければいけないということですね。

ほかはいよろしいでしょうか。

○橋田専門委員 すみません、単なる表記に対するコメントなのですが、名称のところディオキシゲナーゼとあるのですが、接頭数詞はシの濁音のほうがよろしいのかなとちょっと思いましたので、コメントです。

○澤田座長 すみません、ページ数は。

○橋田専門委員 最初から全部です。略語のところでも、ディオキシゲナーゼと書いてある。中身もそうになっていまして、ジオキシゲナーゼかなと。「シ」に点々のほうだと。

○澤田座長 ほかには。

○児玉専門委員 7ページの(4)のところ、あともう一カ所、13ページのところにも

同じ表現が出てくるのですが、スペクチノマイシンの遺伝子は T-DNA の外側にあるので導入されないと書かれると、導入されていることもよくあるので、T-DNA だけがきれいに入るといことは百発百中で起こるわけではないので、「位置し、確認したら入っていない」という書き方にしておいていただいたほうがよろしいかと思ます。

○澤田座長 それは過去形にしないといけないということですね。実際に見て……

○児玉専門委員 実際に見て入っていないという、外側だから必ず入らないというわけではないので。

○澤田座長 組換えの際にたまに入ることがあるからということですか。

○児玉専門委員 そうです。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

それでは先に行きまして、第 5 の挿入 DNA、遺伝子産物、発現ベクターの構築のところで、19 ページの前半まででコメント、御意見をお願いしたいと思います。

○澁谷専門委員 前回のときも、多分一番議論になった一つは、こういうものを導入して除草剤が分解されたものがどのようなものになって、それらの毒性と、それからどのぐらいたまるかというのがあったと思うのですね。そのときに前回のやつでは、ちょっと見直していたのですけれども、対象とする農薬が 2,4-D とキザロホップ、2 種類を対象にするということになっていたのですが、今回、2,4-D のことだけ書いているのですね。ダイズなんかは油糧種子なので、やはりちょっとそういう油のところにとまるというのは気になるので、2,4-D のことだけ見ていけばいいのか、キザロホップは使わないという根拠があるのか、使うとすれば、2,4-D については一応ちょっとデータは出ていますが、キザロホップも何らかのそういうものが必要なのではないか、その辺のところをもう少し情報が欲しいと思ます。

○北村課長補佐 キザロホップですけれども、これは光学異性体があるものなので、このダイズにかけると枯れてしまうということです。

○澁谷専門委員 今回はどうなの、使わないということですか。

○北村課長補佐 使うと枯れてしまう、耐性がないので枯れてしまう。

○橘田専門委員 今のにちょっと関連してですけど、9 ページのところで、せっかく光学異性体のことについて書いているのでしたら、2,4-D については、構造を見ればすぐわかると思ますけれども、光学異性体がないということをごここに明記して、対象だということを書いておいたほうがわかりやすいのかと思ます。

○澤田座長 入れる場所は初めて出てきた場所ですか。後ほど適当な場所を教えてくださいたいと思ます。

ほか、よろしいでしょうか。

○澁谷専門委員 あと、10 ページから 11 ページにかけて、2,4-D 散布の分析結果が出ていますけれども、結構微妙な、暫定残留基準 0.05 で、0.047 ppm って、これ、四捨五入すると 0.05 なのですよね。使用最大基準ということで、あまり余裕見ないでこういう感

じなので、後ろのほうに、「2,4-DCP の毒性は 2,4-D の毒性を上回らないと考えられる。」と書いてあるのですけれども、少なくとももう少しデータがあるので、定量的に書いておいていただいたほうがいいと思います。

それから、もうちょっと濃い濃度の散布のデータがあればもうちょっと本当はいいのですけれども、そこら辺がボーダーのところで少し気になる。

○澤田座長 この暫定の基準は両方を足してですか。

○北村課長補佐 この申請資料の記載を見る限りでは、DCP は対象になっていないかと思えます。

○澤田座長 DCP が対象になっていないのは、これは活性がないということですか。

○北村課長補佐 すみません、10 ページの下から 2 行目に記載されているのですが、「2,4-DCP は、規制対象としては設定されていない。」ということですか。

○澁谷専門委員 恐らく、これまでこういうのを散布したりすることないから、基準をつくっていないのだと思うのです。だから、要するに、こういう代謝産物が 2,4-D そのものよりも明らかに非常に毒性が低下していれば、それはそれでわかると思うのです。だから、そこら辺を毒性を上回らないというようなあいまいな書き方ではなくて、もうちょっときちっと書いてもらえばもう少し理解できるかなというふうに思いますが。

○澤田座長 この社内報告書で確認しないとよくわからないのですけれども、もし定量的な情報が……

○児玉専門委員 前回、トウモロコシのときにたしかありましたよね。

○澁谷専門委員 うん、やっていたと思う。

○澤田座長 残留量の定量的な情報は多分あると思うのですけれども、毒性に関してはないという可能性もあるわけですね。

○松井技術参与 今手元に 2,4-D と 2,4-DCP の毒性データの比較の表がありまして、急性毒性とか NOAEL、遺伝毒性などです。ちなみに急性毒性は 2,4-D が●●● $\mu\text{g}/\text{kg}$ ですが、2,4-DCP が●●●、ちょっとブロードですが、NOAEL は 2,4-D が●●● mg に対して 2,4-DCP は●●●と毒性は低い。生殖毒性のスレッシュホールドも DCP のほうが高い。あと発がん性は両方出ない。散布のほうの比較については詳しくまだ見ていないのですが。

○澁谷専門委員 今のような毒性の、全部並べることはないのですが、何らかの形で少し書いておいていただいたほうがわかりやすいと思いますけれども。

○澤田座長 お聞きした感じでは、補足の説明が可能かと。追加実験は多分必要ないかと思えますので、そこら辺の説明をもうちょっと追加していただければいいのかと。

ほかはよろしいでしょうか。

○飯専門委員 よろしいですか。今のところは、添付資料の 25 ページですか。添付というか CD に入っていた……

○松井技術参与 社内報告書の 5 です。

○飯専門委員 25 ページ。

○松井技術参与 25 ページです。

○飯専門委員 次のページに種子の値があると思うのですが、それを見ると、2,4-D は検出できなくて、DCP だけが検出されていて。最大値としてここに書いてある 0.047ppm は平均値で、実際の最大値はもっと高いのですよね。

○松井技術参与 マックスが●●●ppm です。

○飯専門委員 そこを書いていない、わざとか知らないですけど。だから、それで、2,4-D の暫定というのが、最終的には変更されるような審査とかそういうような手続が動いているのかどうなのかというのを知りたかったのです。この値を根拠にずっとやっていってしまっているのかどうかという。

○澤田座長 通常、暫定値より強まることはないとは思いますが。

○飯専門委員 私もそう思っていて、暫定から値がかなり大きく変わるのであれば、DCP の毒性と残留量を照らし合わせればこの記述はしやすくなるのかなと思ったところもあって。ただ、この値を根拠に、ちょっと上回らないというだけを理由にされたら、記載としてはなかなか納得しにくい記載になってしまうというふうにも思ったものだから。

○澤田座長 1 つは書きぶりの問題で、「問題となるようではない」と書いてもらうと困るという話と、あとリスク管理の問題で、もし残留基準がオーバーした場合、結局は輸出できないということになると思います。

○飯専門委員 ええ。それで、もう一つ。日本では DCP が規制対象外と書かれているのですが、2,4-D は恐らく対象だからチェックを受けるかもしれないけれども、DCP が幾ら残っていても、ずっとそのまますり抜けてしまうということがあるのかどうかというのは知っておきたい点なのですね。

○北村課長補佐 現状の基準値では DCP は対象になっていないので、仮に残っていたとしても、そこは見られないということだと思います。

○澤田座長 今検討していることの内容の中に、DCP も込みで検討される予定があるかどうかというのがちょっと問題かなとは思いますが。その毒性を考えて、先ほど 30 倍ぐらい違うような印象を受けたのですけれども。

○澁谷専門委員 違っていましたかね。

○澤田座長 ええ。

○北村課長補佐 状況を含めて確認をさせていただきたいと思うのですが。

○澤田座長 とりあえずそれは置いておきまして、ほかはいかがでしょうか。

○鎌田専門委員 うろ覚えでしかないのですが、前回のトウモロコシのときには、もっと代謝されていたはずだったと思うのですが、もうあと一段階か何かあって、それも含めて今の安全性の議論を全部したという記憶があるのですが。そこら辺が、いや、もうこの DCP で止まっていて、その先行っていないのかどうか、どこかでちゃんと確認しておいたほうがいいのかというのはちょっと思っています。

それから、前回のときにも、一応ここでは2,4-Dしか使わないと言っているけれども、ほかにあり得そうなものについては一応代謝産物を見てくださいと言って見ていただいた記憶があるのですが、そこら辺は少なくともトウモロコシのときと同じレベルのことをお願いはしたほうがいいかなと思うので、トウモロコシの確認をしながらということだと思います。

○北村課長補佐 まず、2,4-DCPについては、トウモロコシでは検出されず、残留しないという結果になっていました。キザロホップも対象にするということだったのですが、キザロホップフェノールが残っておりまして、その毒性に関する説明を追加してもらったという状況です。

○鎌田専門委員 多分、今回のだと後ろのほうに一応リストがありますよね。今回のケースが基質とする除草剤リストというのが添付の5番ですよね。こういう中で少なくとも使う可能性が、使うというか一般に流通していて、間違っても使いそうな可能性があるという意味で何かあるものがあつたら一応念のために、もし見られるのだったら見ておいたほうがいいかなという気はしますが。

○澤田座長 この添付資料5にあるものの活性はデータは出ていなかったですか。

○北村課長補佐 すみません、57ページの表12に全部ではないのですが、一部活性が記載されてございます。

○澤田座長 たしか前回同様な議論がありまして、リストがあるけれども、認可されていないのは除かれたのでしたか。

○北村課長補佐 結局、アメリカや主要国でトウモロコシに対して使えるものについて検討してくださいということになりました。全部見ると際限がなくなってしまうので、トウモロコシの主要な生産国で使えるものを確認しています。

○澤田座長 そうすると、見るべき農薬が残らないという話になってしまうのですか、ダイズでは……。

○北村課長補佐 現状、ダイズに対して使えるアリルオキシアルカノエート系除草剤がないということです。2,4-Dについて今申請をしていますということです。

○澤田座長 それはアメリカの話ですね。カナダも同じなのでしたっけ。

○北村課長補佐 カナダについては具体的には確認していません。

○澤田座長 結局何も農薬が今ないから、2,4-Dをアメリカで申請するという事なので、それが最初の農薬になる。

○澁谷専門委員 要するに、これまでは使えなかったわけですよね、枯れてしまうから。だから申請がなかっただけのことで、使えるとなれば、いいものが使えるように、とりあえず2,4-Dでも、ほかのも当然申請していく可能性はあるのですよね。だから、農薬としてほかの作物や何かで使われているもので、この除草剤耐性で使えるものに関しては、本当はカバーをしていたほうがいいのだと思うのです。結局、申請がないというのは、今まで使えなかったからやらなかっただけのことだと思いますが。

○澤田座長 結局、どこまで調べてもらうかという話になるかと思うのですけれども。

○澁谷専門委員 わからないですよ、やれるか。2,4-D だけかもしれないし。

○北村課長補佐 わかりました。データがあるのかどうかを確認してみます。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

それでは、次の第 6 の、これはちょっと長いのですけれども、47 ページの前半までで御意見、コメントをお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 44 ページから 45 ページにかけて「内在性遺伝子の破壊の有無」というところですが、5' 側のほうにペルオキシダーゼと相同性が高い部分が出てくるところで、それを破壊していないと彼らは言っているのですけれども、それが挿入部位から相同性に出てくるところが 500 bp ぐらい離れているのでという、たしかそういう論拠だったように記憶しているのですが、私のほうで少し blast をかけてみたりもしてみたのですが、確かにパーオキシダーゼが出てきて、多分、イントロン・エキソン構造をとっていますので、500 bp 離れているからつぶれていないという根拠にはならないと思います。ですから、きちんと相同性のあるパーオキシダーゼの構造はこういう構造で想定されていて、ここの部分に入っているのか、壊していないよというのか、パーオキシダーゼは多分何コピーもあると思いますので、1 個壊れても安全性上は私は問題ないとは思っていますけれども、壊れていないというのは、このデータからでは判断できないと思いますので、もうちょっとちゃんと調べてもらって、こういう構造なので、ここに入っているのか、壊れているのか、壊れていないのか、そういう議論にしていきたいと思います。

○澤田座長 エクソンの終わりがどこかという問題だと思うのですけれども、単に 500 bp が離れているだけでは何の根拠にもならないと、そういうことですね。

○児玉専門委員 そう。

○澤田座長 ほかはいかがでしょうか。

E-value の E の括弧がどういう意味ですか御存じですか。今ちょっと気づいたのですけれども。わかったら調べてみてください。

ついでながら、15 ページに実際の組み込まれた後の話を書いてあるのですけれども、図 5 は実際には 45 ページで引用されているので、むしろこっち側に平行移動したほうがわかりやすいのかなと思います。

ほかはいかがでしょうか。

○飯専門委員 38 ページの表 6 に当たるところと、20 ページの図 7 のほうがわかりやすいかな、使ったプローブが完全に一周していない部分があるのですが、これまで一応きっちりやってもらっていたのか、ここの微妙な場所が抜けているので、どう解釈するのかというのがちょっと引っかかっているのですけれども。

○鎌田専門委員 今までの例で言うと、最近の例は全てカバーするように全部組み込まれています、プローブが。私はこう考えていたのですけれども、一応制限酵素の切断の大きさから考えると、多分これでいいかもしれないと、少なくともインサートを決めるにはこれで

多分十分できていると思っているのですが、ちょっとだけひっかかったのが、例えば、プローブがないところの部分が、組み込まれた以外のところに断片で入っていたときは、多分検知できないというおそれはあるということだけは気にはなっていたのですが。さて、それぐらいそこまでいくかというのは、ちょっと微妙かなとは思ったのですが。

○澤田座長 **Border A** とユビキチンのプロモーターぐらいですか、心配なのは。

○鎌田専門委員 そうですね、ユビキチンの後ろのほうの部分ですよ、すぽっと抜けている部分はちょっと気になるかなと。

○澤田座長 これは、レストリクションエンザイムの関係で見られていけばよしとしてもいい場合があるのかなと思いますが、そこら辺詳しく見ないとわからないのですけれども。

○鎌田専門委員 少なくとも、だから、断片としては見ていなくて、1つの固まりとしての **T-DNA** としては、これで多分十分いっているのですが、その部分だけが断片としてどこかほかの場所にぽっと入っていると多分誰も見えていないという意味では、抜けたかもしれない。過去になかったわけではないので、そこできちっと見ようとしたら、やはりそこをこのプローブで、一応サザンはやっておいてほしいという気はしますが。

○澤田座長 今回はいかがでしょう。

○飯専門委員 **Border A** が複数並んでいるところで、多分、一番 **T-DNA** の挿入部分に近いボーダーが使われてインテグレートされているのではないかと思うのですが。ちょうどプローブがない部分というのが、長くて微妙な位置というのがちょっと、という感じがあるのです。実際に抜けている長さが、使っているプローブの短いものよりは長いので、サザンができない話ではないなという気も一方ではあるもので。

○松井技術参与 今回導入された DNA 断片の中に **Border A** がないのです、抜けている情報を付け加えさせていただきます。**Border B** はちゃんと入っているのですけれども、**Border A** が抜けて、**Border A** のちょっと上流のベクター由来のノンコーディングリージョン由来の領域、あと 9 bp のインサクションで次が内在性の遺伝子になるという構造で入っています。

○鎌田専門委員 今のことも含めて飯先生の言われたのはよくわかっていて、**T-DNA** の入り方は **Border** が 2 つあると、その 1 つのほうが非常に優先的に、そこから組み込まれ始めて、終わるところが必ずしももう一個の **Border** でないというケースがたくさんあるのです。要するに、同じ価値を持っていなくて、片側のほうがすごく価値が高いという組み込まれ方をするので、もう片一方のほうがないとなると、さて、本当はどうなのだろうというのは。だから、そこまで本当はきっちり出すためには、**Border A** のほうのプローブを使ってきっちり最後まで本当は出すべきだということなのですが、ただ、インテグレートされたものについては、塩基配列をこの場合は見ているので、そこは多分 **Border A** が入らない形で今回は 1 コピー分入った。ただ、そこにもやはり、その部分の断片だけはぽっとどこかに入っていないという保障にはなっていないという意味では若干気になるところなので、いろいろなデータを出し直してもらったならば、ここ 2 つだけ

のサザンはそんなに難しいことではないので、それは出してもらえばいいのかなという気はしますが。

○澤田座長 サザンの 2 つの抜けている部分のデータを追加してもらおうということで、**Border A** の懸念が払拭されないというところはありますので。

ほかはいかがでしょうか。

それでは、続きまして、最後の 68 ページまでですか、最後までコメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 54 ページから 55 ページにかけての代謝経路への影響のところでも議論するのがいいかどうか、さっき鎌田先生もおっしゃったことと同じなのですが、前回のトウモロコシのときは、たしかグリコシル化されて、最終的には植物側から見ると解毒されたという形のところまでちゃんと落ち着いた形になっているのですが、今回は多分宿主も違うので、あと遺伝子も若干違うということですので、**DCP** でしたか、一回分解されてできた産物で止まってしまっているのかどうかというところが何ともわからない状態になっていますので、ある程度どこまで落ち着いたのかということを中心に、このトウモロコシとダイズでは宿主違いますので、その情報はやはり欲しいと思います。

○澁谷専門委員 ちょっと気になっているのは、この酵素の特異性のところで、確かに速度は遅いのだけでも、植物の桂皮酸ですね、フェニルプロパノイド系の桂皮酸が一応基質になっているのです。ここの議論としては、内在性の酵素のほうが速度が圧倒的に早いから行くと言っているのだけでも、やはり過剰発現とかいろいろなことがあるので、本当に代謝系に影響していないかどうか、つまりフェニルプロパノイド系の何かの分析データがあれば、変動していないとか、何かそこをもし裏付けるデータがあれば欲しいと思うのです。というのは、除草剤耐性や何かはこれまでも、分類でいうと①で、ほかのとクロスしないというのを前提にいろいろ動いてきているのですが、代謝系に影響してしまうと、そういう話が違ってきてしまうので、やはり *in vitro* で桂皮酸を基質にゆっくりだけどするというのと、しかし、実際には植物体の中では本当にそういうことが起こっていないという、もうちょっと裏付けるデータがあれば欲しいと思います。

○澤田座長 実際にデータを取るとすると……

○澁谷専門委員 これ、成分分析見たのですけれども、その辺の代謝物全然分析していないのですよね。何か物によってはやっていたような気もするのですが、フェノールとかリグニンとか。

○澤田座長 ここに……

○澁谷専門委員 ここにはなかった。

○澤田座長 桂皮酸関連と、それから……

○澁谷専門委員 あの経路に乗っているものですね。

○澤田座長 そちら辺の代謝物が実際にはないことを確認してもらいたいということによろ

しいですか。

○澁谷専門委員 後であれを見ればわかると思うのですが、どの辺を見れば動いていないかどうか。やっているのではないかという気もするのですが、エンドプロダクトなんかは。ちょっとそこ聞いてみていただけると。

○澤田座長 要は、ダイズでここの辺の代謝がどうなっているかという、もう少しよくわかっているはずで。

それと、あとは先ほどのグルコースの関係ですか、そこら辺も追加で情報を出していただけるとということ。

ほかはいかがでしょうか。

○手島専門委員 細かいところで申しわけないのですが、49 ページ、人工胃液のところ、人工胃液は分解が 30 秒以内ということで、これは早く消化するということがいいと思うのですが、図の中で、レーン 11 とか 10% 改変の AAD-12 と書いてありまして、これは量的に 10% 量乗せているという意味なので、ここも 10% 量を改変という形で記載していただければと思います。これは 49 ページ、51 ページの図の中になります。

○澤田座長 表の表現に直せばいいということですね。

○手島専門委員 そうです。

○澤田座長 ついでながら、PAT に対してはデータなしで文献だけでいいということになっていたのでしたね。

○手島専門委員 これはもう事前にたしか同じものが、タンパクがもう出てきているので、その場合はデータは載せなくてよかったかと思います。

○澤田座長 何かありますか。

ほか、よろしいでしょうか。

やはり初めての遺伝子の場合、いろいろと御意見をいただきまして、これは一部指摘事項になるかなと思いますので、指摘事項、確認事項等を取りまとめまして、先生方に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。

飼料はその後ということになりますので、議題 1 についてはこれで終わりたいと思います。

議題 2 のその他でありますけれども、私のほうから報告があります。

昨年 12 月の専門調査会で審議しました除草剤グリホサート耐性、セイヨウナタネ MON 88302 系統、今年 3 月の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 T 304-40 系統、この 2 つにつきましては、申請書等の修正の指摘を出していたところがあります。この品目の取扱いにつきましては、御担当の先生に御協力いただきまして、座長預かりとなっておりますが、指摘に基づいて修正されたことが確認されましたので、評価書（案）を食品安全委員会に御報告いたしました。現在、パブリックコメントの募集中であるとお聞きしております。

私からの御報告は以上です。

そのほかに事務局から何か追加ありますでしょうか。

○北村課長補佐 特にございません。

○澤田座長 ありがとうございます。

以上をもちまして、第 115 回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会させていただきます。

どうもありがとうございました。