

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ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統に係る食品健康影響評価（令和 3 年 8 月 17 日付け厚生労働省発生食 0817 第 5 号）については、令和 3 年 9 月 27 日に開催された第 215 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

2. 除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統に係る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

令和 3 年 11 月 30 日（火）開催の食品安全委員会（第 840 回会合）の翌日の令和 3 年 12 月 1 日（水）から令和 3 年 12 月 30 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体

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

除草剤ジカンバ耐性
セイヨウナタネ MON94100 系統

令和3年（2021年）11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.....	8
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	9
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	11
第6. 組換え体に関する事項.....	12
1. 遺伝子導入に関する事項.....	12

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	14
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	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.....	16
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	16
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.....	16
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	16
<参照>.....	17

<審議の経緯>

2021年8月17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（厚生労働省発生食0817第5号）、関係書類の接受

2021年9月7日 第831回食品安全委員会（要請事項説明）

2021年9月27日 第215回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年11月30日 第840回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

山本 茂貴（委員長）

浅野 哲（委員長代理 第一順位）

川西 徹（委員長代理 第二順位）

脇 昌子（委員長代理 第三順位）

香西 みどり

松永 和紀

吉田 充

<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>

2021年9月30日まで

中島 春紫（座長）

児玉 浩明（座長代理）

安達 玲子

近藤 一成

飯島 陽子

手島 玲子

岡田 由美子

樋口 恭子

小関 良宏

山川 隆

小野 竜一

吉川 信幸

橋田 和美

2021年10月1日から

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子

小野 竜一

岡田 由美子

近藤 一成

小関 良宏

樋口 恭子

小野 道之

藤原 すみれ

要 約

「除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変 *dmo* 遺伝子を導入して作出されており、ジカンバモノオキシゲナーゼを発現することで、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、遺伝子の導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分等の比較等について確認した結果、非組換えセイヨウナタネ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、「除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統」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

(申請内容)

名称：除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統

性質：除草剤ジカンバ耐性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer CropScience LP (ドイツ)

「除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統」(以下「セイヨウナタネ MON94100」という。)は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変 *dmo* 遺伝子を導入して作出されており、ジカンバモノオキシゲナーゼ(以下「改変 MON94100 DMO タンパク質」という。)を発現することで、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。

II. 食品健康影響評価

第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の従来品種 65037 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は、*S. maltophilia* DI-6 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *dmo* 遺伝子は、除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON94100 DMO タンパク質をコードする。本遺伝子は、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

低エルカ酸及び低グルコシノレートのキャノーラ品種が育成され、種子から得られた油が食用として利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等(タンパク質、脂質等)の種類及びその量の概要

セイヨウナタネの種子中の主要栄養組成(対乾燥重量)は、粗タンパク質 15.6 ~ 35.7%、粗脂質 24.6 ~ 55.2%、酸性デタージェント繊維 8.94 ~ 42.30%、中性デタージェント繊維 10.93 ~ 53.70%、灰分 2.6 ~ 10.6%及び炭水化物 17.7 ~ 47.4%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

セイヨウナタネの種子中のエルカ酸及び総グルコシノレートの含有量は、それぞれ 0.07~1.96% (全脂肪酸) 及び 0.41 ~ 31.98 $\mu\text{mol/g}$ (対乾燥重量) である。その他の栄養阻害物質 (対乾燥重量) は、フィチン酸 0.94~3.88%、シナピン 0.19 ~ 1.36%、総タンニン 0.05 ~ 1.27 % 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

セイヨウナタネ MON94100 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(2) 摂取 (可食) 部位

セイヨウナタネ MON94100 の摂取部位は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(3) 摂取量

セイヨウナタネ MON94100 の摂取量は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

セイヨウナタネ MON94100 の調理及び加工方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 は、改変 *dmo* 遺伝子の導入によって改変 MON94100 DMO 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 から 6 までにより、セイヨウナタネ MON94100 の安全性評価においては、既存のセイヨウナタネ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

セイヨウナタネ MON94100 は、改変 MON94100 DMO タンパク質を発現することによって、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育することができる。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*B. napus* L.) の従来品種 65037 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

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、*B. oleracea* L. と *B. rapa* L. との交雑に由来すると考えられている。従来のセイヨウナタネには、ヒトやその他の動物に有害なエルカ酸とグルコシノレートが含まれるため、これらの含量の低い品種の育種が行われ、現在では、品種改良により開発された低エルカ酸及び低グルコシノレートのキャノーラ品種が栽培されている(参照 2, 3)。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

セイヨウナタネに含まれる有害生理活性物質として、エルカ酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン及びタンニンがある。エルカ酸含量の多い油を多量に摂取すると心機能障害を起こす可能性があるため、コーデックス委員会では、全脂肪酸中のエルカ酸含量は 2% 未満と規定されている(参照 4)。

グルコシノレートは硫黄と窒素を含む有機化合物であり、それ自体は無害であるが、セイヨウナタネに含まれる酵素により加水分解されることで甲状腺腫誘発性作用等をもたらす可能性がある。このため、OECD のコンセンサス文書では油かす中のグルコシノレート含量を 30 $\mu\text{mol/g}$ 未満 (対乾燥重量) とすることが示されている(参照 3)。

フィチン酸は、カルシウム、マンガン、鉄、亜鉛等のミネラル吸収量を減少させる(参照 5)。シナピンは、嗜好性を低下させ、タンニンは、栄養素と結合して消化吸収を低下させる(参照 3, 6)。

4. アレルギー誘発性に関する事項

セイヨウナタネのキャノーラ品種から得られるナタネ油がアレルギー誘発性を持つという報告はない。

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

セイヨウナタネには、糸状菌や細菌、ウイルス等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

セイヨウナタネのキャノーラ品種から得られるナタネ油が食用に用いられる。

7. 近縁の植物種に関する事項

アブラナ属植物にはこれまで安全に摂取されてきた野菜が含まれる。主要な油糧作物であるアブラナには、セイヨウナタネと同様にエルカ酸及びグルコシノレートが含まれることが知られている。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 の作出に用いられた導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域である。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照 7)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域の制限酵素切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害なタンパク質を産生する塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域には、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与するネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (*npt II*) 遺伝子が含まれている。T-DNA II 領域(第5-2-(2)参照)は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与するアミノグリコシド改変酵素 3''(9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (*aadA*) 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 の外骨格領域には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は、*S. maltophilia* DI-6 株である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は土壌や飲料水から検出される等、環境中に遍在しており、健康なヒトに感染して悪影響を及ぼすことは知られていない(参照 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

(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 *dmo* 遺伝子は、野生型 *dmo* 遺伝子をクローニングすることにより構築された遺伝子である。改変 MON94100 DMO タンパク質は野生型のジカンバモノオキシゲナーゼ（以下、「DMO タンパク質」という。）のアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目にアラニンが挿入され、112 番目のアミノ酸がトリプトファンからシステインへ置換されている。

(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

導入用プラスミド PV-BNHT508701 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(参照 7)。

導入用プラスミド PV-BNHT508701 は、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域の 2 つの T-DNA 領域からなり、T-DNA II 領域には選抜マーカー (*splA^a*) 遺伝子が含まれている。なお、MON94100 系統中には T-DNA II 領域が含まれていないことがシーケンス解析により確認されている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子がコードする改変 MON94100 DMO タンパク質は、野生型の DMO タンパク質の改変タンパク質である。DMO タンパク質は、除草剤ジカンバから除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA) とホルムアルデヒドを生成する脱メチル化反応を触媒する(参照 9)。

改変 *dmo* 遺伝子はその上流に葉緑体輸送ペプチド (RbcS) 由来配列及びクローニングに使用された配列 (IS) が付加されている。セイヨウナタネ MON94100 で発現する改変 MON94100 DMO タンパク質は、RbcS 及び IS 由来アミノ酸全部と N 末端のメチオニンが取り除かれたもの、並びに RbcS 及び IS 由来の 27 アミノ酸が N 末端に付加されたもの (改変 MON94100 DMO+27 タンパク質) の 2 種類のタンパク質が存在する。この 2 種類のタンパク質は安全性審査の終了した除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統で発現する 2 種類のタンパク質のアミノ酸配列と同一である。

改変 MON94100 DMO 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^bを用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されなかった(参照 10)。

^a スクロースホスホリラーゼである SPLA タンパク質をコードし、このタンパク質の発現により萎縮した種子が形成される。

^b TOX_2020: Swiss-Prot database (ダウンロード日: 2020 年 1 月) から抽出された毒性タンパク質データベース

(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-BNHT508701 の外骨格領域には、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与するネオマイシンホストトランスフェラーゼ II (*npt II*) 遺伝子が含まれている。T-DNA II 領域は、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与するアミノグリコシド改変酵素 3''(9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (*aadA*) 遺伝子が含まれているが、MON94100 系統中には導入されていないことがシーケンズ解析により確認されている。

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 *dmo* 遺伝子のプロモーターは、peanut chlorotic streak virus (PCISV) の完全長転写物の *PCISV* プロモーター配列である(参照 11)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *dmo* 遺伝子のターミネーターは、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の機能未知遺伝子の 3' 非翻訳領域である *guf-Mt1* ターミネーター配列である(参照 12)。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットには、遺伝子発現の制御に関与する tobacco etch virus (TEV) の 5' 非翻訳領域由来の配列が(参照 13)、また、改変 MON94100 DMO タンパク質を葉緑体へ移動させるために、エンドウのリブローース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子の輸送ペプチドと成熟型タンパク質の一部をコードする *RbcS* 標的配列が挿入されている(参照 14)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 は、外骨格領域、T-DNA II 領域等から構成される中間プラスミドに T-DNA I 領域を挿入することにより構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 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

第 6-1-(2) に記載のとおりである。

(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-BNHT508701 の意図する挿入領域は、T-DNA I 領域の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までである。

(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-BNHT508701 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜により純化され、目的外の遺伝子の混入はないことがシーケンス解析により確認されている(参照 7)。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT508701 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、スペクチノマイシンを含む培地で選抜し再生個体を得た。再生個体のうち T-DNA I 及び T-DNA II 領域を持つものを自殖させ、*splA* 遺伝子の発現による種皮萎縮個体を除外し、PCR 分析及びシーケンス解析を実施することで、1 コピーの T-DNA I 領域をホモで有し、T-DNA II 領域及び外骨格領域をもたない個体を選抜した。その後、自殖及び商業品種との交配によりセイヨウナタネ MON94100 が得られた。

表 1 挿入 DNA (T-DNA I 領域) 構成要素

構成要素	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>PCISV</i> プロモーター	Peanut chlorotic streak virus 由来の完全長転写物のプロモーター配列 植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
L- <i>TEV</i>	Tobacco etch virus の 5' 非翻訳領域由来の配列 遺伝子発現の制御に関わる。
TS- <i>RbcS</i>	<i>Pisum sativum</i> のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS</i> 遺伝子由来の輸送ペプチド配列及びコード領域の一部 目的タンパク質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>dmo</i>	<i>S. maltophilia</i> 由来の改変 MON94100 DMO タンパク質をコードする遺伝子 除草剤ジカンバ耐性を付与する。
<i>gufMt1</i> ターミネーター	タルウマグゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3' 非翻訳領域

	転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

第6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 のゲノムに挿入された T-DNA I 領域（導入遺伝子）のコピー数、導入用プラスミド由来の非意図的な配列の有無及び挿入近傍配列を確認するために、シーケンス解析及び PCR 分析を行った。

セイヨウナタネ MON94100 及び非組換えセイヨウナタネの両ゲノムから読まれた塩基配列（リード）の冗長度^cはそれぞれ 80 及び 125（中央値）であった。シーケンス解析で得たリード全てを、導入用プラスミド PV-BNHT508701 と照合し、コピー数を確定した。その結果、セイヨウナタネ MON94100 では、導入遺伝子の 5' 及び 3' 末端配列を含む 2 つの接合領域が特定され、導入遺伝子が 1 箇所につき 1 コピー挿入されたことが示された(参照 15)。一方で、非組換えセイヨウナタネではこれらの接合領域は確認されなかった。また、セイヨウナタネ MON94100 において導入用プラスミド PV-BNHT508701 由来の非意図的な配列は確認されなかった。

さらに、セイヨウナタネ MON94100 の挿入領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入プラスミドの T-DNA I 領域と比較した結果、両者は同一であることが確認された。

次に、セイヨウナタネ MON94100 の導入遺伝子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、5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列に特異的なプライマーを作成し、非組換えセイヨウナタネを用いて PCR 分析及び塩基配列の解析を行った後、これをセイヨウナタネ MON94100 の近傍配列と比較した。その結果、セイヨウナタネ MON94100 の導入遺伝子の挿入部位において宿主ゲノムの 8 bp の欠失が認められたことを除き、セイヨウナタネ MON94100 の近傍配列と非組換えセイヨウナタネの塩基配列は一致しており、導入遺伝子の近傍配列が宿主ゲノム由来であることが確認された(参照 15)。

また、セイヨウナタネ MON94100 のゲノムに遺伝子を挿入することにより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 (1,000 bp)、欠失した 8 bp 及び 3' 末端近傍配列 (1,000 bp) の計 2,008 bp について、EST データベース (EST_2020^d)、核酸データベース (NT_2020^e)

^c 特定の DNA (ゲノム DNA 及び遺伝子) に対する塩基配列解析の回数を示す尺度。本試験では、1 コピーで存在する既知の内在性遺伝子の冗長度を指標とし、その中央値が 75 以上となる条件で解析を実施。

^d EST_2020: EST 配列のデータベースで、75,092,394 配列を含む。

^e NT_2020: 塩基配列のデータベースで、57,030,965 配列を含む。

及びアミノ酸配列データベース (NR_2020^f) 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、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-6}$ かつ 95%以上の相同性を有する配列が認められたが、セイヨウナタネの近縁種において解読されたゲノム配列の一部であった。NR_2020 を用いて行った blastx 検索の結果、 $E\text{-score} < 1 \times 10^{-8}$ の配列が確認されたが、全て導入遺伝子挿入部位の上流にあった。したがって、MON94100 の導入遺伝子挿入部位においてセイヨウナタネ内在性の既知の遺伝子は破壊されている可能性は低いと考えられた(参照 16)。

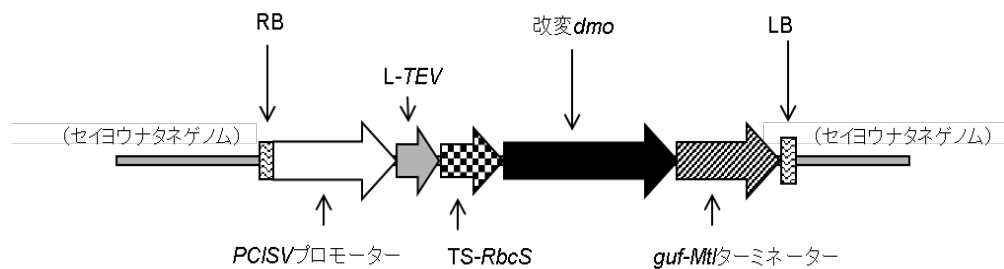


図1 セイヨウナタネ MON94100 の挿入 DNA (模式図)

(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

セイヨウナタネ MON94100 の導入遺伝子領域と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列との接合部において、意図しないオープンリーディングフレーム(以下「ORF」という。)が生じていないことを確認するために、6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 アミノ酸以上の接合部を跨ぐ ORF が 10 個見いだされた(参照 17)。10 個の ORF と既知のアレルゲン及び毒性タンパク質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_2020)、毒性タンパク質データベース (TOX_2020) 及びタンパク質データベース (PRT_2020) を用いて $E\text{-score} < 1 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。また、AD_2020 を用いて、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を有する配列及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する配列を検索した。その結果、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(参照 17)。

セイヨウナタネ MON94100 の導入遺伝子領域において、6つの読み枠から目的以外の新規タンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と構造相関性を有するか調査するため、AD_2020、TOX_2020 及び PRT_2020 を用いて上記と同様の基準にて相同性検索を行った。その結果、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(参照 18)。

^f NR_2020 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2018 年 1 月 17 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、229,636,095 配列を含む。

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

セイヨウナタネ MON94100 の葉、地上部、根及び種子における改変 MON94100 DMO タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した(参照 19)。結果は表 2 のとおりである。

表 2 セイヨウナタネ MON94100 における改変 MON94100 DMO タンパク質の発現量 (平均値)

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重量)

分析組織*	改変 MON94100 DMO タンパク質
葉	2.5
地上部	2.5
根	5.0
種子	0.64

*葉は、第 3~6 葉期、地上部及び根は、第 9 葉期~花芽形成期、種子は収穫期の値を示す。

定量限界値 (LOQ) は、全ての組織で $0.094 \mu\text{g/g}$ 乾燥重量。

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

セイヨウナタネから生産される植物油にはごく微量のタンパク質しか含まれていない(参照 20)。したがって、改変 MON94100 DMO タンパク質が一日のタンパク質摂取量の有意な量を占めるとは考えにくい。

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 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* DI-6 株がアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(2) 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

改変 MON94100 DMO タンパク質がアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(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

既に安全性審査を経た除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統で発現する 2 種類の DMO タンパク質は、セイヨウナタネ MON94100 で発現する 2 種類の DMO タンパク質のアミノ酸配列と同一である。MON87708 系統で行った物理化学的処理に対する感受性試験において、2 種類のタンパク質は、ともに物理化学的処理に対して感受性をもつことが確認されていることから、MON94100 系統から発現する改変 MON94100 DMO タンパク質も、物理化学的処理に対して感受性をもつと考えられた。

- (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 MON94100 DMO 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、AD_2020 を用いて相同性検索を行った。その結果、 E -score $<1 \times 10^{-5}$ を示す既知のアレルゲン、連続する 80 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及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった(参照 10)。

上記（1）から（4）まで及び前項 3 から総合的に判断し、改変 MON94100 DMO タンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 に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 世代のセイヨウナタネ MON94100 についてシーケンス解析を行った結果、各世代において導入遺伝子に起因する 2 つの接合領域のみが検出され、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 15)。

また、改変 MON94100 DMO タンパク質の発現の安定性を確認するため、5 世代のセイヨウナタネ MON94100 の種子についてウェスタンブロット分析を行った。その結果、*E. coli* で調製した改変 MON94100 DMO+27 タンパク質と同等の位置にバンドが観察され、改変 MON94100 DMO タンパク質は、安定して後代で発現していることが確認された(参照 21)。

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

DMO タンパク質の触媒部位に関する研究から(参照 22, 23)、構造的にジカンバに類似した化合物は、DMO タンパク質の基質となる可能性があると考えられたが、セイヨウナタネにおいて類似化合物の報告はなく、植物に存在している化合物中で最も構造的にジカンバに類似している σ -アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) でも、DMO タンパク質により代謝されないことが確認されている(参照 22, 23)。したがって、改変 MON94100 DMO タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で栽培されたセイヨウナタネ MON94100 及び非組換えセイヨウナタネの種子について、構成成分の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った。なお、セイヨウナタネ MON94100 については、ほ場で栽培する際に除草剤ジカンバの散布を行った(参照 24)。

(1) 栄養素

粗タンパク質及び 18 種類のアミノ酸、粗脂肪及び 11 種類の脂肪酸、炭水化物及び繊維質、灰分及び 2 種類の無機質並びに 2 種類のビタミンについて分析

を行った結果、対照に用いた非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった(参照 1)。

(2) 有害生理活性物質及び栄養阻害物質

グルコシノレート類、フィチン酸、シナピン及びタンニンについて分析を行った結果、シナピンにおいて統計学的有意差が認められたが、その平均値は ILSI データベースの範囲内であった(参照 1)。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

カナダにおいては、食品としての申請が、カナダ保健省 (Health Canada) に対して、飼料・環境についての申請が、カナダ食品検査庁 (CFIA) に対して行われ、それぞれ 2021 年 4 月に安全性審査が終了した。

米国においては、食品・飼料としての申請が、2020 年 1 月に米国食品医薬品庁 (FDA) に対して、無規制裁培のための申請が、同年 3 月に米国農務省 (USDA) に対して行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、食品としての安全性審査の申請が、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して行われ、2021 年 7 月に安全性審査が終了した。

欧州においては、食品、飼料及び輸入のための安全性審査の申請が、欧州食品安全機関 (EFSA) に対して 2020 年 10 月に行われた。

9. 栽培方法に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 の栽培方法は、雑草防除に除草剤ジカンバが散布可能である点を除き、従来のセイヨウナタネと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

セイヨウナタネ MON94100 の種子の製法及び管理方法は、従来のセイヨウナタネと同じである。

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

第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤ジカンバ耐性セイヨウナタネ MON94100 系統」については、「遺伝子組換え食品 (種子植物) の安全性評価基準」(平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定) に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. ILSI. Summary report: Canola - Brassica napus. Composition Database Version 7.0. 2019.
2. OGTR. The biology of Brassica napus L. (canola). 2008.
3. OECD. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of low erucic acid rapeseed (canola): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. ENV/JM/MONO(2011)55. 2011.
4. Codex. Standard for named vegetable oils (CXS 210-1999). 2019.
5. Liener I E. Non-nutritive factors and bioactive compounds in soy. In Drackley J K (ed.), Animal Nutrition. Federation of Animal Science Societies. 2000; p. 13-45
6. Hagerman A E. Tannins as metal ion chelators. Miami University of Ohio. 2002.
7. Sequence of Genetic Elements in PV-BNHT508701 (社内文書).
8. Lira F, Berg G, and Martínez J L: Double-Face Meets the Bacterial World: The Opportunistic Pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Front Microbiol 2017; 8: 2190
9. Chakraborty S, Behrens M, Herman P L, Arendsen A F, Hagen W R, Carlson D L et al.: A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: purification and characterization. Arch Biochem Biophys 2005; 437: 20-8
10. Updated Bioinformatics Evaluation of DMO+27 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (社内文書).
11. Maiti I B and Shepherd R J: Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. Biochem Biophys Res Commun 1998; 244: 440-4
12. Hunt A G: Messenger RNA 3' End Formation in Plants. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 1994; 45: 47-60
13. Niepel M and Gallie D R: Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. J Virol 1999; 73: 9080-8
14. Fluhr R, Moses P, Morelli G, Coruzzi G, and Chua N H: Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. Embo j 1986; 5: 2063-71
15. Amended from MSL0030076: Molecular Characterization of Dicamba Tolerant Canola (MON 94100) (社内文書).
16. Amended From TRR0000136: Updated Bioinformatics Evaluation of MON 94100 Utilizing the EST_2020, NT_2020, and NR_2020 Databases (社内文書).
17. Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 94100 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020, Databases

- (社内文書).
18. Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in MON 94100 Utilizing the AD_2020, TOX_2020, and PRT_2020 Databases (社内文書).
 19. Assessment of DMO Protein Levels in Canola Leaf, Root, Forage, and Grain Tissues Collected from MON 94100 Produced in United States and Canadian Field Trials During 2018. (社内文書).
 20. Martín-Hernández C, Bénet S, and Obert L: Determination of proteins in refined and nonrefined oils. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 4348-51
 21. Demonstration of the Presence of DMO Protein in Canola Grain Samples Across Multiple Generations of MON 94100 (社内文書).
 22. D'Ordine R L, Rydel T J, Storek M J, Sturman E J, Moshiri F, Bartlett R K et al.: Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J Mol Biol* 2009; 392: 481-97
 23. Dumitru R, Jiang W Z, Weeks D P, and Wilson M A: Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol* 2009; 392: 498-510
 24. Amended Report for MSL0030455: Compositional Analyses of Canola Seed from MON 94100 Grown in the United States and Canada During the 2018 Season (社内文書).