



府食第724号
平成30年11月27日

厚生労働大臣
根本 匠 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成30年3月27日付け厚生労働省発生食0327第3号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 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。

遺伝子組換え食品等評価書

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 系統

2018年11月

食品安全委員会

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	6
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	6
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	7
2. 性質に関する事項	7
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	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	12

項	14
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	16
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	16
7. 宿主との差異に関する事項.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	17
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.....	18
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	18
<参照>	19

<審議の経緯>

- 2018年3月27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0327第3号）、関係書類の接受
- 2018年4月3日 第691回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年4月23日 第174回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年9月28日 第178回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年10月16日 第716回食品安全委員会（報告）
- 2018年10月17日から11月15日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2018年11月21日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長に報告
- 2018年11月27日 第722回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

- | (2018年6月30日まで) | (2018年7月1日から) |
|----------------|---------------|
| 佐藤 洋（委員長） | 佐藤 洋（委員長） |
| 山添 康（委員長代理） | 山本 茂貴（委員長代理） |
| 吉田 緑 | 川西 徹 |
| 山本 茂貴 | 吉田 緑 |
| 石井 克枝 | 香西 みどり |
| 堀口 逸子 | 堀口 逸子 |
| 村田 容常 | 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>

- | | |
|-------------|-------|
| 中島 春紫（座長） | |
| 小関 良宏（座長代理） | |
| 児玉 浩明（座長代理） | |
| 岡田 由美子 | 手島 玲子 |
| 橘田 和美 | 樋口 恭子 |
| 近藤 一成 | 山川 隆 |
| 鈴木 秀幸 | 吉川 信幸 |
| 柘植 郁哉 | |

要 約

「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 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、ワタ (*Gossypium hirsutum* L.) に *Bacillus thuringiensis* EG2934 株に由来する改変 *cry51Aa2* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry51Aa2* タンパク質を発現することで、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に属する特定の害虫による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の結果、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分等の比較の結果等について確認した結果、非組換えワタ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、「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 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：カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702
系統

性 質：特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702」（以下「ワタ MON88702」という。）は、ワタ（*Gossypium hirsutum* L.）に *B. thuringiensis* EG2934 株に由来する改変 *cry51Aa2* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry51Aa2* タンパク質を発現することで、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に属する特定の害虫による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、アオイ科ワタ属に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 DP393 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cry51Aa2* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* EG2934 株である（参照 1）。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cry51Aa2* 遺伝子は、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に属する特定の害虫に対する殺虫活性を付与する改変 *Cry51Aa2* タンパク質を発現する。

改変 *cry51Aa2* 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

ワタから搾油した綿実油は食品として使用され、食用油、マーガリンの原料等として用いられる。また、リンター（地毛）は高度に加工されて食品の増粘剤等に用いられる。

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

ワタの主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 19.19～32.97%、総脂質

15.05～27.90%、灰分 3.01～5.48%及び炭水化物 39.0～59.2%である(参照 2)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

ワタの有害生理活性物質は、総ゴシポール 0.35～1.61% (対乾燥重量)、遊離ゴシポール 0.38～1.42% (対乾燥重量)、マルバリン酸 0.11～0.85% (対総脂肪酸)、ステルクリン酸 0.06～0.56% (対総脂肪酸) 及びジヒドロステルクリン酸 0.03～0.33% (対総脂肪酸) である(参照 2)。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法

ワタ MON88702 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のワタと変わらない。

(2) 摂取(可食)部位

ワタ MON88702 の摂取部位は、従来のワタと変わらない。

(3) 摂取量

ワタ MON88702 の摂取量は、従来のワタと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ワタ MON88702 の調理及び加工方法は、従来のワタと変わらない。

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

比較対象は、宿主及び従来品種のみである。

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

ワタ MON88702 は、改変 *cry51Aa2* 遺伝子の導入によって、改変 Cry51Aa2 タンパク質を発現することが、宿主との相違点である。

1. ～6. から、ワタ MON88702 の安全性評価においては、既存のワタ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

ワタ MON88702 において、導入された改変 *cry51Aa2* 遺伝子は改変 Cry51Aa2 タンパク質を発現することによって、特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対して抵抗性を示すとされている。なお、標的害虫は、米国において食害の大きいカメムシ目及びアザミウマ目昆虫である。

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、アオイ科ワタ属に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の商業品種 DP393 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

ワタ属に属する品種のうち、栽培種は *G. arboreum*、*G. herbaceum*、*G. barbadense* 及び *G. hirsutum* の 4 種である。現在生産されているワタのほとんどが *G. barbadense* 及び *G. hirsutum* であり、長い栽培の歴史を持つ。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸（マルバリニン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）が含まれている。ゴシポールは、単胃動物において、食欲減退、体重減少及び呼吸困難を引き起こし（参照 3）、シクロプロペノイド脂肪酸は、脂質の代謝に異常を起こすことが報告されている（参照 4）。これらは、綿実油の製造工程で不活性化又は除去されることが報告されている（参照 5、6）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ワタは、主要なアレルギー誘発性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

ワタには、細菌及びウイルスによる各種病害が発生することが知られているが、これらがヒトに対して病原性を示すことは報告されていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ワタから得られる綿実油及びリンターが食品として利用される。リンターは、高度に加工されて食品の増粘剤等に用いられ、綿実油は、食用油、マーガリンの原料等として利用される。

7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ属の近縁種の種子には、ゴシポールが含まれてい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

ワタ MON88702 の作出に使用した導入用プラスミド PV-GHIR508523 の外骨格領域は、プラスミド pBR322、プラスミド pRi 等に基づき構築された。

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

導入用プラスミド PV-GHIR508523 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-GHIR508523 の外骨格領域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

導入用プラスミド PV-GHIR508523 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-GHIR508523 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 *nptII* 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-GHIR508523 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 *cry51Aa2* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* EG2934 株である（参照 1）。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cry51Aa2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* については、ヒト、家畜等への病原性及びアレルギー性は報告されていない。

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 *cry51Aa2* 遺伝子は、コウチュウ目害虫への殺虫活性を指標に、*B. thuringiensis* EG2934 株から単離された野生型 Cry51Aa2 タンパク質をコードする *cry51Aa2* 遺伝子配列を基に合成された（参照 1）。殺虫活性を増強するため、PCR を用いた部位特異的変異導入法によって、野生型 Cry51Aa2 タンパク質の 8 か所にアミノ酸置換及び 1 か所に 3 アミノ酸欠失が導入されるように改変を行った（参照 8）。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

改変 *cry51Aa2* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域（表 1）及び *aadA* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域（表 2）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）。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

改変 *cry51Aa2* 遺伝子がコードする改変 **Cry51Aa2** タンパク質は、一般的な **Cry** タンパク質と同様に、標的害虫に摂取されると消化されて活性コアタンパク質となり、中腸に作用し、上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示す（参照9）。

改変 **Cry51Aa2** タンパク質は、主要な標的である近縁のカメムシ目及びアザミウマ目に属する特定の害虫に対して高い殺虫活性を示すが、遠縁のコウチュウ目害虫に対しては弱い殺虫活性を示すと報告されている（参照10）。

改変 **Cry51Aa2** 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、毒性タンパク質データベース^aを用いて相同性検索を行った。その結果、*E*-score が 1×10^{-5} 以下の相同性を示すものとして、アエロリジントキシシンファミリータンパク質に分類されるアミノ酸配列が1個（GI-1102943401）検出された。この GI-1102943401 配列について、タンパク質データベース^bを用いて検索を行った結果、ほ乳類への毒性が明らかな既知のアエロリジンファミリータンパク質との相同性は認められなかった。さらに、改変 **Cry51Aa2** タンパク質のアミノ酸配列とドメインごとの相同性の検証を行った結果、受容体結合ドメインにおける相同性は低いことから、改変 **Cry51Aa2** タンパク質と GI-1102943401 の標的生物種特異性は異なると考えられた。

また、改変 **Cry51Aa2** タンパク質が属する **ETX_MTX2** ファミリータンパク質には、反芻動物に対して毒性を引き起こす **ETX** タンパク質も存在するが、**ETX** タンパク質の毒性発現に関与する受容体結合ドメインのチロシン残基（参照11）が改変 **Cry51Aa2** タンパク質には存在しないことから、改変 **Cry51Aa2** タンパク質と **ETX** タンパク質の標的生物種特異性は異なると考えられた。

なお、マウスを用いた経口急性毒性試験の結果、改変 **Cry51Aa2** タンパク質 5,000mg/kg 体重の投与量において、毒性を示唆する所見は認められなかった（参照12）。

したがって、改変 **Cry51Aa2** タンパク質がほ乳類に対して毒性を有する可能性は低いと考えられた（参照13、14）。

（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-GHIR508523 には、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 *aadA* 遺伝子が、形質転換の選抜マーカーとして T-DNA II 領域に含まれている。また、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子が外骨格領域に存在している。ワタ MON88702 に両遺伝

^a TOX_2017: PRT_2017 (GenBank protein database, 217 版 2017 年 2 月 9 日) から検索して収集した 22,760 配列のサブユニット。

^b PRT_2017: GenBank (GenBank protein database, 217 版 2017 年 2 月 9 日) タンパク質 61,983,812 配列を含む。

子とも存在しないことが、次世代シーケンス (NGS) 解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

T-DNA I 領域の改変 *cry51Aa2* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の *Hsp81-2* 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列である (参照 15)。

T-DNA II 領域の *aadA* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の *EF-1 alpha* 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンからなる配列である (参照 16)。

(2) ターミネーターに関する事項

T-DNA I 領域の改変 *cry51Aa2* 遺伝子のターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA の 3' 末端非翻訳領域である (参照 17)。

T-DNA II 領域の *aadA* 遺伝子のターミネーターは、エンドウ (*Pisum sativum*) の *rbcS2* 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域である (参照 18)。

(3) その他

T-DNA I 領域の改変 *cry51Aa2* 遺伝子及び T-DNA II 領域の *aadA* 遺伝子のそれぞれのプロモーター上流に、植物細胞内での発現を高めるため、Figwort mosaic virus (FMV) の 35S RNA のエンハンサー配列を挿入した。

T-DNA II 領域には、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている *ShkG* 遺伝子の *CTP2* ターゲティング配列を含む (参照 19)。

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-GHIR508523 は、中間プラスミドに外骨格領域、T-DNA I 及び T-DNA II 領域を挿入することによって構築された。

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-GHIR508523 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)。

(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-GHIR508523 の全て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（参照 13、20）。

(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-GHIR508523 の T-DNA I 領域の RB から 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-GHIR508523 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜によって純化されており、目的外の遺伝子の混入はないことが塩基配列の解析によって確認されている。

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-GHIR508523 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって宿主に導入後、スペクチノマイシン等を含む培地で選抜して再生個体を得た。次に、再分化個体を自殖して得られる R1 世代において、T-DNA II 領域を有さず、T-DNA I 領域をホモで有する個体を定量 PCR 法によって選抜し、一般的なワタの育成プロセスに従って自殖を行い、ワタ MON88702 を得た。

表 1 ワタ MON88702 への挿入 DNA① (T-DNA I)

構成 DNA	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>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域
(改変 <i>cry51Aa2</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>FMV</i>	エンハンサー配列 Figwort mosaic virus (FMV) の 35S RNA のエンハンサー 植物細胞内での転写を高める。
<i>Hsp81-2</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の熱ショックタンパク質 (HSP81-2) のプロモーター及びリーダー配列植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
改変 <i>cry51Aa2</i>	<i>B. thuringiensis</i> 由来の改変 <i>Cry51Aa2</i> タンパク質をコードする遺伝子 特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。
<i>35S</i> ターミネーター	ターミネーター領域 カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA の 3' 末端非翻訳領域

	転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
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>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域

表2 ワタ MON88702 への挿入 DNA② (T-DNA II : 選択マーカーとして一時的に導入)

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>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域
(aadA 遺伝子発現カセット)	
<i>E9</i> ターミネーター	ターミネーター領域 エンドウ (<i>P. sativum</i>) の <i>rbcS2</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域 転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する。
<i>aadA</i>	<i>Escherichia.coli</i> のトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変遺伝子領域 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。
<i>CTP2</i>	ターゲティング配列 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>shkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 目的タンパク質を葉緑体へ輸送する。
<i>EF-1α</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>EF-1alpha</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン 目的遺伝子の恒常発現を誘導する。
<i>FMV</i>	エンハンサー配列 Figwort mosaic virus (FMV) の 35S RNA のエンハンサー 植物細胞内での転写を高める。
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>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

ワタ MON88702 及び非組換えワタからゲノム DNA を抽出し、NGS 解析を

行った結果、両ゲノムから読み得られたリード^cの平均冗長度^dは、それぞれ 82 及び 80 であった。導入用プラスミドと相同性を有するリードを検出し、ワタ MON88702 のゲノム配列とアライメントすることで導入遺伝子とワタゲノムとの接合領域を特定した。両ゲノムにおける接合領域の検出数を確認した結果、ワタ MON88702 ではゲノムの 1 か所に 2 つの接合領域が特定されたが、非組換えワタではこれらの接合領域は確認されなかった。また、ワタ MON88702 の NGS 解析から得られたリード及び導入用プラスミド PV-GHIR508523 の配列について相同性解析を行った結果、T-DNA I 領域の冗長度は中央値が 79、最低冗長度が 42 であり、ワタ MON88702 の T-DNA I 全領域にわたってリードが検出されたものの、T-DNA II 領域及び外骨格領域と相同性のある配列は確認されなかった。以上から、ワタ MON88702 のゲノム中には T-DNA I 領域が 1 か所に 1 コピー挿入され、T-DNA II 領域及び導入用プラスミドの外骨格領域は存在しないことが確認された。さらに、ワタ MON88702 における導入遺伝子の挿入領域について PCR 産物の塩基配列を解析し、導入用プラスミドの 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（参照 21）。

ワタ MON88702 に挿入された DNA の塩基配列及び近傍配列について PCR 及びシーケンス解析を行った結果、挿入位置において、内在性配列に 244 bp の欠失及び 4 bp の付加が確認されたが、そのほかの近傍配列については対照の非組換えワタと一致し、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 21）。

T-DNA の挿入によって、ワタ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 (1,642 bp)、欠失した内在性配列 (244 bp) 及び 3' 末端近傍配列 (1,959 bp) について、データベース^eを用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索では E -score が 1×10^{-6} 以下の塩基配列が確認されたが、相同性は 95% 以下であり、blastx 検索では E -score が 1×10^{-8} 以下のアミノ酸配列は認められなかった。したがって、T-DNA の挿入によって宿主の内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられた。

(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

ワタ MON88702 の挿入 DNA 領域 (3,143 bp) と 5' 末端近傍配列 (1,642 bp) 及びワタ MON88702 の挿入 DNA 領域 (3,143 bp) と 4 bp の付加を含む 3' 末端近傍配列 (1,963 bp) との接合部において意図しない ORF が生じてい

^c NGS 解析によって読み取られる数百 bp の塩基配列の単位。本試験では、1 リードの塩基長を約 125 bp として、DNA 断片の両端の塩基配列を読み取っている（ペアリード法）。

^d 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。

^e EST_2017:GenBank、NT_2017:GenBank、NR_2017:GenBank

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 22）。

検出された ORF について、データベースを用いて既知アレルゲン及び毒性タンパク質との相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列について 35%以上の相同性を示す配列及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する配列は見いだされず、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性は認められなかった（参照 22）。

ワタ MON88702 の挿入 DNA 領域において、既知の毒性タンパク質との相同性が検出された *E*-score が 1×10^{-5} 以下である 1 個の配列は、第 5-2-(3) にて考察されたタンパク質であり、したがって、既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性のあるタンパク質との相同性は認められなかった（参照 20）。

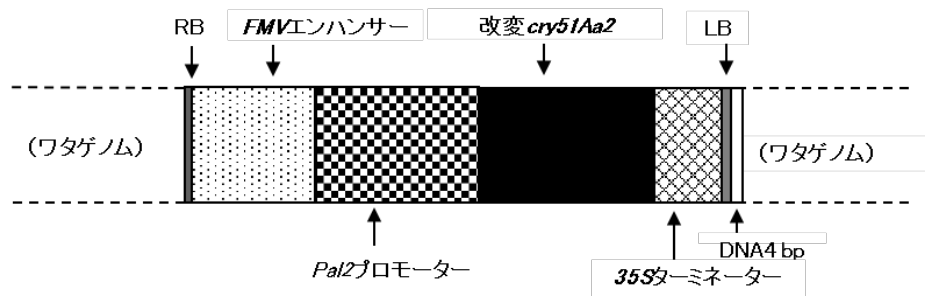


図1 ワタ MON88702 に挿入された DNA (模式図)

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

ワタ MON88702 の葉、茎、根及び種子における改変 Cry51Aa2 タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 3 のとおりである（参照 23）。

表 3 ワタ MON88702 における改変 Cry51Aa2 タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	改変 Cry51Aa2 タンパク質の発現量
葉	1000~1200
根	190
花粉	2.6
種子	130

* 葉は第 2~6 葉期及び開花期、根及び花粉は開花期、種子は成熟期における値を示した。

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

ワタから生産される主要食品は、綿実から精製、脱色及び脱臭された油（RBD

オイル) 並びに微量のリンターである。RBD オイルには検出限界値未満のタンパク質しか含まれておらず (参照 24)、食用リンターは 99%以上がセルロースである (参照 25)。改変 Cry51Aa2 タンパク質が仮に残存していたとしても、その量はごく僅かであり、一日蛋白摂取量への影響はないと考えられる。

4. 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

改変 *cry51Aa2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* について、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 Cry51Aa2 タンパク質について、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

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry51Aa2 タンパク質の人工胃液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、完全長の改変 Cry51Aa2 タンパク質は試験開始後 0.5 分以内に消化されることが確認された。両分析において、試験開始後 0.5 分以内に約 31 kDa の断片が観察されたが、2 分後には観察されなかった。SDS-PAGE 分析では、試験開始後 0.5 分以内に約 4 kDa の断片が観察されたが、20 分以内に消失した (参照 26)。

この約 4 kDa の断片の消化性について確認するために人工胃液処理を 2 分間行った後に連続して人工腸液処理を行った結果、SDS-PAGE 分析において人工腸液処理 0.5 分以内に消失することが確認された (参照 26)。

② 人工腸液に対する感受性

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry51Aa2 タンパク質の人工腸液中での消化性について確認するためにウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始 24 時間後においても消化されなかった (参照 26)。

③ 加熱処理に対する感受性

B. thuringiensis で発現させた改変 Cry51Aa2 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、25、37、55、75 及び 95°C でそれぞれ 15 分間及び 30 分間加熱処理し、ELISA 分析を行った。55°C 以上のいずれの加熱処理時間でも定量限界値未満となり、改変 Cry51Aa2 タンパク質は、加熱処理によって免疫反応性を失うことが示された (参照 27)。

(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 Cry51Aa2 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_2017 を用いて FASTA アルゴリズムの相同性検索を行った結果、*E-score* が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列は検出されなかった(参照 13)。

また、連続する 80 アミノ酸以上の配列について 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アレルゲンは見いだされなかった。

(1) ~ (4) 及び前項 3. から総合的に判断し、改変 Cry51Aa2 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、5 世代のワタ MON88702 の種子から抽出されたゲノム DNA を用いて NGS 解析を行った。その結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 つ検出され、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 21)。

また、改変 Cry51Aa2 タンパク質の発現の安定性を確認するために 5 世代のワタ MON88702 の葉についてウェスタンブロット分析を行った結果、供試したいずれの世代でも改変 Cry51Aa2 タンパク質の発現が確認された(参照 28)。

さらに、ワタ MON88702 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のワタ MON88702 について挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、導入遺伝子は、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 29)。

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 Cry51Aa2 タンパク質が酵素活性を持つとの報告はない。したがって、改変 Cry51Aa2 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

米国のほ場で栽培されたワタ MON88702 及び非組換えワタのリンターを除いた種子について、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び有害生理活性物質等の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた(参照 30)。

(1) 主要構成成分

種子の主要構成成分(タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び総食物繊維)について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められないか、認められた場合であっても文献値の範囲内であった(参照 2)。

(2) アミノ酸組成

種子のアミノ酸 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ワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

(3) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 14 種類について分析を行った結果、7 種類は対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められたが、ラウリン酸 (C12:0) を除き、文献値の範囲内であった (参照 2)。ラウリン酸 (C12:0) の平均値は、Codex で報告されている綿実油における範囲内であった (参照 31)。

(4) ミネラル類

種子のカルシウム及びリンについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められないか、認められた場合であっても文献値の範囲内であった (参照 2)。

(5) ビタミン類

種子の α -トコフェロールについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

(6) 有害生理活性物質等

種子の総ゴシポール、遊離ゴシポール、マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められなかった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁 (FDA) に対して食品・飼料としての安全性審査のための申請が行われ、2018 年 9 月に安全性の確認が終了した。

カナダにおいては、カナダ保健省 (Health Canada) に対して食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁 (CFIA) に対して環境・飼料としての安全性審査のための申請が行われ、いずれも 2018 年 8 月に安全性の確認が終了した。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2018 年 8 月に安全性の確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ MON88702 の栽培方法は、従来のワタと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ MON88702 の種子の製法及び管理方法は、従来のワタと同じである。

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

「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 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: Baum J A, Sukuru U R, Penn S R, Meyer S E, Subbarao S, Shi X, et al. Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *J Econ Entomol.* 2012, 105(2), p. 616-624
- 2: ILSI. "ILSI Crop Composition Database, Version 5.0.". <http://www.cropcomposition.org>, (cited July 27, 2016)
- 3: Berardi L C and L.A. G. Gossypol. In Liener IE (eds.). *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Second Edition. Academic Press, New York, 1980; p. 184-237
- 4: Cao J, Blond J P and Bezar J. Inhibition of fatty acid delta 6- and delta 5- desaturation by cyclopropene fatty acids in rat liver microsomes. *Biochim Biophys Acta.* 1993, 1210(1), p. 27-34
- 5: Harris W D. Cottonseed. In McKetta JJ (eds.). *Encyclopedia of Chemical Processing and Design: Corrosion to Cottonseed Volume 12* Taylor & Francis New York, 1981; p. 375-391
- 6: NCPA. Cottonseed oil. In (eds.). *Book Cottonseed oil*. National Cottonseed Products Association, Memphis, Tennessee, 1993
- 7: Sequence of Genetic Elements in PV-GHIR508523. (社内文書)
- 8: Gowda A, Rydel T J, Wollacott A M, Brown R S, Akbar W, Clark T L, et al. A transgenic approach for controlling *Lygus* in cotton. *Nat Commun.* 2016, 712213
- 9: Jerga A, Chen D, Zhang C, Fu J, Kouadio J K, Wang Y, et al. Mechanistic insights into the first *Lygus*-active beta-pore forming protein. *Arch Biochem Biophys.* 2016, 600, p. 1-11
- 10: Bachman P M, Ahmad A, Ahrens J E, Akbar W, Baum J A, Brown S, et al. Characterization of the Activity Spectrum of MON 88702 and the Plant-Incorporated Protectant Cry51Aa2.834_16. *PLoS One.* 2017, 12(1), p. e0169409
- 11: Bokori-Brown, M., C.A. Hall, C. Vance, S.P. Fernandes da Costa, C.G. Savva, C.E. Naylor, A.R. Cole, A.K. Basak, D.S. Moss and R.W. Titball. 2014. *Clostridium perfringens* epsilon toxin mutant Y30A-Y196A as a recombinant vaccine candidate against enterotoxemia. *Vaccine* 32: 2682-2687
- 12: Farmer, D.R., T.C. Edrington, C.R. Kessenich, C. Wang and J.S. Petrick. 2017. Improving insect control protein activity for GM crops: A case study demonstrating that increased target insect potency can be achieved without impacting mammalian safety. *Regul Toxicol Pharmacol* 89: 155-164
- 13: Bioinformatics Evaluation of the mCry51Aa2 Protein in MON 88702 Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028423). (社内文書)
- 14: Moar W J, Evans A J, Kessenich C R, Baum J A, Bowen D J, Edrington T C, et al. The sequence, structural, and functional diversity within a protein family

- and implications for specificity and safety: The case for ETX_MTX2 insecticidal proteins. *J Invertebr Pathol.* 2017, 142, p. 50-59
- 15: Yabe N, Takahashi T and Komeda Y. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant Cell Physiol.* 1994, 35(8), p. 1207-1219
 - 16: Axelos M, Bardet C, Liboz T, Le Van Thai A, Curie C and Lescure B. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha: molecular cloning, characterization and expression. *Mol Gen Genet.* 1989, 219(1-2), p. 106-112
 - 17: Mogen B D, MacDonald M H, Graybosch R and Hunt A G. Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plants. *Plant Cell.* 1990, 2(12), p. 1261-1272
 - 18: Coruzzi G, Broglie R, Edwards C and Chua N H. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *Embo j.* 1984, 3(8), p. 1671-1679
 - 19: Herrmann K M. The Shikimate Pathway: Early Steps in the Biosynthesis of Aromatic Compounds. *Plant Cell.* 1995, 7(7), p. 907-919
 - 20: Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 88702 Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028694). (社内文書)
 - 21: Amended Report for MSL0028391: Molecular Characterization of Insect Protected Cotton MON 88702 (MSL0029612). (社内文書)
 - 22: Amended Report for MSL0028693: Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the MON 88702 Insert: Assessment of Putative Polypeptides Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028798). (社内文書)
 - 23: Assessment of Cry51Aa2.834_16 Protein Levels in Cotton Tissues Collected from MON 88702 系統 Produced in United States Field Trials During 2015 (MSL0027766). (社内文書)
 - 24: Reeves J B W, J.L. . Composition of foods: Fats and oils. *Agriculture Handbook No. 8-4.* 1979
 - 25: NCPA. "Cottonseed and its products".
<http://www.cottonseed.com/publications/cottonseedanditsproducts.asp>, (cited October 17, 2011)
 - 26: Amended Report for MSL0027977: Assessment of the in vitro Digestibility of Cry51Aa2.834_16 Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0028885). (社内文書)
 - 27: Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Bacillus thuringiensis*-produced MON 88702 Cry51Aa2.834_16 Protein (MSL0028437). (社内文書)
 - 28: Demonstration of the Presence of Cry51Aa2.834_16 Protein in *Lygus* Cotton Leaf Samples across Multiple Generations of MON 88702 (MSL0027352). (社内文書)

- 29: Amended Report for MSL0026822: Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect-protected Cotton MON 88702 Across Three Generations (MSL0027485). (社内文書)
- 30: Amended Report for MSL0029033: Compositional Analyses of Cottonseed from MON 88702 Grown in the United States During the 2015 Season (MSL0029119). (社内文書)
- 31: CODEX. Codex Alimentarius; Section 2. Codex standard for named vegetable oils (CODEX-STAN 210 - 1999). 1999