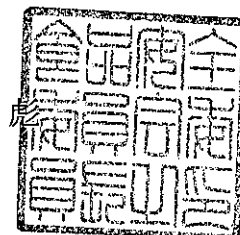




府食第919号
平成19年9月27日

厚生労働大臣
舛添 要一 殿

食品安全委員会
委員長 見上



食品健康影響評価の結果について

平成19年2月19日付け厚生労働省発食安第0219001号をもって貴省から当委員会に対し意見を求められた食品「除草剤グリホサート耐性ダイズMON89788系統」(申請者:日本モンサント株式会社)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ましたので通知します。

なお、審議結果については、別添のとおりです。

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統

2007年9月

食品安全委員会

目次

| | 頁 |
|---------------------------------------------------|---|
| 審議の経緯 | 1 |
| 食品安全委員会委員名簿 | 1 |
| 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 | 1 |
| 要約 | 2 |
| 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果 | 3 |
| . はじめに | 3 |
| . 評価対象食品の概要 | 3 |
| . 食品健康影響評価 | 3 |
| 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 | 3 |
| 1 宿主及び導入DNAに関する事項 | 3 |
| 2 宿主の食経験に関する事項 | 3 |
| 3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項 | 4 |
| 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 | 4 |
| 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 | 4 |
| 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 | 4 |
| 第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項 | 5 |
| 第3 宿主に関する事項 | 5 |
| 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 | 5 |
| 2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項 | 5 |
| 3 有害生理活性物質の生産に関する事項 | 5 |
| 4 アレルギー誘発性に関する事項 | 5 |
| 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 | 6 |
| 6 安全な摂取に関する事項 | 6 |
| 7 近縁の植物種に関する事項 | 6 |
| 第4 ベクターに関する事項 | 6 |
| 1 名称及び由来に関する事項 | 6 |
| 2 性質に関する事項 | 6 |
| 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 | 7 |
| 1 挿入DNAの供与体に関する事項 | 7 |
| 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 | 7 |
| 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 | 8 |

| | | |
|-----|-----------------------------------------|----|
| 4 | ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 | 8 |
| 5 | 構築された発現ベクターに関する事項 | 8 |
| 6 | DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項 | 9 |
| 第 6 | 組換え体に関する事項 | 9 |
| 1 | 遺伝子導入に関する事項 | 9 |
| 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 | 10 |
| 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 | 10 |
| 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 | 11 |
| 5 | 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項 | 12 |
| 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 | 12 |
| 7 | 宿主との差異に関する事項 | 12 |
| 8 | 諸外国における認可、食用等に関する事項 | 13 |
| 9 | 栽培方法に関する事項 | 13 |
| 10 | 種子の製法及び管理方法に関する事項 | 13 |
| 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 | 13 |
| | 食品健康影響評価結果 | 14 |
| | 参考文献 | 14 |

審議の経緯

| | |
|------------------|-------------------------------------------------|
| 平成19年2月19日 | 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の受理 |
| 平成19年2月22日 | 第179回食品安全委員会（要請事項説明） |
| 平成19年3月9日 | 第46回遺伝子組換え食品等専門調査会 |
| 平成19年6月18日 | 第49回遺伝子組換え食品等専門調査会 |
| 平成19年8月3日 | 第51回遺伝子組換え食品等専門調査会 |
| 平成19年8月23日 | 第203回食品安全委員会（報告） |
| 平成19年8月23日～9月21日 | 国民からの意見・情報の募集 |
| 平成19年9月25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へ報告 |
| 平成19年9月27日 | 第208回食品安全委員会（報告） 同日付で食品安全委員会委員長から厚生労働大臣へ通知 |

食品安全委員会委員

| | |
|-------|--------|
| 委員長 | 見上 彪 |
| 委員長代理 | 小泉直子 |
| | 長尾 拓 |
| | 野村一正 |
| | 畑江敬子 |
| | 廣瀬雅雄*1 |
| | 本間清一 |

*1:平成19年4月1日から

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

| | | |
|------|-------|-------|
| 座長 | 早川堯夫 | |
| 座長代理 | 澤田純一 | |
| | 五十君静信 | 手島玲子 |
| | 池上幸江 | 丹生谷博 |
| | 今井田克己 | 室伏きみ子 |
| | 宇理須厚雄 | 山川隆 |
| | 小関良宏 | 山崎壮 |
| | 橘田和美 | 渡邊雄一郎 |
| | 澁谷直人 | |

要 約

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、遺伝子組換えダイズ「除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統」の食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。

評価対象食品の概要

名 称 : 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統
性 質 : 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耐性ダイズ MON89788 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製されており、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。

食品健康影響評価結果

「除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 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」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された。

除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統に係る食品健康影響評価に関する審議結果

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統の食品の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 19 年 2 月 19 日、関係書類を受理)

評価対象食品の概要

名称 : 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統
性質 : 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耐性ダイズ MON89788 系統」(以下、「ダイズ MON89788 系統」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製されており、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。

本食品の宿主であるダイズは、豆腐や味噌等の加工製品の他、ダイズ油等に幅広く用いられている。

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

宿主植物は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ(*G. max* L. Merr.)の商業品種 A3244 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

ダイズ MON89788 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から単離された *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものである。

(3) 導入 DNA の性質及び導入方法

組換えダイズのゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与するタンパク質を発現させる。当該挿入 DNA は、商業品種ダイズである A3244 に、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を含むプラスミド PV-GMGOX20 を用いてアグロバクテリウム法により導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

ダイズは、豆腐や味噌等の製品へ加工されている他、ダイズ油は、ショートニングやマーガリン等に用いられており、安全な食品としての長い利用の歴史をもつ。

現在、我が国では年間約 434 万トンのダイズが消費されているが、そのうち約 7 割は製油用で、

豆腐、味噌、醤油等がこれに次いでいる(参考文献 1)。消費量のうち、国内産は約 23 万トンで、大部分は輸入され、その約 75%は米国産である(参考文献 1)。

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

ダイズの穀粒中の主要栄養組成はタンパク質 32.9-48.4%、脂質 16.0-27.7%、灰分 4.29-5.94%、炭水化物 29.3-41.3%、粗繊維 5.74-7.89%、酸性デタージェント繊維(ADF) 7.81-18.61%及び中性デタージェント繊維(NDF) 8.53-21.25%と報告されている(文献値)。

(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

宿主であるダイズには、既知の有害生理活性物質として、トリプシンインヒビター及びダイズレクチンが含まれている。このうちトリプシンインヒビターは、タンパク質の分解を妨げるため、生ダイズを摂取した場合には、動物の生育に悪影響を及ぼす(参考文献 2)が、ダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によって、その大半が不活性化する。

また、ダイズレクチンは、細胞膜を構成する糖タンパク質や糖脂質の糖部分に結合することで、細胞凝集や細胞分裂の誘発などを引き起こすことが知られ、生ダイズを摂取した場合には、動物の成育に悪影響を及ぼすが、ダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によって、その大半が不活性化する(参考文献 2)。

ダイズ種子中のトリプシンインヒビター含有量は、19.59-118.68TIU/mg(乾燥重量)(以下(DW)と記載)(TIU:trypsin inhibitor unit)(参考文献 3)である。また、ダイズレクチンの含有量は、0.105-9.038H.U./mg(生組織重量)(以下(FW)と記載)(H.U.:hemagglutinating unit)(参考文献 3)である。

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

ダイズ MON89788 系統の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のダイズと変わらない。

(2) 摂取(可食)部位

ダイズ MON89788 系統の可食部位は、従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量

ダイズ MON89788 系統の摂取量は、従来のダイズと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ダイズ MON89788 系統の調理及び加工方法は、従来のダイズと変わらない。

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

ダイズ MON89788 系統において、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの導入により、改変 CP4 EPSPS タンパク質が産生されていることが、宿主との唯一の相違点と考えられる。

以上、1~6 により、ダイズ MON89788 系統の安全性評価においては、既存のダイズとの比較が可能であると判断された。

第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ダイズ MON89788 系統は、そのゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子が、改変 CP4 EPSPS タンパク質を産生することから、栽培中に散布される除草剤グリホサートの影響を受けずに成長することができる。

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

宿主植物はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*G. max* L. Merr.) の商業品種 A3244 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

ダイズ (*Glycine* 属) の原産地は、アジアとオーストラリアであり、植物学的には、*Glycine* 属は *Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分かれる。*Glycine* 亜属は、22 種の多年生野生種で構成されており、オーストラリア、アジア、太平洋諸島等に分布している (参考文献 4)。一方、*Soja* 亜属にはダイズの他にその祖先である野生ダイズの一つであるツルマメ (*G. soja* Sieb. and Zucc) が含まれる。ツルマメは現在、日本、中国、韓国、ロシア及び台湾に自生している (参考文献 4)。なお、ダイズ (*G. max*) 及びツルマメ (*G. soja*) は、いずれも 1 年生植物である。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズには、既知の有害生理活性物質として、複数のトリプシンインヒビター及びダイズレクチンが含まれている。このうちトリプシンインヒビターは、タンパク質の消化を妨げるため、生ダイズを摂取した場合には、動物の生育に悪影響を及ぼす (参考文献 2) が、ダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によって、その大半が不活性化する。

また、ダイズレクチンは、細胞膜を構成する糖タンパク質や糖脂質の糖部分に結合することで、細胞凝集などを引き起こすことが知られ、生ダイズを摂取した場合には、動物の成育に悪影響を及ぼすが、ダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によって、その大半が不活性化する (参考文献 2)。

ダイズ種子中のトリプシンインヒビター含有量は、19.59-118.68TIU/mg DW (参考文献 3) である。また、ダイズレクチンの含有量は、0.105-9.038H.U./mg (FW) (参考文献 3) である。

また、イソフラボン、スタキオース、ラフィノース、フィチン酸を含有していることが知られている。

4 アレルギー誘発性に関する事項

ダイズは 8 大食品アレルギーのひとつとして知られているが (参考文献 5)、8 大アレルギーに含

まれる他の食品よりもアレルギー誘発性は低く(参考文献 6)、我が国の即時型食物アレルギーならびにアナフィラキシーショックを引き起こす原因食物の順位では、大豆は9番目に位置している(参考文献 7)。これまでに、ダイズに含まれるアレルゲンとして、ダイズ疎水性タンパク質、ダイズプロフィリン、ダイズ液胞タンパク質、グリシニン、 β -コングリシニン、Kunitz-トリプシンインヒビター等が同定されている(参考文献 8)。

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

多くの植物と同様に、ダイズの病気は多く知られているが、それらがヒトや動物に感染することは知られていない。

6 安全な摂取に関する事項

ダイズは、世界の主要な穀物の一つであり、古くから製油用の他、豆腐、味噌、醤油等として食されている。現在、我が国では年間約 434 万トンのダイズが消費されているが、そのうち約 7割は製油用で、豆腐、味噌、醤油等がこれに次ぐ用途となっている(参考文献 1)。消費量のうち、国内産は約 23 万トンであり、大部分は輸入され、その約 75%は米国产である(参考文献 1)。

ダイズには有害生理活性物質としてトリプシンインヒビター及びダイズレクチンが含まれているが、これらのタンパク質は、ダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によって、その大半が不活性化される。

7 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種には、同じ *Soja* 亜属に分類されるツルマメ(*G. soja* Sieb. and Zucc.)が知られており、ダイズと同様にトリプシンインヒビターを含むことが報告されている。また、ダイズに含まれることが知られているフィチン酸やラフィノースなどの有害生理活性物質を含むものと推定される。ツルマメは、主に河川敷、工場跡地及び道ばた等に自生している(参考文献 9,10)。

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

ダイズ MON89788 系統の作出に用いられたプラスミド PV-GMGOX20 は、中間プラスミド A 及び C~F を用いて作出されている。

これらの中間プラスミド A 及び C~F は、非病原性 *Escherichia coli* 及び *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)由来である。

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

中間プラスミド A 及び C~F のそれぞれの塩基数及び塩基配列は明らかとなっている。

(2)制限酵素による切断地図に関する事項

それぞれのプラスミドの制限酵素切断地図は明らかとなっている。

(3)既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

それぞれのプラスミドの塩基配列は明らかにされており、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

プラスミド A 及び C~F には、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の 3" (9)-0-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする *aadA* 遺伝子(参考文献 11)及びアンピシリン耐性を付与する -ラクタマーゼをコードする *amp* 遺伝子(参考文献 12)が含まれている。これらの遺伝子のうちプラスミド PV-GMGOX20 には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、この遺伝子は宿主ゲノムには挿入されていない。

(5) 伝達性に関する事項

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

ダイズ MON89788 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する *cp4 epsps* 遺伝子を改変したものである。

(2) 安全性に関する事項

cp4 epsps 遺伝子が由来する *Agrobacterium* sp. は、自然界の土壌や根圏に広く存在する微生物の 1 つであり、ヒトや家畜に対し病原性等の問題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 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. に由来する *cp4 epsps* 遺伝子を基に、発現タンパク質の機能活性に影響を与えることなくダイズ中での発現量を高めるため、塩基配列が最適化されたものである。

挿入 DNA の要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図等は明らかとなっている。

(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

ダイズ MON89788 系統に導入された T-DNA の挿入部分の塩基数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* 遺伝子は除草剤に対し耐性を有するタンパク質をコードしている。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

プラスミド PV-GMGOX20 の T-DNA 領域の外側には、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の 3" (9)-0-ヌクレオチジルトランスフェラー

ゼ(AAD)をコードする *aadA* 遺伝子を含んでいるが、宿主には導入されていないことが、サザンブロット分析により確認されている。

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

プラスミド PV-GMGOX20 の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナ TSF1 プロモーターに Figwort mosaic virus35S プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラの FMV/Tsf1 プロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

プラスミド PV-GMGOX20 の改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、エンドウのリブロー-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ由来の *E9* 遺伝子の非翻訳領域である。

(3) その他

プラスミド PV-GMGOX20 中に、ヒト及び家畜に有害であることが知られているタンパク質をコードする DNA 配列は存在しない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

アグロバクテリウム法によるダイズ MON89788 系統の作出に用いた DNA 導入用プラスミド PV-GMGOX20 は、最終的に、中間プラスミド A 及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む中間プラスミド C に由来する成分より構成されている。

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

ダイズ MON89788 系統は、プラスミド PV-GMGOX20 を用いて作出された。PV-GMGOX20 の塩基数は 9,664bp である。本プラスミドの塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(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

構築されたプラスミド PV-GMGOX20 には、改変 CP4 EPSPS タンパク質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

ダイズ MON89788 系統はプラスミド PV-GMGOX20 を用いて、アグロバクテリウム法により作出されたものである。改変 *cp4 epsps* 遺伝子のコード配列及び組換え体内でのこれらの遺伝子発現に必要な調節要素を含む挿入領域は、プラスミド PV-GMGOX20 上で明らかとなっている。

(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

プラスミド PV-GMGOX20 の各要素は明らかにされており、挿入領域に目的以外の遺伝子は含

まれていない。

・ダイズ MON89788 系統への挿入 DNA

| 改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット | |
|-----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| P-FMV/Tsf1 | プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） シロイヌナズナ <i>Tsf1</i> プロモーターに Figwort mosaic virus 35S プロモーターのエンハンサー配列(参考文献 13)を結合させたキメラプロモーター |
| L-Tsf1 | シロイヌナズナの翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsf1</i> 遺伝子の 5' 末端非翻訳リーダー配列(参考文献 14) |
| I-Tsf1 | シロイヌナズナの翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>Tsf1</i> 遺伝子のイントロン配列(参考文献 14) |
| CTP2 | シロイヌナズナ EPSPS の <i>shkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列(参考文献 15) |
| 改変 <i>cp4 epsps</i> | <i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株に由来する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(参考文献 16,17) |
| T-E9 | ターミネーター領域(遺伝子の転写を終結させるための配列) エンドウのリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ由来の <i>E9</i> 遺伝子のターミネーター領域(参考文献 18) |

6 DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主 A3244 への導入にはアグロバクテリウム法を用い、プラスミド PV-GMGOX20 の T-DNA 領域が宿主に導入された。

A3244 の未成熟胚を、PV-GMGOX20 をもつ *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) AB1 株と共に培養した後、抗生物質カルベニシリン、クラフォラン及び除草剤グリホサートを含む新しい培地に移し、グリホサートによって形質転換していない細胞を、カルベニシリン及びクラフォランにより *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) を除去した。

その後、胚組織を植物体まで再生し温室に移した後、植物体から改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現、グリホサートへの耐性及び導入遺伝子のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代を遺伝子解析及び形態特性調査の対象とした。

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

プラスミド PV-GMGOX20 を遺伝子導入して得られたダイズ MON89788 系統のゲノム中に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの挿入箇所数、コピー数、挿入遺伝子発現カセットの完全性及び外側骨格配列の有無を確認するために、サザンブロット分析及び PCR 分析を行った。

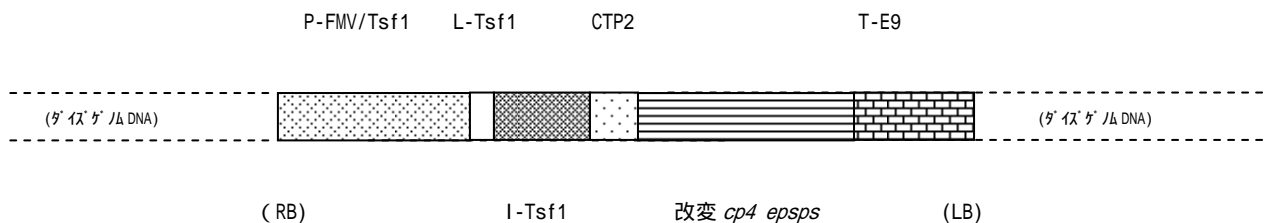
その結果、ダイズ MON89788 系統の染色体上の 1 箇所に 1 コピーの改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセットが完全な状態で導入されていることが確認された。また、プラスミド PV-GMGOX20 の外骨格領域 DNA は、検出されなかった。

3本のプライマーを用いてPCR分析により導入遺伝子及びその近傍配列を増幅した結果、ダイズ MON89788 系統からは予想されたバンドが増幅された。

増幅された DNA 断片を用いて DNA シークエンス解析を行った結果、ダイズ MON89788 系統への T-DNA 領域の挿入が確認され、T-DNA 領域の 5' 末端に隣接する 1,103bp 及び 3' 末端に隣接する 1,060bp がダイズゲノムに由来することが確認された。

ダイズ MON89788 系統のゲノム DNA と宿主のゲノム DNA 配列を比較した結果、遺伝子の挿入部位において宿主ゲノムの 40bp の欠損及び挿入 DNA の 5' 末端及び 3' 末端にそれぞれ宿主に存在しない 10bp 及び 6bp の配列の存在が確認された(参考文献 19)。

・組換えダイズ「ダイズ MON89788 系統」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

ダイズ MON89788 系統のゲノム DNA と宿主のゲノム DNA 配列を比較した結果、遺伝子の挿入部位において 40bp の欠損及び 5' 末端及び 3' 末端でそれぞれ宿主に存在しない 10bp 及び 6bp の存在が確認された(参考文献 19)ことから、フレームシフトを考慮に入れたアミノ酸相同性解析を行うことにより、この領域から目的以外の毒素やアレルゲンと相同性のあるタンパク質が生産されることはないことを確認した(参考文献 20)。

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

改変 CP4 EPSPS タンパク質の組換え体及び非組換え体中の発現量を測定した。

アルゼンチン(2004年~2005年)及び米国(2005年)で行った栽培試験において、それぞれ5箇所の圃場から採取した試料を供試し、ダイズ MON89788 系統並びに対照の非組換え体の葉、種子、根、地上部について、ELISA法によりタンパク質の発現量を測定した。

アルゼンチンの試験圃場から収穫されたダイズ MON89788 系統における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量は、葉(V3-V4期)で55 µg/g (FW)、葉(V6-V8期)で68 µg/g (FW)、葉(V9-V10期)で61 µg/g (FW)、葉(V11-V13期)で90 µg/g (FW)、種子で150 µg/g (FW)、根で32 µg/g (FW)、地上部で73 µg/g (FW)であった。

また、アメリカの試験圃場から収穫されたダイズ MON89788 系統における改変 CP4 EPSPS タンパク質の平均発現量は、葉(V3-V4期)で54 µg/g (FW)、葉(V6-V8期)で60 µg/g (FW)、葉(V9-V10期)で58 µg/g (FW)、葉(V11-V13期)で75 µg/g (FW)、種子で140 µg/g (FW)、根で22 µg/g (FW)、地上部で59 µg/g (FW)であった。

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

圃場試験で収穫されたダイズ MON89788 系統の種子における改変 CP4 EPSPS タンパク質の最大

発現量は、230 µg/g (FW)であった。

日本人一日一人当たりの「ダイズ・加工品」の摂取量 56.4g (参考文献 21) をすべてダイズ MON89788 系統に置き換えて計算すると、改変 CP4 EPSPS タンパク質の一日一人当たりの予想平均摂取量は最大で 12.97mg となる。

また、一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 71.5g (参考文献 21) に基づき、改変 CP4 EPSPS タンパク質が一日蛋白摂取量に占める割合を計算したところ、0.02%となる。

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

cp4 epsps 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. のヒトに対する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 タンパク質がアレルギー誘発性を持つという知見はこれまでのところ報告されていない。

(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

人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質を人工胃液中で処理し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロットティング法による分析を行った。

SDS ポリアクリルアミド電気泳動の結果では、試験開始後 15 秒以内で速やかに消化されることが示され、ウェスタンブロットティングでも検出限界未満となった(参考文献 22)。

なお、人工胃液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia) に記載されている方法に従って調製した。

人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質を人工腸液中で処理し、ウェスタンブロットティング法による分析を行った。その結果、人工腸液中では 100 分後には消失することが確認された(参考文献 23)。

加熱処理に対する感受性

改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現する MON89788 系統を 190 °C で 30 分間加熱処理することにより、改変 CP4 EPSPS タンパク質への影響をウェスタンブロットティングにより確認したところ、改変 CP4 EPSPS タンパク質の免疫反応性は検出限界未満であることが確認された(参考文献 24)。

(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 タンパク質について、アレルゲン等との構造相同性を確認するために、アレルゲンデータベース 5(AD5)に登録されているタンパク質を用いて、80 個の連続アミノ酸配列からなる“ウインドウ”を設定し、1 アミノ酸ずつずらしながら相同性を比較した結果、35%以上の相

同性は検出されなかった(参考文献 25)。比較は FASTA 型アルゴリズムを使用した(参考文献 26,27)。

また、改変 CP4 EPSPS タンパク質について、アミノ酸配列中に抗原決定基を示す可能性のある配列が含まれているかを確認するために、AD5 に登録されているアレルゲンを用いて、連続する 8 つのアミノ酸による相同性検索を行った結果、相同性は検出されなかった。比較は、ALLERGENSEARCH アルゴリズムを使用した。

(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

ダイズ MON89788 系統の挿入遺伝子の後代における安定性を確認するために、複数世代のゲノム DNA をプラスミド中導入 DNA 領域をカバーする 3 つのプローブを用いてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが確認された(参考文献 28)。

また、ウェスタンブロット分析によって、ダイズ MON89788 系統の改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現の安定性を調べた結果、複数世代において改変 CP4 EPSPS タンパク質の分子量と一致するバンドが検出された(参考文献 29)。

ダイズ MON89788 系統の R1 世代についてグリホサート耐性を指標として調査した結果、R1 世代で実測値と期待値の間にカイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかった。ホモ接合体として選択された後の世代(R2,R3)は、全てグリホサート耐性の形質を示した。

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

EPSPS タンパク質は、芳香族アミノ酸合成経路であるシキミ酸経路を触媒する。本代謝経路において重要とされている 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)からコリスミ酸が生成されるまでの段階は、中間代謝産物や最終生成物によって阻害されたり抑制されたりすることはほとんどないことが知られている(参考文献 30,31)。このことから、EPSPS タンパク質は本経路において律速酵素ではないことが示唆される。

また、EPSPS タンパク質は、ホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)と特異的に反応することが知られている(参考文献 32)。このほかに、唯一 EPSPS タンパク質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸のみであるが、EPSPS タンパク質とシキミ酸の反応性は、EPSPS タンパク質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 に過ぎないことから、シキミ酸が植物体内で EPSPS タンパク質と反応することはないと考えられる。

7 宿主との差異に関する事項

2005 年に米国の 5 圃場及び 2004 ~ 2005 年にアルゼンチンの 5 圃場で栽培されたダイズ MON89788 系統と非組換え体との間で、地上部及び種子について、主要構成成分、繊維、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類及び栄養阻害物質の分析、比較を行った。

米国の試験では、地上部の主要構成成分(灰分、脂質、水分、タンパク質、炭水化物)、繊維(酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維)、種子中の主要構成成分(灰分、脂質、水分、タンパク質、炭水化物)、繊維(酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維)、アミノ酸

18 種類、脂肪酸 22 種類、イソフラボン類(ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン)、栄養障害物質(ダイズレクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、トリプシンインヒビター)、ビタミン類(ビタミン E)を測定したところ、地上部の水分、種子のダイゼイン、グリシテイン及びビタミン E の分析成分においてダイズ MON89788 系統と非組換え体との間に統計学的な有意差が認められたが、これらの分析成分の平均値は、従来商業品種の分析値の範囲内であったことから、これらの統計学的な有意差は生物学的に有意な差ではないと考えられた(参考文献 33)。

アルゼンチンの試験では、地上部の主要構成成分(灰分、脂質、水分、タンパク質、炭水化物)、繊維(酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維)、種子中の主要構成成分(灰分、脂質、水分、タンパク質、炭水化物)、繊維(酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維)、アミノ酸 18 種類、脂肪酸 22 種類、イソフラボン類(ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン)、栄養障害物質(ダイズレクチン、フィチン酸、トリプシンインヒビター)を測定したところ、全ての分析成分において統計学的な有意差は認められなかった(参考文献 34)。

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2006年5月に安全性審査のための申請を行い、2007年1月に安全性審査を終了した。また、農務省(USDA)に2006年6月に無規制裁培(商業栽培)の申請をし、2007年7月23日に認可された。

カナダ保健省(Health Canada)及びカナダ食品検査庁(CFIA)に2006年6月に食品、環境・飼料についての安全性審査の申請を行い、カナダ保健省からは2007年6月27日に、カナダ食品検査庁からは2007年7月3日に認可された。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)に2006年10月に食品としての安全性審査の申請を行っている。

9 栽培方法に関する事項

ダイズ MON89788 系統の栽培方法については、従来のダイズ品種と同じである。

10 種子の製法及び管理方法に関する事項

ダイズ MON89788 系統の種子の製法及び管理方法については、従来のダイズ品種と同じである。

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までの事項により安全性の知見は得られており、次に示された試験は必要ないと判断される。なお、申請者からは急性毒性試験のデータが提出されていたことから、このデータを念のために確認した。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験
4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験

7. その他必要な試験（腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等）

1. 急性毒性に関する試験

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質を用いてマウスの急性毒性試験が行われている。最大投与量(572mg/kg 体重)でもマウスに有害な影響は認められなかった。この投与量は、ヒト(体重 53.3kg)がダイズ MON89788 系統から 1 日に摂取すると予想されるタンパク質量(12.97mg)の 2,350 倍に相当する(参考文献 35,36)。

食品健康影響評価結果

遺伝子組換えダイズ「除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 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」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された。

参考文献

1. 大豆関連データファイル. 農林水産省 HP より
2. Liener IE. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutr.* (1994) 34:31-67.
3. ILSI Soybean Database. 2004. International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 2.0. Search criteria soybean seed, all locations, all years, all proximates, amino acids, fatty acids, bio-actives, fiber, dry weight other than moisture. <http://www.cropcomposition.org> [Accessed: January 18, 2006].
4. Hymowitz T. Speciation and cytogenetics. In Soybeans: Improvement, Production and Uses, Third Edition. Agronomy Monograph 16. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin. (2004):97-136.
5. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 1995. Report of the FAO Technical consultation on food allergies, food and agriculture organization of the United Nations. 13-14 November, FAO, Rome.
6. Cordle CT. Soy protein allergy: Incidence and relative severity. *J. Nutr.* (2004) 134: 1213S-1219S.
7. 厚生労働科学研究費補助金食品中に含まれるアレルギー物質の検査法開発に関する研究、平成 18 年度総括・分担研究報告書
8. Internet Symposium on Food Allergens. 2002. <http://www.food-allergens.de/> [accessed: November 28, 2006].
9. 農文協. 日本の野生植物 II 日本原色雑草図鑑. 平凡社. (1997).
10. 浅野貞夫. 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協.(1995).
11. Fling M, Kopf J, Richards C. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3' (9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* (1985) 13:7095-7106.
12. Sutcliffe JG. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Symposia on Quantitative Biology.* (1978)43:77-103.

13. Richins R, Scholthof H, Shepard R. Sequence of figwort mosaic virus DNA (Caulimovirus Group). *Nucleic Acids Res.* (1987)15:8451-8466.
14. Axelos M, Bardet C, Liboz T, Le Van Thai A, Curie C, Lescure B. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : molecular cloning, characterization and expression. *Mol. Gen. Genet.* (1989)291:106-112.
15. Klee HJ, Muskopf YM, Gasser CS. Cloning of an *Arabidopsis* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* (1987)210:437-442.
16. Padgett SR, Re DB, Barry GF, Eichholtz DE, Delannay FX, Fuchs RL, Kishore GM, Fraley RT. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. *In* Herbicide-resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. S. O. Duke (ed.). *CRC Press, New York.* (1996)53-84.
17. Barry GF, Kishore GM, Padgett SR, Stallings WC. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. *United State Patent* (1997) 5,633,435.
18. Coruzzi G, Broglie R, Edwards C, 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)3:1671-1679.
19. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統の挿入遺伝子部位を同定するための PCR と DNA シークエンシングによる従来品種のゲノム解析:MSL-20320(2006) (社内報告書).
20. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統の導入遺伝子の 5' 末端及び 3' 末端近傍配列のバイオインファマティクス:MSL-20344(2006) (社内報告書).
21. 健康・栄養情報研究会 編 平成 15 年国民健康・栄養調査報告. 第一出版(2006).
22. 改変 CP4 EPSPS タンパク質の人工胃液中での消化性実験:MSL-17566(2002) (社内報告書).
23. 改変 CP4 EPSPS タンパク質の人工腸液中での消化性実験:MSL-12949(1993) (社内報告書).
24. 改変 CP4 EPSPS タンパク質の熱安定性試験:MSL-20335(2006) (社内報告書).
25. 改変 CP4 EPSPS タンパク質が既知アレルゲンと構造相同性を持たないことの証明:MSL-19894(2005) (社内報告書).
26. Lipman DJ, Pearson WR. Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* (1985)227:1435-1441.
27. Pearson WR, Lipman DJ. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1988)85:2440-2448.
28. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統の分子分析:MSL-20160(2006) (社内報告書).
29. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統の発現タンパク質の世代間にわたる安定性の確認:MSL-20284(2006) (社内報告書).
30. Herrmann KM. *Amino Acids : Biosynthesis and Genetic Regulation* (Herrmann, K.M. and Somerville, R. L., Eds.) Addison-Wesley, Reading, MA. (1983):301-322.
31. Weiss U, Edwards JM. Regulation of the Shikimate Pathway. *In* The Biosynthesis of Aromatic Compounds. John Wiley and Sons, New York. (1980):287-301.
32. Gruys KJ, Walker MC, Sikorski JA. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *E. coli*. *Biochem.* (1992)31:5534-5544.

33. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統における構成成分の分析(米国):MSL-20300(2006)(社内報告書).
34. 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統における構成成分の分析(アルゼンチン):MSL-20375(2006)(社内報告書).
35. Harrison L, Bailey M, Naylor M, Ream J, Hammond B, Nida D, Burnette B, Nickson T, Mitsky T, Taylor M, Fuchs R, Padgett S. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. Strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J.Nutr.*(1996)126:728-740.
36. マウスにおける改変 CP4 EPSPS タンパク質の急性毒性試験:MSL-13077(1993)(社内報告書).