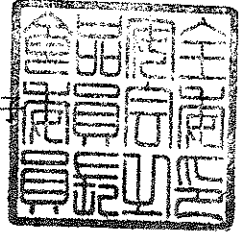




府食第1004号
平成21年10月22日

厚生労働大臣
長妻 昭 殿

食品安全委員会
委員長 小泉 直子



食品健康影響評価の結果の通知について

平成21年1月9日付け厚生労働省発食安第0109001号をもって貴省から当委員会に意見を求められた食品「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 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

「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統

2009年10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.....	7
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	7
6. 安全な摂取に関する事項.....	7
7. 近縁の植物種に関する事項.....	7
第4. ベクターに関する事項.....	7
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	8
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	9
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	11
第6. 組換え体に関する事項.....	11
1. 遺伝子導入に関する事項.....	11
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事	

項.....	13
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	13
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	14
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.....	14
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.....	17
<参照>.....	17

<審議の経緯>

2009年1月9日	厚生労働大臣より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（厚生労働省食安発第0109001号）、関係書類の接受
2009年1月15日	第269回食品安全委員会（要請事項説明）
2009年1月27日	第67回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年6月19日	第71回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年9月17日	第302回食品安全委員会（報告）
2009年9月17日より10月16日	国民からの御意見・情報の募集
2009年10月20日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2009年10月22日	第306回食品安全委員会 （同日付け厚生労働大臣に報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2009年6月30日まで

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

2009年7月1日から

小泉直子（委員長）
見上 彪（委員長代理*）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
村田容常

*：2009年7月9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名簿>

2009年9月30日まで

澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）
五十君静信 丹生谷博
石見佳子 飯 哲夫
宇理須厚雄 山川 隆
小関良宏 山崎 壮
橘田和美 和久井信
澁谷直人 渡邊雄一郎
手島玲子

2009年10月1日から

澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）
五十君静信 澁谷直人
石見佳子 手島玲子
海老澤元宏 中島春紫
小関良宏 飯 哲夫
橘田和美 山崎 壮
児玉浩明 和久井信

要 約

「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を行った。

「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」は、トウモロコシ (*Zea mays* L.) に由来する改変 *epsps* 遺伝子 (*2mepsps* 遺伝子) を導入して作製されており、除草剤グリホサート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）に基づき評価した結果、「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」はヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名 称：除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統

性 質：除草剤グリホサート耐性

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（ドイツ）

「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」（以下「ワタ GHB614」という。）は、トウモロコシ（*Zea mays* L.）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（*epsps* 遺伝子）を改変した遺伝子（*2mepsps* 遺伝子）を導入して作製されており、改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS タンパク質）を発現することで、除草剤グリホサートを散布しても、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、アオイ科（*Malvaceae*）ワタ連（*Gossypieae*）ワタ属（*Gossypium*）に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 Coker312 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

ワタ GHB614 に挿入された *2mepsps* 遺伝子は、トウモロコシ（*Z. mays* L.）に由来する *epsps* 遺伝子を改変したものである。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

ワタ GHB614 に挿入された *2mepsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する 2mEPSPS タンパク質を発現する。挿入 DNA は、発現ベクター pTEM2 を用いてアグロバクテリウム法により宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

ワタは古くから綿実油として食用に用いられてきた経験がある。綿実油は主にクッキングオイル、ショートニング及びサラダドレッシングの原料として用いられるほか、クラッカー、クッキー及びチップ等のスナック食品の原材料としても広く用いられている（参照 1）。また、綿実の殻に含まれるヘミセルロースは、キシロースやキシリトールの原料として利用されている。さらに綿実のリンター（地毛）を原材料として製造されたセルロースは、食品や医薬品に使用される。

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

ワタの綿実の主要栄養組成は、水分 6.9～10.6%、粗脂肪 13.8～23.1%、粗タンパク質 20.7～25.8%、灰分 3.34～4.80%、炭水化物 33.70～55.36%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

ワタには、テルペン類化合物であるゴシポールやステルクリン酸、マルバリニン酸等のシクロプロペン脂肪酸が含まれる。

ゴシポールには、結合型と遊離型があり、前者は体内に吸収されることなく排泄され無害と考えられているが、後者は有害性が示されており、綿実中に約 0.68%含まれると報告されている（参照 3）。しかし、遊離ゴシポールは、脱ガム、脱酸、脱色等の各工程で除去される（参照 4）。また、綿実油に 1%程度まで含まれるシクロプロペン脂肪酸は、製油工程を経た後では著しく減少する（参照 4、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

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

ワタ GHB614 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来ワタと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ワタ GHB614 の可食部位は、従来ワタと変わらない。

(3) 摂取量

ワタ GHB614 の摂取量は、従来ワタと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ワタ GHB614 の調理及び加工方法は、従来ワタと変わらない。

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

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

ワタ GHB614 は、*2mepsps* 遺伝子発現カセットの導入により、*2mEPSPS* タンパク質を発現することが、宿主との相違点である。

以上、1～6により、ワタ GHB614 の安全性評価においては、既存ワタ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

ワタ GHB614 は、ゲノムに導入された *2mepsps* 遺伝子が 2mEPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートを散布しても、その影響を受けずに生育することができるかとされている。

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、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ (*G. hirsutum* L.) の商業品種 Coker312 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

栽培ワタの起源について完全には明らかにされてはいないが、新・旧大陸の各地で別々に作物化されたと考えられている。ワタ属の 46 種のうち 4 種 (*G. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum* 及び *G. barbadense*) が一般的に栽培されている（参照 6）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタには、テルペン類化合物であるゴシポールやステルクリン酸、マルバリニン酸等のシクロプロペン脂肪酸が含まれるが、綿実油の製造工程で除去されるか、著しく減少する（参照 4,5）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ワタが原因となる明確な食物アレルギーに関する報告はない。

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

ワタには、細菌及びウイルスの各種病害が知られているが（参照 7）、これらがヒトに対して病原性を持つという報告はない。

6. 安全な摂取に関する事項

ワタは古くから綿実油として食用に用いられてきた経験がある。綿実油は主にクッキングオイル、ショートニング及びサラダドレッシングの原料として用いられる他、クラッカー、クッキー及びチップ等のスナック食品の原材料としても広く用いられている（参照 1）。また、綿実の殻に含まれるヘミセルロースは、キシロースやキシリトールの原料として利用されている。さらに綿実のリンター（地毛）を原材料として製造されたセルロースは、食品や医薬品に使用される。

7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ連のワタ属の近縁種には 8 つの属があり、ワタ連にはゴシポール腺があることから、有毒物質ゴシポールが含まれている（参照 8）。

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 GHB614 の作出に使用した発現ベクターpTEM2 の構築には、プラスミド pTYG50 を用いた。

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

プラスミド pTYG50 の全塩基数は 8,026bp あり、その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

プラスミド pTYG50 の制限酵素による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

プラスミド pTYG50 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 pTYG50 には、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに対して耐性を付与する *aadA* 遺伝子並びにカナマイシンやネオマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質に対して耐性を付与する *npt I* 遺伝子の断片が含まれている。なお、*aadA* 遺伝子及び *npt I* 遺伝子の断片は、宿主ゲノムには挿入されない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pTYG50 には伝達性因子は含まれていない。

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

2mepsps 遺伝子の供与体は、トウモロコシ (*Z. mays* L.) である。

(2) 安全性に関する事項

2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays* L.) は、病原性や毒素産生性に関する報告はなく、長期にわたり食品として安全に摂取されている。

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

2mepsps 遺伝子は、*epsps* 遺伝子に部位特異的に突然変異を起こし、*epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列の 102 番目のトレオニンがイソロイシンに、

106 番目のプロリンをセリンに変化させたものである（参照 9）。挿入 DNA の構成要素は表のとおりである。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

ワタ GHB614 に導入された挿入 DNA の塩基数及び塩基配列は明らかであり、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

2mepsps 遺伝子は、2mEPSPS タンパク質を発現し、この 2mEPSPS タンパク質によって、EPSPS 活性を阻害する除草剤グリホサートの存在下でも、EPSPS 活性を示すことができる。その結果、除草剤グリホサートに対する耐性を有することとなる。

2mEPSPS タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性について確認するために、データベース (Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PDB^a、DAD^b及び GenPept) を用いて blastp 検索を行ったところ、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 10）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

発現ベクター pTEM2 の T-DNA 領域の外骨格領域には、抗生物質耐性マーカー遺伝子として *aadA* 遺伝子及び *nptI* 遺伝子の断片が含まれているが、ワタ GHB614 には挿入されていないことが確認されている（参照 11）。

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

2mepsps 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*Arabidopsis thaliana* のヒストン H4 遺伝子の Ph4a748At プロモーターである（参照 12）。

(2) ターミネーターに関する事項

2mepsps 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*A. thaliana* のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻訳領域の配列 (3' histonAt) である（参照 12）。

(3) その他

2mepsps 遺伝子発現カセットには、2mEPSPS タンパク質の発現を高めるために *A. thaliana* 由来のヒストン H3.3 遺伝子の第 II 遺伝子の第 1 イントロン（参照 13）が挿入されている。また、2mEPSPS タンパク質が色素体に移行できるようにするために、ヒマワリ (*H. annuus*) 及びトウモロコシ (*Z. mays*) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子の N 末端にある色素体輸送ペプチド配列を元に作製された TPotp C（参照 14）が挿入されている。

^a Protein Data Base

^b DDBJ Amino acid sequence Database

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pTYG50 の T-DNA 領域に、2mEPSPS 遺伝子発現カセットを挿入し、発現ベクター pTEM2 を作製した。

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

発現ベクター pTEM2 の塩基数は、11,953bp であり、その塩基配列及び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

ワタ GHB614 系統において、*2mepsps* 遺伝子、5'末端側境界領域及び3'末端側境界領域の各相補的 RNA をプローブとしてノーザンブロット分析を行った結果、発現ベクター pTEM2 の T-DNA 領域に、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) は含まれていないことが確認された (参照 15)。

(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

発現ベクター pTEM2 の右側境界 (RB) から左側境界 (LB) までの T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により宿主に導入した。

(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

発現ベクター pTEM2 の T-DNA 領域内の各要素はすべて純化されており、目的外の遺伝子の混入はない。

表 ワタ GHB614 への挿入 DNA

<i>2mepsps</i> 遺伝子発現カセット	
Ph4a748At プロモーター	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) <i>A. thaliana</i> のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域
intron1 h3At	(遺伝子の発現を高める配列) <i>A. thaliana</i> 由来のヒストン H3.3 遺伝子の第 II 遺伝子の第 1 イントロン
TPotp C	ヒマワリ (<i>H. annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子の N-末端にある色素体輸送ペプチド配列を元に作製された配列
<i>2mepsps</i>	トウモロコシ (<i>Z. mays</i> L.) 由来の 2mEPSPS タンパク質をコードする遺伝子

3' histonAt ターミネーター	ターミネーター領域 (遺伝子の発現を終結させるための配列) <i>A. thaliana</i> 由来のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻訳領域
---------------------	---

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

発現ベクターpTEM2 を用いてアグロバクテリウム法により *2mepsps* 遺伝子発現カセットを宿主ワタに導入した後、再生個体を得た。得られた再生個体は、グリホサートを含む培地で選抜し、更に圃場における選抜を行い、ワタ GHB614 を得た。

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

挿入遺伝子のコピー数及び完全性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、発現ベクターの *2mepsps* 遺伝子発現カセットが完全な形で1コピー導入されていることが確認された (参照 16)。また、ワタ GHB614 の挿入 DNA の全塩基配列を解析した結果、発現ベクターの T-DNA 領域の右側領域 21bp 及び左側領域 29bp を欠損していたが、*2mepsps* 遺伝子発現カセットは完全であることが確認された (参照 17)。

発現ベクターの外骨格領域が導入されていないことを確認するために、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は導入されていないことが確認された (参照 11)。

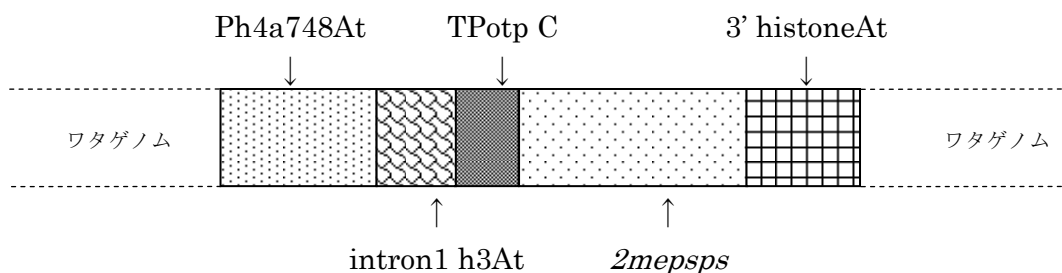
挿入 DNA の近傍配列を確認するために、5'末端近傍配列 (1,139bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,327bp) の塩基配列を決定し、宿主における挿入部位の塩基配列と比較したところ、挿入時に欠損した配列 (17bp) を除き、宿主ゲノムと一致していることが確認された (参照 17)。

遺伝子挿入によって既知の機能を有するワタ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、ワタ GHB614 の遺伝子挿入前の配列 (5'末端近傍配列 (1,139bp)、挿入時に欠損した配列 (17bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,327bp)) について、GetORF (EMBOSS : European Molecular Biology Open Software Site) を用いて、6つの読み枠において連続する 8 アミノ酸以上で ORF 検索を行った。その結果、5'末端近傍領域及び挿入部位を跨ぐ領域に ORF が各 1 個見いだされた (参照 18)。2 個の ORF について、タンパク質データベース (DAD、GenPept、PDB 及び UniProt) を用いた blastx による相同性検索、FGENESH を用いた遺伝子構造予測、TSSP を用いたプロモーター領域の予測、ScanProsite 及び InterProScan を用いたドメイン検索を行ったところ、これらの検索結果からは、遺伝子挿入によって既知の機能を有するワタの内在性遺伝子が損なわれている可能性は低いと考えられた (参照 18)。さらに、5'末端近傍領域で見いだされた ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性について検索を行った結果、相同性は見いだされなかった (参照 19)。

また、ワタ GHB614 の主要構成成分について、非組換えワタとの相違は認められず（参照 20）、農業形質についても、除草剤グリホサート耐性の形質を除き、非組換え体との相違は見られなかった（参照 21）。

以上のことから、遺伝子挿入によって既知の機能を有するワタの内在性遺伝子は損なわれていないと考えられる。

・組換えワタ「ワタ GHB614」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

挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (1,139bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,327bp) との接合部において意図しない ORF が生じていないことを確認するために、GetORF を用いて、6つの読み枠において連続する 3 アミノ酸以上で終止コドンから終止コドンで終結する ORF について分析した。その結果、14 個の ORF が検出された（参照 22）。

これらの ORF からの発現の可能性を調べるため、挿入遺伝子と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列の接合部（センス及びアンチセンス方向）について、RNA プローブを作製し、ノーザンブロット分析を行った。その結果、mRNA の発現は認められなかったことから、これらの ORF からタンパク質が発現する可能性は低いと考えられた（参照 15）。

14 個の ORF がコードするアミノ酸配列と既知の毒性タンパク質との相同性について、データベース（Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PDB、GenPept）を対象に、blastp による検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照 23）。

また、14 個の ORF がコードするアミノ酸配列と既知のアレルゲンとの相同性について、前述のデータベースを対象に、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性の有無について検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった。また、FindPatterns (GCG: Genetic Computer Group) を用いて、Allergen database (release 3.3, 2007) を対象に、8つの連続アミノ酸について検索を行った結果、相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった（参照 23）。

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 GHB614 から葉、茎、根、未開花蕾、生長点、花粉及び穀実における 2mEPSPS タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析した（参照 24）。

その結果、2mEPSPS タンパク質の平均発現量は、葉では 11.16 µg/g（2～3 葉期）、7.94 µg/g（4～6 葉期）、6.52µg/g（前開花期）及び 0.45 µg/g（開花期）、茎では 1.94 µg/g（4～6 葉期）及び 1.58µg/g（開花期）、根では 0.99 µg/g（4～6 葉期）及び 4.04 µg/g（開花期）、未開花蕾、生長点及び花粉ではそれぞれ、5.35 µg/g、5.47 µg/g、0.16 µg/g であった。また、穀実では 36.3 µg/g 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

ワタは、主に植物油（綿実油）として食用に供される。ワタ GHB614 を用いて製造した綿実油の 2mEPSPS タンパク質含有量を ELISA 法を用いて分析した結果、検出されなかった（検出限界値 84.9ng/g）。

2mEPSPS タンパク質含有量を検出限界値である 84.9ng/g とし、平成 18 年度の国民健康・栄養調査の結果に基づく日本人 1 人 1 日当たりの平均油脂類摂取量 10.2g（参照 25）のすべてをワタ GHB614 を用いて製造した綿実油で摂取したと仮定した場合、2mEPSPS タンパク質の 1 人 1 日当たりの予想摂取量は 0.87µg と試算され、日本人 1 人が 1 日に摂取する平均タンパク質摂取量 69.8g（参照 25）に対する割合は 1.25×10^{-8} である。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めないと判断される。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays* L.) は、一般的なアレルギー誘発性食品とは考えられていない（参照 26）。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

2mEPSPS タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

Escherichia coli で発現させた 2mEPSPS タンパク質の人工胃液中での消化性を SDS-PAGE 法により分析を行った結果、試験開始後 0.5 分以内に消化された（参照 27）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた 2mEPSPS タンパク質の人工腸液中での消化性をウェスタンブロット法により分析を行った結果、試験開始後 0.5 分以内に消化された（参照 28）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた 2mEPSPS タンパク質について、加熱による酵素活性の変化を測定したところ、60℃、10 分間の加熱処理で完全に失活することが確認された (参照 29)。また、SDS-PAGE 法による分析を行った結果、90℃、60 分間の加熱処理で凝集が生じる可能性が高いことが確認された (参照 30)。

(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

2mEPSPS タンパク質のアミノ酸配列について、既知のアレルゲンとの構造相同性を確認するために、タンパク質データベース (Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PIR^c、NRL_3D、DAD、GenPept) を用いて相同性検索を行った。その結果、80 残基以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を有するアミノ酸配列において、アレルギー性が報告されているタンパク質は認められなかった (参照 31)。

また、アミノ酸配列中の抗原決定基の存在の可能性を確認するために、タンパク質データベース (Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PIR、DAD、GenPept) を用いて、既知のアレルゲンと連続する 8 つのアミノ酸の相同性検索を行った結果、一致するものは見いだされなかった (参照 32)。

上記、(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、2mEPSPS 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

ワタ GHB614 について、後代における遺伝子の安定性を確認するために、7 世代のゲノム DNA についてサザンブロット分析を行った結果、各世代において共通のバンドが確認された (参照 33, 34)。

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

2mEPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路において、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生成する反応を触媒する EPSPS タンパク質のアミノ酸配列を改変したタンパク質である。除草剤グリホサートは EPSPS に結合するため、EPSP の生成反応を阻害するが (参照 35)、2mEPSPS タンパク質は、除草剤グリホサートによる阻害作用を受けずに EPSP を生成する。

2mEPSPS タンパク質における PEP 及び S3P に対する *K_m* 値 (ミカエリス定数) は、EPSPS タンパク質とほぼ同等であったことから、両者は同じ基質特異性を有していると考えられた (参照 29)。なお、EPSPS タンパク質は PEP 及び S3P 以外に S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、反応性は低いことから、EPSPS タンパク質は高い基質特異性を有していると考え

^c Protein Identification Resources

えられている（参照 36）。

また、シキミ酸合成経路において最終段階の合成反応に関与する EPSPS タンパク質は、中間代謝産物や最終生成物により負の制御を受けている可能性が低く、本経路の律速には関与していないものと考えられており（参照 37、38、39、40、41、42）、通常の 40 倍の EPSPS タンパク質を生成する植物培養細胞においても、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている（参照 43）。

なお、ワタ GHB614 系統の芳香族アミノ酸の量は非組換えワタと同等であることが確認されている（参照 20）。以上のことから、2mEPSPS タンパク質は既存の EPSPS タンパク質と同等の極めて高い基質特異性を有していると考えられること、また、2mEPSPS タンパク質はシキミ酸合成経路の律速酵素ではなく、本経路の最終生成物である芳香族化合物の生成量に影響を及ぼす可能性は低いと考えられることから、2mEPSPS タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

2005 年に 9 箇所、2006 年に 8 箇所の米国の圃場で栽培されたワタ GHB614 と非組換えワタの綿実について、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 E 及び有害生理活性物質の分析を行い、圃場毎にワタ GHB614 と非組換えワタの間の統計学的有意差について検討し、全体で有意差が過半数を占めるかどうかでワタ GHB614 と非組換えワタとの間の同等性について検討を行った（参照 20）。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（水分、粗タンパク質、総脂肪、灰分、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、炭水化物）について分析した結果、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認され、いずれも文献値の範囲内であった。

(2) アミノ酸組成

アミノ酸 18 種類について分析した結果、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認され、いずれも文献値の範囲内であった。

(3) 脂肪酸組成

脂肪酸 11 種類について分析した結果、5 種類の脂肪酸については、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認された。他の 6 種類の脂肪酸（ステアリン酸、パルミトオレイン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸）については、非組換えワタの分析結果に基づく文献値の範囲内であった。

(4) ミネラル類

主要なミネラル 6 種類について分析したところ、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認され、いずれも文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン E

α -、 β -、 γ -、 δ -及び総トコフェロール（ビタミン E）について分析したところ、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認され、いずれも文献値の範囲内であった。

(6) 有害生理活性物質

ワタの有害生理活性物質として知られているゴシポール（総ゴシポール及び遊離ゴシポール）及びシクロプロペン脂肪酸（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）について分析したところ、ゴシポールについては、対照に用いた非組換えワタとの間で同等性が確認された。シクロプロペノイド脂肪酸については、非組換えワタの分析結果に基づく文献値の範囲内又は文献値を下回っていた。

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、2008年9月に食品医薬品庁（FDA）から食品としての安全性に問題がないことが確認された。また、2006年11月に農務省（USDA）へ無規制裁培の承認申請（栽培承認）を行った。

カナダにおいては、2008年3月に食品としての安全性に係る承認を得た。

その他、オーストラリア及びニュージーランド、EUに対して安全性に係る承認申請を行っている。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ GHB614 の栽培方法については、従来ワタと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ GHB614 の種子の製法及び管理方法については、従来ワタと同じである。

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は得られているが、申請者から2mEPSPS タンパク質の急性毒性試験のデータが提出されたことから、念のため確認した（参照 44）。

OF1 系統の雌マウス（7週齢、1群各5匹）に、*E. coli* で発現させた 2mEPSPS タンパク質（純度 99%）を 2000 mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。投与後 15 日間、臨床的観察（体重測定、食餌量、攻撃的行動変化、病的徴候、死亡数）を行い、15 日後にマウスを剖検し、主要な器官・組織の肉眼的観察を行った。その結果、全例とも試験終了まで生存し、臨床検査、剖検において被検物質の投与に起因する異常は認められなかった。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日 食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと判断した。

<参照>

1. NCCA. National Cotton Council of America. Cotton: from field to fabric. Educational Materials. 1999.
2. OECD. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. ENV/JM/FOOD(2004)16. 2004.
3. Cotton Incorporated, Agricultural Research, Cottonseed Marketing 2000 Digital Edition, www.cottoninc.com. Cotton Incorporated, Cary, NC27513. 2000. (Whole cottonseed: a super feed for dairy cows)
4. 新谷 勲. 食品油脂の科学, 幸書房, 1989.
5. Gunstone F.D., Harwood J.L. and Padley F.B. In The Lipid Handbook, 2nd Edition (Chapman & al., eds.) London University Press, Cambridge. 1994; 13-14, 47-146.
6. OECD. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* Spp). Working group on harmonization of regulatory oversight in biotechnology. ENV/JM/BIO(2002)4/REV3. 2003.
7. Munro J.M. Cotton, Chapter 13: Disease. Jhon Wiley and Sons Inc., eds. 1987; 211-230.
8. Fryxell P.A. A redefinition of the tribe Gossyipeae. Bot.Gaz. 1968; 129: 296-308.
9. Mutated 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene. (社内報告書)
10. 2mEPSPS protein Amino acid sequence homology search with known toxins. (社内報告書)
11. Confirmation of the absence / presense of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. (社内報告書)
12. Chaboute M., Chaubet N., Philipps G., Ehling M. and Gigot C. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol.Biol. 1987; 8: 179-191.
13. Chaubet N., Clement B. and Gigot C. Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. J.Mol. Biol. 1992; 225: 569-574.
14. Lebrun M., Leroux B. and Sailland A. Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471. 1996.
15. Expression of the *2mepsps* RNA and of potential cryptic RNAs in the

- glyphosate tolerant cotton event GHB614. (社内報告書)
16. Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. (社内報告書)
 17. Determination of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614 up to 1kb (社内報告書)
 18. Bioinformatics analysis of the pre-insertion locus of *GlyTol* cotton transformation event GHB614 (社内報告書)
 19. Putative open reading frame (ORF)-2 sequence from the GHB614 pre-insertion locus: amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins (社内報告書)
 20. Nutritional Impact Assessment Report on Glyphosate Tolerant Cotton Transformation Event GHB614. (社内報告書)
 21. 除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統の生物多様性影響評価書の概要 http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/GHB614ap.pdf
 22. Bioinformatics analysis of newly created ORFs between stop codons from *GlyTol* cotton transformation event GHB614. (社内報告書)
 23. *GlyTol* Cotton Elite Event GHB614 : *In silico* analysis of additional putative Open Reading Frame (ORF) sequences for identifying potential homologies to known toxins and allergens. (社内報告書)
 24. 2mepsps protein contents in leaf, stem, root, square, apex and pollen tissue during the life cycle of the glyphosate tolerant cotton event GHB614. (社内報告書)
 25. 平成 18 年 国民健康・栄養調査結果の概要. 厚生労働省, 健康局総務課生活習慣病対策室 <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2.html>
 26. OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea Mays*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. 2002.
 27. 2mEPSPS proteins, *In vitro* digestibility study in simulated gastric fluid. (社内報告書)
 28. 2mEPSPS proteins, *In vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid. (社内報告書)
 29. The double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene product : 2mEPSPS, Description and Characterization. (社内報告書)
 30. 2mEPSPS protein, Heat stability study. (社内報告書)
 31. Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens. (社内報告書)
 32. 2mEPSPS protein, epitope homology and N-glycosylation searches. (社内報告書)
 33. Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614. (社内報告書)

34. Demonstration of the structural stability of cotton event GHB614 (additional generations) (社内報告書)
35. Boocock M.R. and Coggins J.R. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Letters 1983; 154: 127-133.
36. Gruys, K.J., Walker, M.C. and Sikorski, J.A. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. Biochemistry. 1992; 31: 5534-5544.
37. Weiss U. and Edwards J.M. The biosynthesis of aromatic compounds: Regulation of the shikimate pathway. Chapter15, pp287-301. A Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons, NY. 1980.
38. Herrmann K.M. and Somerville R.L. Amino acids, Biosynthesis and genetic regulation The common aromatic biosynthetic pathway Chapter17, 1983; 301-322. Addison-Wesley publishing Company, MA.
39. Herrmann K.M. The shikimate pathway: Early step in the biosynthesis of aromatic compounds. 1995; The Plant Cell 7: 907-919.
40. Herrmann K.M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. 1995; Plant Physiol. 107: 7-12.
41. Heldt H.W. 植物生化学 シュプリンガー・フェアラー東京, 2000; 242-244.
42. Buchanan B.B. 植物の生化学・分子生物学, 学会出版センター, 2005; 342-358.
43. Smart C.C., Johanning D., Muller G., Amrhein N. Selective overproduction of 5-enol-puruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. J.Biol.Chem. 1985; 260: 16338-16346.
44. 2mEPSPS protein, acute toxicity by oral gavage in mice. (社内報告書)