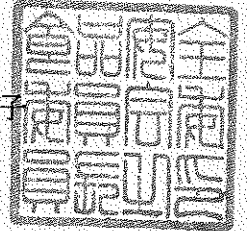




府食第119号
平成23年2月10日

厚生労働大臣
細川 律夫 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22年6月8日付け厚生労働省発食安0608第1号をもって貴省から当委員会に意見を求められた食品「チョウ目害虫抵抗性ダイズMON87701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

「チョウ目害虫抵抗性ダイズMON87701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

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統

2011年2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.....	7
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.....	7
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.....	12
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.....	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.....	17
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	17
<参照>.....	18

<審議の経緯>

2010年6月8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(厚生労働省発食安0608第1号)、関係書類の接受
2010年6月10日	第335回食品安全委員会(要請事項説明)
2010年6月23日	第82回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年11月16日	第86回遺伝子組換え食品等専門調査会
2010年11月25日	第357回食品安全委員会(報告)
2010年11月25日から12月24日	国民からの御意見・情報の募集
2011年2月8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
2011年2月10日	第366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>

2011年1月6日まで	2011年1月7日から
小泉直子(委員長)	小泉直子(委員長)
見上 彪(委員長代理)	熊谷 進(委員長代理*)
長尾 拓	長尾 拓
野村一正	野村一正
畑江敬子	畑江敬子
廣瀬雅雄	廣瀬雅雄
村田容常	村田容常

* : 2011年1月13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>

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

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 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。

本系統は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現することで、チョウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統の作出過程において、選択マーカーとして利用するために、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入したが、交配による遺伝的分離を利用して本遺伝子をもたない個体が選抜されている。

「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の比較等について確認した結果、非組換えダイズ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、「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 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：チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統

性質：チョウ目害虫抵抗性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統」（以下「ダイズ MON87701」という。）は、*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現することで、チョウ目害虫による影響を受けずに生育できるとされている。なお、ダイズ MON87701 の作出過程において、選択マーカーとして利用するために、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入したが、交配による遺伝的分離を利用して本遺伝子をもたない個体が選抜されている。

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、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の商業品種 A5547 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* である。また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は *Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cry1Ac* 遺伝子は、チョウ目害虫抵抗性を付与する改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられ、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現する。

改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子をアグロバクテリウム法によって宿主ゲノムに導入した。なお、交配による遺伝的分離を利用して改変 *cp4 epsps* 遺伝子をもたない個体を選抜したため、ダイズ MON87701 は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を有していない。

2. 宿主の食経験に関する事項

ダイズの起源は中国であると言われている。日本には弥生時代に伝来、栽培が始まったと考えられており、古くから食品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

ダイズ種子の主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 33.19～45.48%、総脂質 8.10～23.56%、灰分 3.89～6.99%、炭水化物 29.6～50.2%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

ダイズ種子の有害生理活性物質組成（対乾燥重量）は、トリプシンインヒビター19.59～118.68 TIU^a/mg、レクチン 0.11～9.04 HU^b/mg、ダイゼイン 60.0～2453.5mg/kg、ゲニステイン 144.3～2837.2 mg/kg、グリシテイン 15.3～310.4 mg/kg、スタキオース 1.21～3.50%、ラフィノース 0.21～0.84%、フィチン酸 0.41～1.96%である（参照 1, 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

ダイズ MON87701 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 MON87701 の摂取部位は、従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量

ダイズ MON87701 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 MON87701 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 MON87701 は、改変 *cry1Ac* 遺伝子の導入によって、改変 Cry1Ac 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、ダイズ MON87701 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した。

^a TIU : trypsin inhibitor unit

^b HU : hemagglutinating unit

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 MON87701 は、改変 *cry1Ac* 遺伝子が改変 Cry1Ac タンパク質を発現することによって、チョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。

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、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*G. max* (L.) Merr.) の商業品種 A5547 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) の起源は、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。*Soja* 亜属にはダイズの他に、ダイズの祖先である野生ダイズの一つであるツルマメが含まれる。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズ種子には、有害生理活性物質であるトリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸が含まれている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要食物の一つである。代表的なアレルゲンとして、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 -コングリシニン及びトリプシンインヒビターが知られている。

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

ダイズには、真菌類、寄生虫及び細菌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

ダイズは、豆腐、味噌などの様々な食品に加工されており、これらを通じてヒトに摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種としてツルマメが知られている。ツルマメには、トリプシンインヒビター、フィチン酸、ラフィノース及びフィチン酸などの有害生理活性物質が含まれていると考えられている。

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

ダイズ MON87701 の作出に使用した導入用プラスミド PV-GMIR9 の構築には

ベクターE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

ベクターEの塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

ベクターE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

ベクターE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

ベクターEには、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対して耐性を付与するアデニ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

ベクターE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 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* である。また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、*Agrobacterium* sp. CP4 株である。

(2) 安全性に関する事項

改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* が属する *B. thuringiensis* は、微生物農薬の基材として利用されている。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株は、ヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

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 *cry1Ac* 遺伝子は、植物中での発現が最適となるように、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 由来の *cry1Ab* 遺伝子の 1～1398 番目の塩基配列及び *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 由来の *cry1Ac* 遺伝子の 1399～3534 番目の塩基配列を連結することにより構築された遺伝子である。その結果、改変 *cry1Ac* 遺伝子が発現する改変 Cry1Ac タンパク質のアミノ酸配列は、野生型 Cry1Ac タ

ンパク質のアミノ酸配列と比較して 7 箇所異なっている。また、改変 Cry1Ac タンパク質の N 末端側に CTP1 由来の 4 個のアミノ酸が結合している。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物中での発現が最適となるように *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列を改変することにより構築された遺伝子である。その結果、*cp4 epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

(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

挿入 DNA 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・改変 *cry1Ac* 遺伝子

改変 *cry1Ac* 遺伝子がコードする改変 Cry1Ac タンパク質は、Cry1Ac タンパク質の改変タンパク質である。Cry1Ac タンパク質は、*B. thuringiensis* が産生するタンパク質で、標的のチョウ目昆虫に摂取されると、昆虫の中腸に作用し、中腸上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されている(参照3,4,5)。

改変 Cry1Ac 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、TOXIN6^cデータベースを用いて FASTA 検索を行った結果、相同性のある既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照6)。

・改変 *cp4 epsps* 遺伝子

改変 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする改変 CP4 EPSPS タンパク質は、CP4 EPSPS タンパク質の改変タンパク質である。CP4 EPSPS タンパク質は、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(参照7)。

なお、ダイズ MON87701 の作出過程において、交配による遺伝的分離を利用して、改変 *cp4 epsps* 遺伝子をもたない個体を選抜したため、ダイズ MON87701 は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を有していない。

(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-GMIR9 には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、サザンブロット分析によってダイズ MON87701 には含まれていないことが確認されている。

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

^c TOXIN6: GenBank (GenBank protein database, 163.0 版、2007 年 12 月 15 日)に登録されているタンパク質配列から構成されるデータベース(PROTEIN) から検索して集めた 7,176 配列のサブセット。

(1) プロモーターに関する事項

改変 *cry1Ac* 遺伝子のプロモーターは、*Arabidopsis thaliana* のリブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット 1A (*RbcS4*) 遺伝子由来の *RbcS4* プロモーターである (参照8)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のプロモーターは、Figwort mosaic virus (FMV) の 35SRNA 由来の *FMV* プロモーターである (参照9)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cry1Ac* 遺伝子のターミネーターは、*G.max* のダイズ 7S 種子貯蔵タンパク質遺伝子由来の 7S α '3'ターミネーターである (参照10)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーターは、*Pisum sativum* 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 *RbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域に由来する (参照11)。

(3) その他

改変 *cry1Ac* 遺伝子には、改変 Cry1Ac タンパク質を葉緑体へ移動させるため、*A. thaliana* の *RbcS4* 遺伝子に由来する輸送ペプチドをコードする配列が挿入されている (参照 8)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子には、転写の安定化及び転写効率の向上のため、*A. thaliana* の 5-エノールピルビルシキミ酸合成酵素 (EPSPS) をコードしている *shkG* 遺伝子の 5'末端非翻訳領域が挿入されている (参照12)。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質を細胞質から葉緑体へと移動させるために、*shkG* 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も挿入されている (参照 12)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

ベクターE に改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを導入し、導入用プラスミド PV-GMIR9 を得た (参照13)。

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-GMIR9 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導入用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-GMIR9 の T-DNA 領域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。

(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導入用ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、導入用プラスミド PV-GMIR9 の右側境界配列 (RB) から左側境界配列 (LB) までの T-DNA 領域である。この領域を、アグロバクテリウム法によって宿主に導入した。

(4) 導入しようとする導入用ベクターは、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-GMIR9 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表1 ダイズ MON87701 の挿入 DNA①

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>R. radiobacter</i> 由来の DNA 領域
(改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>RbcS4</i>	<i>A. thaliana</i> の <i>RbcS4</i> 遺伝子由来の <i>RbcS4</i> プロモーター、リーダー配列及び 5' 末端非翻訳領域
<i>CTP1</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>RbcS4</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>cry1Ac</i>	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>kurstaki</i> 由来の改変 <i>Cry1Ac</i> タンパク質をコードする遺伝子
<i>7Sα'3'</i>	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) ダイズ由来の <i>Sphas1</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域
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> 由来の DNA 領域

表2 ダイズ MON87701 の挿入 DNA②

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>R. radiobacter</i> 由来の DNA 領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
P-FMV	プロモーター領域 (遺伝子の転写に必要な配列) FMV 由来の 35SRNA の FMV プロモーター
<i>ShkG</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の EPSPS タンパク質をコードする <i>shkG</i> 遺伝子の 5' 末端非翻訳領域
<i>CTP2</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の EPSPS タンパク質をコードする <i>shkG</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列

改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp.CP4 株の改変 CP4 EPSPS タンパク質をコードする遺伝子
<i>E9</i>	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>Pisum sativum</i> 由来のリブロース 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>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域
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> 由来の DNA 領域

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを宿主に導入した後、グリホサートを含む培地で選抜して再生個体を得た。次に、自殖により得た個体に対して、通常の散布量よりも低薬量のグリホサートを散布した結果、軽度の損傷を受けた個体について、サザンブロット分析、ELISA 分析、定量 PCR 分析及び分離比の解析を行うことにより、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を有さない個体を選抜した。次に、既存の品種との戻し交配又は自殖を行い、ダイズ MON87701 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

ダイズ MON87701 のゲノムに挿入された改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることが確認された（参照 14）。

導入用プラスミド PV-GMIR9 の外骨格領域がダイズ MON87701 のゲノムに挿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、外骨格領域は挿入されていないことが確認された（参照 14）。

ダイズ MON87701 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-GMIR9 の T-DNA 領域と比較した結果、5'末端領域の 312 bp（RB 領域）の欠損及び 3'末端領域の 178 bp（LB 領域）の欠損を除き、塩基配列は一致することが確認された（参照 14）。

ダイズ MON87701 の挿入 DNA 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、ダイズ MON87701 の塩基配列に基づいて、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列に挿入 DNA を挟むようにプライマーを設計し、PCR 分析を行った。その結果、宿主である非組換えダイズのみの特異的な PCR 産物が増幅された（参照 14）。また、増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、ダイズ MON87701 の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列の塩基配列と比較した結果、DNA 挿入に伴う 32 bp の欠損及び DNA 断片（14 bp）の挿入を除き、挿入 DNA の近傍配列と宿主ゲノムの塩基配列は一致していた。したがって、近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された（参照 14）。

ダイズ MON87701 のゲノムに DNA を挿入することによって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 (1,440 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,496 bp) について、公的に利用できる核酸データベース (GenBank) を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、blastn 検索においてダイズ由来の塩基配列と相同性が認められたが、相同性が認められた配列には複数の停止コドンが含まれていた。また、blastx 検索において相同性のある配列は見いだされなかった。したがって、DNA の挿入によって宿主の既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた (参照14)。

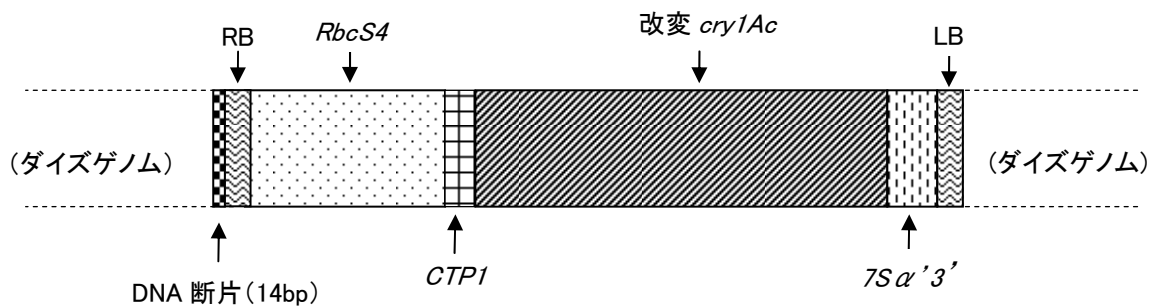


図1 ダイズ MON87701 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87701 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (400 bp) 及び 3'末端近傍配列 (400 bp) 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、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 ORF が 10 個見いだされた。

10 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース (AD_2009^d)、毒性タンパク質データベース (TOX_2009^e) 及びタンパク質データベース (PRT_2009^f) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質やアレルゲンは見いだされなかった。さらに、既知アレルゲンとの相同性の有無を確認するために、AD_2009 を用いて、相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2009 を用いて、相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸と一致するものは見いだされなかった。

^d AD_2009: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) をもとに作成したデータベースで、1,386 配列のサブセット。

^e TOX_2009: GenBank (GenBank protein database, 169.0 版、2008 年 12 月 16 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース (PROTEIN) をもとに作成したデータベースで、7,651 配列のサブセット。

^f PRT_2009: GenBank (GenBank protein database, 169.0 版、2008 年 12 月 16 日) に登録されているタンパク質配列から構成されるデータベース (PROTEIN) で、14,717,352 配列のサブセット。

た（参照15,16）。

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

ダイズ MON87701 の葉、種子、根、茎葉及び花粉/葯における改変 Cry1Ac タンパク質の発現量を ELISA 法を用いて分析を行った。結果は表3のとおりである（参照17）。

表3 ダイズ MON87701 における改変 Cry1Ac タンパク質の発現量
(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)

分析組織*	改変 Cry1Ac タンパク質
葉	12~110
根	検出限界以下**
茎葉	2.5~26
種子	3.1~5.0
花粉/葯	1.8~3.1

* 葉は3葉期~16葉期の値を示した。 **検出限界は0.347 $\mu\text{g/g}$ である。

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

日本人1人が1日に摂取するダイズ加工品及び味噌・醤油の摂取量85.0g（参照18）をすべてダイズ MON87701 に置き換えて改変 Cry1Ac タンパク質の摂取量を計算すると、357 μg となり、1人1日当たりのタンパク質摂取量71.1g（参照18）に占める割合は 5×10^{-6} となる。したがって、一日タンパク質摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

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

改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* に関し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 Cry1Ac 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 で発現させた改変 Cry1Ac タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析においては、試験開始後30秒以内にポリペプチド断片に分解されることが確認された（参照19）。

また、ウェスタンブロット分析においては、試験開始後 30 秒以内に消化され、SDS-PAGE 法で検出されたポリペプチド断片は確認されなかった（参照 19）。

SDS-PAGE で検出されたポリペプチド断片の消化性について確認するために、人工胃液中で 2 分間処理後、人工腸液中で処理した結果、ポリペプチド断片は人工腸液処理後 30 秒未満で消化されることが確認された（参照 19）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 Cry1Ac タンパク質の人工腸液中における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。その結果、試験開始後 5 分以内に約 55kDa のポリペプチド断片に分解され、それ以上消化が進まないことが確認された（参照 19）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 Cry1Ac 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に、ELISA 分析を行った結果、改変 Cry1Ac タンパク質は、75°C、30 分間の加熱処理に対して免疫反応性が失われることが確認された（参照 20）。

(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 Cry1Ac 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、アレルゲンデータベース (AD8^g) を用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見いだされなかった（参照 6）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD8 を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸と一致するものは見いだされなかった（参照 6）。

上記、(1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 Cry1Ac 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 MON87701 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、5 世代のダイズ MON87701 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、改変 *cry1Ac* 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 21）。

また、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 世代のダ

^g AD8 : Food Allergy Research and Resource Program Database(FARRP)をもとに作成したデータベースで、1,250 配列のサブセットである。

イズ MON87701 につ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（参照 14）。

さらに、改変 Cry1Ac タンパク質の発現の安定性を確認するために、5 世代のダイズ MON87701 の葉から抽出した試料を用いてウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの世代においても改変 Cry1Ac タンパク質が発現していることが確認された（参照 22）。

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 Cry1Ac タンパク質は、酵素活性を持つとは考えられておらず、宿主の代謝系と独立して機能している。したがって、改変 Cry1Ac タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたダイズ MON87701 と非組換えダイズについて、主要構成成分、ミネラル成分、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 23）。

（1）主要構成成分

種子及び地上部の水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性及び中性デタージェント繊維について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

（2）ミネラル成分

種子の主要なミネラル 9 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められなかった。

（3）ビタミン類

種子のビタミン E 及びビタミン B について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

（4）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ダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(5) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 23 種類について分析を行った結果、14 種類については対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。残りの 9 種類については定量限界以下であった。

(6) 有害生理活性物質

種子のレクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース及びトリプシンインヒビター、イソフラボン類（ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても一般の商業ダイズ品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

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、2009 年 5 月に米国食品医薬品庁（FDA）に対する食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2009 年 3 月に米国農務省（USDA）に対する無規制裁培のための申請が行われた。

カナダにおいては、2009 年 6 月にカナダ保健省（Health Canada）に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2009 年 3 月にカナダ農務省（CFIA）に対する飼料・環境の安全性審査の申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、2009 年 8 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対する食品としての安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ MON87701 の栽培方法は、従来ダイズと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ダイズ MON87701 の種子の製法及び管理方法は、従来ダイズと同じである。

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

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 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, International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org>. [Accessed June 3, 2008]
- 2 Lundry, D.R., W.P. Ridley, J.J. Meyer, S.G. Riordan, M.A. Nemeth, W.A. Trujillo, M.L. Breeze, and R. Sorbet., Composition of grain, forage, and processed fractions from second-generation glyphosate-tolerant soybean, MON 89788, is equivalent to that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *J Agric Food Chem*, 2008, 56, 4611-4622.
- 3 Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hoefte, J.V. Rie, S. Jansens, and H.V. Mellaert., Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 1988, 85, 7844-7848.
- 4 Slaney, A.C., H.L. Robbins, and L. English., Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIII_A: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 1992, 22, 9-18.
- 5 Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. Van Mellaert., Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-endotoxins. *Applied and environmental microbiology*, 1990, 1378-1385.
- 6 Bioinformatics Evaluation of the Cry1Ac Protein Present in MON87701 Soybean Utilizing the AD8, TOXIN6, and PROTEIN Databases. (社内報告書)
- 7 Padgett, S.R., D. Re, G. Barry, D. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G. Kishore, and R.T. Fraley., 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.
- 8 Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore, and M.P. Timko., Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*, 1988, 11, 745-759.
- 9 Rogers, S.G., Promoter for transgenic plants. U. S. Patent., 2000.
- 10 Schuler, M.A., E.S. Schmitt, and R.N. Beachy., Closely related families of genes code for the alpha and alpha' subunits of the soybean 7S storage protein complex. *Nuc. Acid. Res.*, 1982, 10, 8225-8244.
- 11 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards, and N. Chua., Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of

- ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase., 1984, EMBO 3, 1671-1679.
- 12 Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser., Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Mol. Gen. Genet., 1987, 210, 437-442.
 - 13 Plasmid Lineage of PV-GMIR9 (社内報告書)
 - 14 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87701: BLASTx and BLASTn Analysis (社内報告書)
 - 15 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in MON87701: Assessment of Putative Polypeptides (社内報告書)
 - 16 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON87701 (社内報告書)
 - 17 Assessment of the Cry1Ac Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON87701 Produced in U.S. Field Trials During 2007 (社内報告書)
 - 18 健康・栄養情報研究会編、平成 18 年度国民健康・栄養調査報告、第一出版、2009
 - 19 Assessment of the In Vitro Digestibility of the Cry1Ac Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (社内報告書)
 - 20 Immunodetection of Cry1Ac Protein in MON87701 Ground Seed Following Heat Treatment (社内報告書)
 - 21 Heritability and Stability of Genes Present in Insect-Protected Soybean MON87701 across Multiple Generations (社内報告書)
 - 22 Western Blot Analysis of Cry1Ac Protein in MON87701 Soybean Leaf across Multiple Generations in Support of a Japan Stage III Application (社内報告書)
 - 23 Compositional Analyses of Forage and Seed Collected from MON87701 Grown in United States during 2007 (社内報告書)