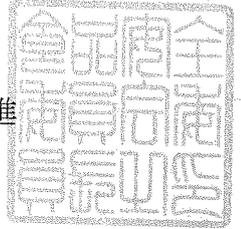




府食第498号
平成25年6月24日

厚生労働大臣
田村 憲久 殿

食品安全委員会
委員長 熊谷 進



食品健康影響評価の結果の通知について

平成23年2月21日付け厚生労働省発食安0221第2号をもって厚生労働省から食品安全委員会に意見を求められた食品「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 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

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 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

除草剤グルホシネート耐性及びチヨウ目
害虫抵抗性ワタ T304-40 系統

2013年6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.....	6
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.....	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.....	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.....	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.....	18
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	18
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>.....	18

＜審議の経緯＞

- 2011年2月22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0221第2号）、関係書類の接受
- 2011年2月24日 第368回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2011年4月25日 第90回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2012年8月29日 第107回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2013年3月7日 第113回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2013年5月13日 第473回食品安全委員会（報告）
- 2013年5月14日から6月12日まで 国民からの御意見・情報の募集
- 2013年6月18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
- 2013年6月24日 第479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＞

2012年6月30日まで	2012年7月1日から
小泉直子（委員長）	熊谷 進（委員長）
熊谷 進（委員長代理）	佐藤 洋（委員長代理）
長尾 拓	山添 康（委員長代理）
野村一正	三森国敏（委員長代理）
畑江敬子	石井克枝
廣瀬雅雄	上安平冽子
村田容常	村田容常

＜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＞

2011年9月30日まで		2011年10月1日から	
澤田純一（座長）		澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）		鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	澁谷直人	五十君静信	手島玲子
石見佳子	手島玲子	宇理須厚雄	中島春紫
海老澤元宏	中島春紫	橘田和美	飯 哲夫
小関良宏	飯 哲夫	児玉浩明	和久井信
橘田和美	山崎 壮	澁谷直人	
児玉浩明	和久井信		

要 約

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 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、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ビアラフォス耐性遺伝子及び *Bacillus thuringiensis* ssp. *berliner* に由来する改変 *cry1Ab* 遺伝子を導入して作出されており、改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素及び改変 Cry1Ab タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネート及び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。

「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、「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 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：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統
性質：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性
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）

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統」（以下「ワタ T304-40」という。）は、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ピアラフォス耐性遺伝子（改変 *bar* 遺伝子）及び *Bacillus thuringiensis* ssp. *berliner* に由来する改変 *cry1Ab* 遺伝子を導入して作出されており、改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（改変 PAT タンパク質）及び改変 Cry1Ab タンパク質を発現することで、除草剤グリホシネート及び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。

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、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 Coker315 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygroscopicus* である。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *berliner* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *bar* 遺伝子は除草剤グルホシネート耐性を付与する改変 PAT タンパク質を発現する。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子はチョウ目害虫抵抗性を付与する改変 Cry1Ab タンパク質を発現する。

改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 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

ワタ種子から搾油した綿実油が古くから食用に用いられている。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用いられている。さらに、綿実のリンター（地毛）から製造されたセルロースは、食品や医薬品の原料として用いられている。

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

ワタ種子の主要栄養組成は、水分 4.0～15.9%、粗タンパク質 11.7～34.2%、粗脂質 11.8～36.3%、灰分 3.2～6.2%、炭水化物 24.5～74.4%である（参照 1, 2, 3, 4）。

- (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

ワタ種子の有害生理活性物質は、遊離ゴシポール 0.23～1.40%（乾燥重量中）、ステルクリン酸 0.12～0.92%（脂質中）、マルバリン酸 0.17～1.5%（脂質中）である（参照 3, 4, 5, 6）。

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 T304-40 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 T304-40 の摂取部位は、従来ワタと変わらない。

- (3) 摂取量

ワタ T304-40 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 T304-40 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

宿主及び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

ワタ T304-40 は、改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の導入によって、改変 PAT タンパク質及び改変 *Cry1Ab* 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 から、ワタ T304-40 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 T304-40 は、導入された改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子が改変 PAT タンパク質及び改変 *Cry1Ab* タンパク質を発現することによって、除草剤グルホシネート及びチョウ目害虫の影響を受けずに生育することが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、アオイ科ワタ連ワタ属に属するワタ (*G. hirsutum* L.) の商業品種 Coker315 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. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum* 及び *G. barbadense* の4種であり、現在生産されているワタのほとんどが *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* である。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタ種子には、ゴシポール及びステルクリン酸、マルバリン酸等のシクロプロペン脂肪酸が含まれている。

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知られているが、これらの病原体がヒトに対して病原性を持つことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸が含まれているが、綿実油の製造工程で除去されるか、著しく減少することが知られている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ属の近縁種には、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 T304-40 の作出に使用された導入用プラスミド pTDL008 の構築には、プラスミド pGSV20 が用いられた。

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
プラスミド pGSV20 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
プラスミド pGSV20 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
プラスミド pGSV20 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
プラスミド pGSV20 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* 遺伝子並びにネオマイシン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。
- (5) 伝達性に関する事項
プラスミド pGSV20 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 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygroscopicus* である。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* ssp. *berliner* である。
- (2) 安全性に関する事項
改変 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* が属する *Streptomyces* 属には食経験がないが、土壌、飼料、堆肥等に存在しており、これらを通じてヒトは接触経験があると考えられる。また、ヒトに対する病原性を持つという報告はない。
改変 *cry1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* ssp. *berliner* が属する *B. thuringiensis* は、微生物農薬として長年にわたり安全に利用されている。

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
改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygroscopicus* からクローニングした *bar* 遺伝子の塩基配列を植物体内での発現が最適となるように改変された遺伝子である。この改変によって発現タンパク質のアミノ酸配列が一つ改変されている。
改変 *cry1Ab* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *berliner* からクローニングした

cry1Ab5 遺伝子の塩基配列を植物体内での発現が最適となるように改変された遺伝子であり、C-末端の 539 アミノ酸は含まれていない。また、発現タンパク質の N-末端のメチオニンの隣にアラニンが付加されている。

挿入 DNA は表 1 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

改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の塩基数、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 *bar* 遺伝子

改変 *bar* 遺伝子が改変 PAT タンパク質を発現することによって、グルタミン合成酵素を阻害する除草剤グルホシネートの存在下でもグルタミン合成酵素活性を示すことができる。その結果、ワタ T304-40 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる。

改変 PAT 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、タンパク質データベース^aを用いて blastp 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 7）。

・改変 *cry1Ab* 遺伝子

改変 *cry1Ab* 遺伝子がコードする改変 Cry1Ab タンパク質は、チョウ目害虫等に殺虫活性を示すタンパク質（Bt タンパク質）の一種である。Bt タンパク質は、標的昆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、これが中腸に作用し、上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが報告されている（参照 8,9）。

改変 Cry1Ab 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、タンパク質データベース^aを用いて blastp 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 10）。

(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 pTDL008 の外骨格領域には、*aadA* 遺伝子及び *npt I* 遺伝子の断片が含まれているが、ワタ T304-40 のゲノムには挿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

改変 *bar* 遺伝子のプロモーターは、Cauliflower mosaic virus 由来のプロモーターである（参照 11）。

改変 *cry1Ab* 遺伝子のプロモーターは、Subterranean clover stunt virus の

^a Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept

セグメント 7 遺伝子由来のプロモーター (参照 12) をタンデムに連結したものである。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *bar* 遺伝子のターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域である (参照 13)。

改変 *cry1Ab* 遺伝子のターミネーターは、*Flaveria bidentis* (キアレチギク) 由来の NADP リンゴ酸酵素遺伝子の 3'非翻訳領域である (参照 14)。

(3) その他

改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセットには、改変 *cry1Ab* 遺伝子の発現を高めるために、*Oryza sativa* (イネ) 由来の *E1* 遺伝子のリーダー配列が挿入されている (参照 15)。

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 pGSV20 の T-DNA 領域に、改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセットを挿入することによって、導入用プラスミド pTDL008 が作製された。

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 pTDL008 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

導入用プラスミド pTDL008 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発現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 pTDL008 の左側境界配列 (LB) から右側境界配列 (RB) までの T-DNA 領域である。

(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 pTDL008 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1 ワタ T304-40 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
LB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の左側境界配列
(改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット)	
3'nos ターミ ネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域
改変 <i>bar</i>	<i>S. hygroscopicus</i> 由来の改変 PAT タンパク質をコードする遺伝子
35S3 プロモ ーター	プロモーター領域 Cauliflower mosaic virus 由来の 35S RNA プロモーター
(改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子発現カセット)	
s7s7 プロモ ーター	プロモーター領域 Subterranean clover stunt virus のセグメント 7 遺伝子由来のタン デムプロモーター
5'e1	<i>O. sativa</i> 由来の <i>E1</i> 遺伝子のリーダー配列
改変 <i>cry1Ab</i>	<i>B. thuringiensis</i> ssp. <i>berliner</i> 由来の改変 <i>Cry1Ab</i> タンパク質をコー ドする遺伝子
3'me1 ター ミネーター	ターミネーター領域 <i>F. bidentis</i> の NADP リンゴ酸酵素遺伝子由来の 3'非翻訳領域
RB	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の右側境界配列

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を用いて改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Ab* 遺伝子カセットを宿主に導入した後、グルホシネートを含む培地で選抜して再生個体が得られた。次に、チョウ目害虫であるオオタバコガ幼虫を用いたバイオアッセイ及び ELISA 法によって選抜し、ワタ T304-40 が得られた。

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

ワタ T304-40 のゲノムに挿入された改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Ab* 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 *bar* 遺伝子発現カセットが 1 コピー、改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセットが 2 コピー挿入されていることが確認された (参照 16)。

導入用プラスミド pTDL008 の外骨格領域がワタ T304-40 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、挿入されていないことが確認された (参照 17)。

ワタ T304-40 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pTDL008 の T-DNA 領域の塩基配列と比較した結果、LB、*3'nos* の一部 (48 bp) 、*3'me1* の一部 (617 bp) 及び RB が欠失した T-DNA 領域、RB (22 bp 欠失) 、*3'me1* 、改変 *cry1Ab* 遺伝子、*5'e1* 及び *s7s7* 断片 (623 bp 欠失) で構成される DNA 断片、*3'me1* 断片 (73 bp 欠失) 並びに RB 断片 (3 bp) が挿入されていることが確認された (参照 18、図 1)。

ワタ T304-40 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、5'末端近傍配列 (1,185 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,228 bp) の塩基配列を決定し、宿主ゲノムの塩基配列と比較した結果、挿入時に欠失した配列 (32 bp) を除き、一致していることが確認された (参照 19)。

ワタ T304-40 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、挿入近傍配列 (5'末端近傍配列 (1,185 bp) 、DNA 挿入時に欠失した配列 (32 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,228 bp) からなる配列) について、データベース (DAD、Genpept 及び UniProt) を用いて blastx 検索を行った結果、既知のタンパク質と相同性を示す塩基配列は見いだされなかった (参照 20) 。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。

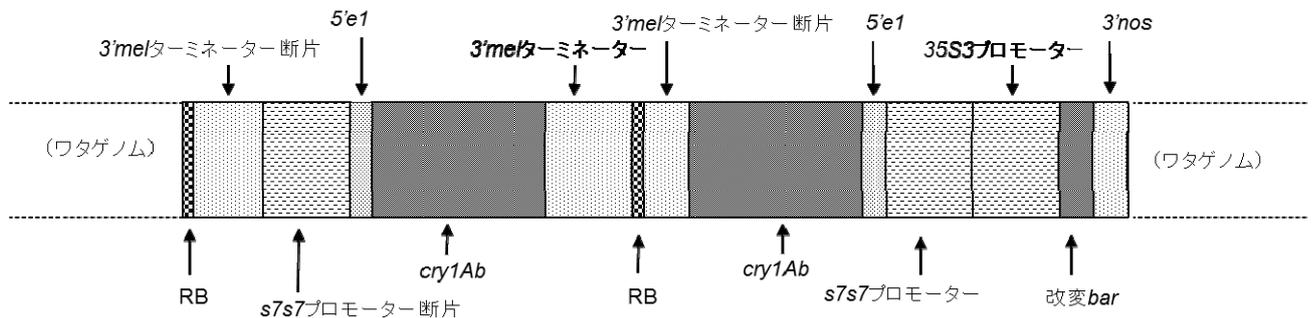


図 1 ワタ T304-40 の挿入 DNA (模式図)

(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

ワタ T304-40 の挿入 DNA と 5'末端近傍配列 (1,185 bp) との接合部及び挿入 DNA と 3'末端近傍配列 (1,228 bp) との接合部並びに挿入 DNA 内部に新たに生じた境界領域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、六つの読み枠において ORF 検索を行った結果、3 アミノ酸以上の ORF が 24 個見いだされた (参照 20)。

24 個の ORF のうち、8 アミノ酸以上の 23 個の ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベース^aを用いて blastp 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 21) 。また、既知の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 (Allergen Online) を用いて相同性検索を行った結果、連続す

る 80 以上のアミノ酸配列について 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(参照 21)。また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース (Allergen Online) を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった(参照 21)。

さらに、ORF からの発現の可能性を確認するために、挿入 DNA と 5'末端近傍配列との接合部、挿入 DNA と 3'末端近傍配列との接合部及び挿入 DNA 内部の接合部領域の塩基配列に相補するプローブを用いて、ノーザンブロット分析を行った。その結果、一部の組織で改変 *cry1Ab* 遺伝子の転写読み過ごし及び polyA 鎖の付加した転写産物が認められた(参照 22,23)。しかし、改変 Cry1Ab タンパク質のウェスタンブロット分析において、この読み過ごしによると考えられるタンパク質は確認されず、新たなタンパク質が生じる可能性は低いと考えられた(参照 24)。

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 T304-40 の根、茎、葉、花蕾、頂端、さく、全地上部、花、花粉及び種子における改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の発現を調べるために、ノーザンブロット分析を行った。その結果、全ての組織で改変 *bar* 遺伝子の発現が、また、花粉を除く全ての組織で改変 *cry1Ab* 遺伝子の発現が確認された(参照 22)。

改変 *cry1Ab* 遺伝子について、複数のバンドが見られたことから、葉、茎及び根のサンプルを用いて再度のノーザンブロット分析を行い、さらに RT-PCR を用いて解析した。その結果、確認されたバンドは、4 種類の改変 *cry1Ab* 遺伝子の転写読み過ごし及び polyA 鎖の付加したスプライシングバリエーションであると考えられた(参照 24,25)。

さらに、スプライシングにより新たにつくられると考えられる接合領域に関して ORF 検索を行い、その結果見いだされた ORF について、公共のデータベース^a及び社内の毒素データベースを用いて既知のアレルゲン又は毒素タンパク質との相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められず、既知の毒素タンパク質と生物学的に意味のある類似性は認められなかった。(参照 26)。

改変 *cry1Ab* 遺伝子の 4 種類の転写産物に関して、いずれも改変 *cry1Ab* 遺伝子のコード領域に変化はなく、改変 Cry1Ab タンパク質のウェスタンブロット分析において、この読み過ごしによると考えられるタンパク質は確認されず、新たなタンパク質が生じる可能性は低いと考えられた(参照 24,26)。

ワタ T304-40 の根、茎、葉、花蕾、頂端、さく、全地上部、花及び種子における改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab 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 2 のとおりである(参照 27)。

表2 ワタ T304-40 における改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab タンパク質の発現量（単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重）

分析組織	採取時期*	改変 PAT タンパク質	改変 Cry1Ab タンパク質
根	1、3	95.1~115	3.8~8.6
茎	1、3	44.5~100	0.9~6.2
葉	1、2、3	57.9~193	0.4~4.6
花蕾	2	180	2.9
頂端	3	88.9	1.3
さく	3	39.3	0.4
全地上部	3	134	2.2
花	3	187	10.6
種子	4	39.6	4.1

* 1.生育期（4~6葉期）、2.開花直前期、3.開花期、4.収穫期

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 T304-40 を用いて製造した綿実油の改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab タンパク質含有量を ELISA 法を用いて分析を行った結果、検出限界値（改変 PAT タンパク質 41.8 ng/g、改変 Cry1Ab タンパク質 38.2 ng/g）以下であった。

そこで、ワタ T304-40 を用いて製造した綿実油の改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab タンパク質含有量を検出限界値と仮定し、日本人一人一日当たりの油脂類平均摂取量 9.9 g（参照 28）をすべてワタ T304-40 を用いて製造した綿実油に置き換えて計算すると、改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab タンパク質の摂取量はそれぞれ 0.41 μg 及び 0.38 μg となり、日本人一人が一日に摂取する平均タンパク質摂取量 67.8 g（参照 28）に占める割合はそれぞれ 6.0×10^{-9} 及び 5.6×10^{-9} となる。したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めること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 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* 及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* 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 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab 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

・ 改変 PAT タンパク質

Escherichia coli で発現させた改変 PAT 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 秒以内に消化されることが及びウェスタンブロット分析においては試験開始後 2 分以内に消化されることが確認された（参照 29）。

・ 改変 Cry1Ab タンパク質

E. coli で発現させた改変 Cry1Ab 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に、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 30）。

② 人工腸液に対する感受性

・ 改変 PAT タンパク質

E. coli で発現させた改変 PAT 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、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 2 分以内に消化されることが確認された（参照 31）。

・ 改変 Cry1Ab タンパク質

E. coli で発現させた改変 Cry1Ab 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、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始直後に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 32）。

③ 加熱処理に対する感受性

・ 改変 PAT タンパク質

E. coli で発現させた改変 PAT タンパク質は 90°C で 60 分の加熱処理を行っても安定であった（参照 33）。改変 PAT タンパク質の加熱による酵素活性の変化を測定した結果、35°C を超えて、15 分間加熱することによって酵素活性が減少することが確認された（参照 34）。

・ 改変 Cry1Ab タンパク質

E. coli で発現させた改変 Cry1Ab タンパク質について、加熱による殺虫活性の変化を測定した結果、60°C、120 分以上の加熱処理により殺虫活性が低下することが確認された（参照 33）。また、ELISA 法を用いて免疫反応性を調べた結果、改変 Cry1Ab タンパク質の免疫反応性は、加熱処理により減少することが確認された（参照 36）。

(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 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab タンパク質について、既知のアレルゲン等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（Allergen Online）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 37,38）。また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース（Allergen Online）を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致する配列は見いだされなかった（参照 37,38）。

上記、(1)～(4)及び前項3から総合的に判断し、改変 PAT タンパク質及び改変 Cry1Ab 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 T304-40 に導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、6 世代のワタ T304-40 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 39,40）。

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 PAT タンパク質は、L-グルホシネートをアセチル化することによって、除草剤としての機能を失わせる。その反応は L-グルホシネートに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる（参照 41,42,43）。

改変 Cry1Ab タンパク質が酵素活性を持つという報告はなく、宿主の代謝系と独立して機能するため、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

スペインのほ場で栽培されたワタ T304-40 の種子及び非組換えワタの種子の主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル類、ビタミン E 並びに有害生理活性物質の分析を行い、ほ場ごとにワタ T304-40 と非組換えワタとの間の統計学的有意差について検討し、有意差が認められたほ場が過半数を占めるか否かでワタ T304-40 と非組換えワタとの差異について検討が行われた（参照 44）。

(1) 主要構成成分

水分、粗タンパク質、粗脂質、灰分、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び炭水化物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で差異は確認されなかった。

(2) アミノ酸組成

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で差異は確認されなかった。

(3) 脂肪酸組成

脂肪酸 19 種類について分析を行った結果、パルミトオレイン酸- ω 7 については、非組換えワタとの間で差異が確認され、その含量は、ワタ T304-40 では一般の商業ワタ品種の文献値の範囲を僅かに下回った。しかし、その含量は、非組換えワタでも一般の商業ワタ品種の文献値の範囲を下回っていることから、パルミトオレイン酸- ω 7 が文献値を下回ることによってヒトの健康を損なうおそれは極めて低いと考えられる。

なお、パルミトオレイン酸- ω 7 以外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差異は確認されないか、差異が確認された場合であってもその含量は一般の商業ワタ品種の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 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えワタとの間で差異が確認されないか、差異が確認された場合であってもその含量は一般の商業ワタ品種の文献値の範囲内であった。

(5) ビタミン E

総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で差異は確認されなかった。

(6) 有害生理活性物質

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で差異は確認されなかった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

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、2010 年 5 月に安全性が確認された。

EU においては、2011 年 4 月に欧州食品安全機関 (EFSA) に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われた。

なお、ワタ T304-40 の単独での商品化の予定はなく、米国及びカナダにおいて単独での申請は行われていないが、ワタ T304-40 と除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統を掛け合わせた品種の申請状況については、以下のとおりである。

米国においては、米国食品医薬品庁 (FDA) に対して食品としての安全性審査

の申請が行われ、2011年8月に確認が終了した。また、米国農務省（USDA）に対して無規制裁培の承認申請が行われ、2011年10月に承認を得た。さらに、米国環境保護庁（EPA）に対して改変 Cry1Ab タンパク質の許容値設定除外の申請が行われ、2012年1月に承認を得た。

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）に対して環境への安全性審査の申請及び飼料としての安全性審査の申請が行われ、2012年1月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ T304-40 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 T304-40 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までによって、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 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 Amann, Mary M. Eickhoff, Jane C. Identification of nutrients and antinutrients to analyze in cotton-derived foods for human and animal consumption, Environ. 1999, p.1-5,41.
- 2 Bertrand, J A.; Sudduth, T Q.; Condon, A.; Jenkins, T C.; Calhoun, M C. Nutrient content of whole cottonseed. Journal of Dairy Science. 2005, 88(4), p.1470-1477.
- 3 ILSI. Crop composition database Search results, ver.3.0. ILSI Crop compositional database-search, 2007.
- 4 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/MONO(2004)16,2004
- 5 Nida, Debbie L.; Patzer, Shari.; Harvey, Patricia.; Stipanovic, Robert.; Randall,

- Wood.; Fuchs, Roy L. Glyphosate-tolerant cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *J.Agric. Food Chem.* 1996, 44(7), p.1967-1974.
- 6 Phelps, Richard A.; Shenstone, F. S.; Kemmerer, A. R.; Evans, R. J. A review of cyclopropenoid compounds: biological effects of some derivatives. *Poult. Sci.* 1965, 44, p.358-394.
 - 7 PAT/bar protein amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
 - 8 Knowles, Barbara H.; Dow, Julian A.T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 1993, 15(7), p.469-476.
 - 9 Broderick, Nichole A.; Raffa, Kenneth F.; Handelsman, Jo. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS.* 2006, 103(41), p.15196-15199.
 - 10 Cry1Ab protein amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
 - 11 Odell, Joan T.; Nagy, Ference.; Chua, Nam-Hai. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature.* 1985, 313(28), p.810-812.
 - 12 Boevink, P.; Chu, P.W.G.; Keese, P. Sequence of subterranean clover stunt DNA: Affinities with the geminiviruses. *Virology.* 1995, (207), p.354-361.
 - 13 Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodmann, H.M. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics.* 1982, 1(6), p.561-573.
 - 14 Marshall, Jerry S.; Stubbs, John D.; Taylor, William C. Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria*. *Plant Physiology.* 1996, 111, p.1251-1261.
 - 15 Michiels, Frank.; Morioka, Sinji.; Scheirlinck, Trees.; Komari, Toshihiko. Stamen-specific promoters from rice. WO92/13956. 1992-08-20.
 - 16 Detailed insert characterization *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (社内報告書)
 - 17 Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequence in *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (社内報告書)
 - 18 Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (社内報告書)
 - 19 Determination of additional flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 and the corresponding pre-insertion locus (社内報告書)

- 20 Bioinformatics analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (社内報告書)
- 21 Cotton transformation event T304-40: 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)
- 22 Full expression analysis of the trait genes and newly created ORFs of cotton event T304-40 (社内報告書)
- 23 Supplementary expression analysis of the *cry1Ab* gene from cotton event T304-40 (社内報告書)
- 24 Structural and functional equivalence of Cry1Ab, Cry2Ae and PAT/*bar* proteins produced in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and *Escherichia coli* to Cry1Ab, Cry2Ae and PAT/*bar* in TwinLink™ cotton *Gossypium hirsutum* (社内報告書)
- 25 Position paper on the supplementary expression analysis of the *cry1Ab* gene from cotton T304-40 (社内報告書)
- 26 Cotton Transformation Event T304-40 in silico safety assessment of junction newly-created Open Reading Frame (ORF) (社内報告書)
- 27 Protein expression analysis of cotton event T304-40, expressing Cry1Ab and PAT/*bar* proteins, USA, 2007 (社内報告書)
- 28 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室. 平成 21 年 国民健康・栄養調査結果の概要. 2010. P22-25,
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000000xtwq.html> (accessed 2011-01-14)
- 29 PAT/*bar* protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid (社内報告書)
- 30 Cry1Ab protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid (社内報告書)
- 31 PAT/*bar* protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid (社内報告書)
- 32 Cry1Ab protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid (社内報告書)
- 33 PAT/*bar* protein heat stability study (社内報告書)
- 34 Botterman, Johan.; Gossele, Veronique.; Thoen, Chris.; Lauwereys, Mark. Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. *Gene*. 1991, (102), p.33-37.
- 35 Heat stability of the Cry1Ab and Cry2Ae protein Bioassay data (社内報告書)
- 36 Analysis of the heat stability of the Cry1Ab protein (社内報告書)
- 37 PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known allergens

- (社内報告書)
- 38 Cry1Ab protein amino acid sequence homology search with known allergens
(社内報告書)
- 39 Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds and grown in different environments (社内報告書)
- 40 Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations (社内報告書)
- 41 Thompson, Charles J.; Movva, N. Rao.; Tizard, Richard.; Cramer, Reto.; Davis, Julian E.; Lauwereys, Marc.; Botterman, Johan. Characterization of the herbicide resistance gene bar from *Streptomyces hygrosopicus*. *The EMBO Journal*. 1987, 6(9), p.2519-2523.
- 42 Droge, W.; Broer, I; Puhler, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*. 1992, 187, p.142-151.
- 43 Wehrmann, Axel.; Van Vliet, Adri.; Opsomer, Chris.; Botterman, Joha.; Schulz, Arno. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14, p.1274-1278.
- 44 Analysis of substantial equivalence of transgenic and non-transgenic cotton (社内報告書)