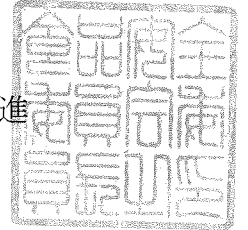




府食第703号
平成25年8月26日

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24年1月31日付け厚生労働省発食安0131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「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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。また、本件に関して行った国民からの意見・情報の募集において、貴省に関する意見・情報が別添のとおり寄せられましたのでお伝えします。

記

「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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

除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統

2013年8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、並びに導入用ベクターの構築に関する事項.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	8
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	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.....	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>

- 2012年1月31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0131第1号）、関係書類の接受
- 2012年2月2日 第417回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2012年2月17日 第101回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2012年11月2日 第109回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2013年2月4日 第462回食品安全委員会（報告）
- 2013年2月5日から3月6日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2013年8月22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8月26日 第486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>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	手島玲子
宇理須厚雄	中島春紫
橘田和美	飯 哲夫
児玉浩明	和久井信
澁谷直人	

要 約

「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼを発現することで、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。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* 遺伝子が導入されたが、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等の比較の結果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、「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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：除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統

性質：除草剤ジカンバ耐性

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）

「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統」（以下「ダイズ MON87708」という。）は、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変ジカンバモノオキシゲナーゼ遺伝子（改変 *dmo* 遺伝子）を導入して作出されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ（改変 MON87708 DMO）を発現することで、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。なお、ダイズ MON87708 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* 遺伝子が導入されたが、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 A3525 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、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 *dmo* 遺伝子は、除草剤ジカンバを不活性化する酵素である改変 MON87708 DMO 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 *dmo* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 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。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 MON87708 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し、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（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 60.0～2,453.5mg/kg、ゲニステイン 144.3～2,837.2 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%及びフィチン酸 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 MON87708 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 MON87708 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 MON87708 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 MON87708 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

ダイズ MON87708 は、改変 *dmo* 遺伝子の導入によって、改変 MON87708 DMO を発現することが宿主との相違点である。

以上、1～6 から、ダイズ MON87708 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 MON87708 は、改変 *dmo* 遺伝子が改変 MON87708 DMO を発現することによって、除草剤ジカンバを散布しても、その影響を受けずに生育することができるようにされている。

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 A3525 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* 亜属にはダイズのほかに、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ている。

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

ダイズの近縁種であるツルマメには、トリプシンインヒビター、フィチン酸、ラフィノース等の有害生理活性物質が含まれている。

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 MON87708 の作出に使用した導入用プラスミド PV-GMHT4355 の構

築には、ベクターB 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

ベクターB 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B 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B 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B にはカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子、及びアンピシリン耐性を付与する *blaTEM* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターB 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、並びに導入用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 *dmo* 遺伝子の供与体は *S. maltophilia* DI-6 株であり、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 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は、植物の根圏、土壌等の自然環境中及び食品中に存在しており、健康なヒトに感染して悪影響を及ぼすことは知られていない。

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 *dmo* 遺伝子は *S. maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子をクローニングすることにより構築された遺伝子である。クローニングの際に、N 末端から 2 番目の位置にアラニンが挿入され、N 末端から 112 番目のトリプトファンがシステインに置換されている（参照 3）。

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。*cp4 epsps* 遺伝子がコードするアミノ酸配列と比較して、N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

挿入 DNA の構成要素は表 1 及び表 2 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

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 *dmo* 遺伝子

改変 *dmo* 遺伝子がコードする改変 MON87708 DMO は、DMO の改変タンパク質である。DMO は三量体を形成し、除草剤ジカンバから 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA) とホルムアルデヒドを生成する脱メチル化反応を触媒する酵素である (参照 4)。

ダイズ MON87708 に含まれる改変 MON87708 DMO には、前駆体から輸送ペプチドが切断された完全長のタンパク質 (39.8 kDa) と輸送ペプチドの一部が切断されずに連結したままのタンパク質 (約 42 kDa) の二種類が存在する。

改変 MON87708 DMO と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無について確認するために、毒性タンパク質データベース (TOX_2010^c) 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 5)。

・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 6)。

なお、ダイズ MON87708 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 MON87708 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-GMHT4355 には、*aadA* 遺伝子が含まれているが、ダイズ MON87708 には導入されていないことがサザンブロット分析によって確認されている。

^c TOX_2010: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版、2009 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タンパク質データベース (PROTEIN) から検索して集めた 8,448 配列のサブセット。

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 *dmo* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Peanut chlorotic streak virus (PCISV) 由来のプロモーターである (参照 7)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、Figwort mosaic virus (FMV) 由来のプロモーターである (参照 8)。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、エンドウ (*Pisum sativum*) 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 *RbcS2* 遺伝子由来の *E9* 3'非翻訳領域である (参照 9)。

(3) その他

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットには、遺伝子発現の制御に関与する Tobacco etch virus (TEV) の 5'非翻訳領域由来の配列が挿入されている (参照 10)。また、改変 MON87708 DMO を葉緑体へ移動させるために、エンドウのリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット遺伝子の輸送ペプチドと成熟型タンパク質の一部をコードする *RbcS* 標的配列が挿入されている (参照 11)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、遺伝子発現の制御に関与する *Petunia hybrida* の *Hsp70* 遺伝子由来の 5'非翻訳領域 *DnaK* リーダー配列が挿入されている (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、シロイヌナズナの *ShkG* 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチド領域である *CTP2* 標的配列が挿入されている (参照 13)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子発現カセットをベクターBに挿入してベクターEを構築し、また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットをベクターDに挿入してベクターFを構築した。ベクターEから改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを含むDNA断片を作製し、ベクターFに挿入することによって、導入用プラスミド PV-GMHT4355 を得た。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド PV-GMHT4355 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-GMHT4355 の T-DNA 領域には、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

導入用プラスミド PV-GMHT4355 の意図する挿入領域は、右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの T-DNA 領域である。

(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-GMHT4355 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 MON87708 への挿入 DNA① (T-DNA I)

構成 DNA	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>PCISV</i> プロモーター	プロモーター領域 Peanut chlorotic streakvirus 由来のプロモーター配列
<i>L-TEV</i>	Tobacco etch virus の 5' 非翻訳領域由来の配列
TS- <i>RbcS</i>	<i>P. sativum</i> 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>RbcS</i> 遺伝子由来の輸送ペプチドから成熟タンパク質の一部までをコードする配列
改変 <i>dmo</i>	<i>S. maltophilia</i> 由来の改変 MON87708 DMO をコードする遺伝子
<i>E9</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>P. sativum</i> 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' 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> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

表2 MON87708 への挿入 DNA② (T-DNA II: 選択マーカーとして一時的に導入)

構成 DNA	機能及び由来
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> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>FMV</i> プロモーター	プロモーター領域 FMV 由来の 35S RNA プロモーター
<i>L-DnaK</i>	<i>P. hybrida</i> 由来の <i>Hsp70</i> 遺伝子の 5' 非翻訳領域リーダー配列
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ由来の 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	ターミネーター領域 <i>P. sativum</i> 由来のリブローズ-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 <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 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> (<i>A. tumefaciens</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

改変 *dmo* 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含む導入用プラスミド PV-GMHT4355 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって宿主に導入した後、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、再分化個体の自殖により得た個体に対して、インベーター分析、サザンブロット分析及び定量 PCR 分析を行い、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を有さない個体を選抜した。その後、既存の品種との戻し交配又は自殖を行い、ダイズ MON87708 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 MON87708 のゲノム中に、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていることがサザンブロット分析で確認された (参照 14)。

また、導入用プラスミド PV-GMHT4355 の外骨格領域及び T-DNA II 領域がダイズ MON87708 のゲノム中に検出されないことがサザンブロット分析で確認された (参照 14)。

ダイズ MON87708 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-GMHT4355 の T-DNA 領域と比較した結果、3'末端領域の 314 bp (RB

領域) 及び 5'末端領域の 188bp (LB 領域) の欠失を除き、塩基配列は一致することが確認された (参照 14)。

ダイズ MON87708 の挿入 DNA 近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、DNA の挿入に伴う 899 bp の欠失、5'末端近傍配列の DNA 断片 (128 bp) の挿入及び 3'末端近傍配列の DNA 断片 (35 bp) の挿入を除き、塩基配列は一致していた。このことから、挿入 DNA の近傍配列はダイズゲノム由来であることが確認された (参照 14)。

DNA 挿入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 (1,274 bp)、欠失した 899 bp 及び 3'末端近傍配列 (928 bp) について、公的に利用できるデータベース (GenBank)^dを用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、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 15)。

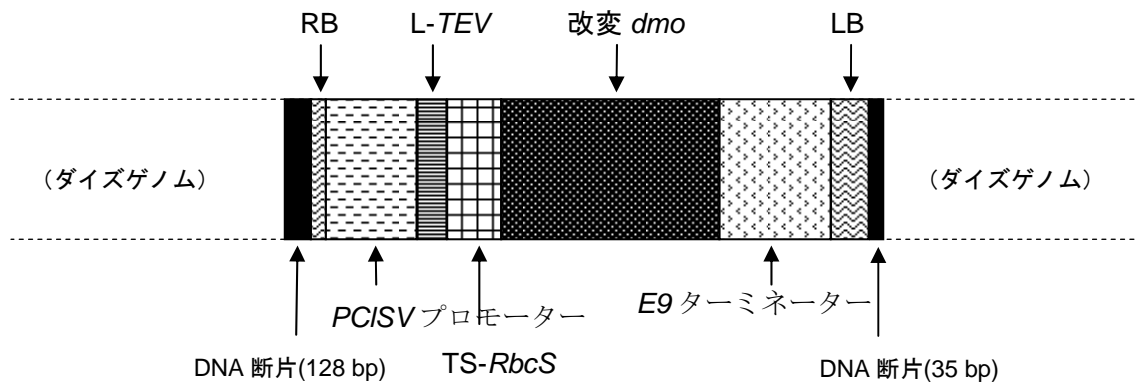


図 1 ダイズ MON87708 に挿入された DNA (模式図)

(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 MON87708 の挿入 DNA 領域 (3,003 bp) と 5'末端及び 3'末端に付加された配列 (128 bp 及び 35 bp)、5'末端近傍配列 (1,048 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,271 bp) 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、六つの読み枠において ORF 検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸以上の ORF が 20 個見いだされた。20 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、アレルゲンデータベース (AD_2010^e)、毒性タンパク質データベース (TOX_2010) 及びタンパク質

^d EST_2010, NT_2010, NR_2010: EST データベース (64,526,527 配列)、塩基配列データベース (10,498,010 配列) およびタンパク質データベース (10,272,453 配列)。

^e AD_2010: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで、1,471 配列のサブセット。

データベース (PRT_2010^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及び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_2010 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ものは見いだされなかった (参照 16,17)。

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 MON87708 の葉、根、地上部、成熟種子の改変 MON87708 DMO の発現量を ELISA 法によって分析した。その結果は表 3 のとおりである (参照 18)。

表 3 ダイズ MON87708 における改変 MON87708 DMO の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重量)

分析組織*	改変 MON87708 DMO
葉	3.1~16
根	1.9
地上部	12
種子	43

* 葉は 3 葉期~16 葉期、根及び地上部は子実肥大期、種子は成熟期の値を示した。

3. 遺伝子産物 (タンパク質) が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日に摂取するダイズ・加工品及び味噌・醤油の摂取量 82.0 g (参照 19) を全てダイズ MON87708 に置き換えて改変 MON87708 DMO の平均摂取量を計算すると、3.53 mg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 69.8 g (参照 19) に占める割合は 5.1×10^{-5} 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 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* 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 MON87708 DMO に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

^f PRT_2010: GenBank (GenBank protein database, 175.0 版、2009 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で、17,815,538 配列のサブセット。

(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

ダイズMON87708の種子から抽出した改変MON87708 DMOの人工胃液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE分析では、試験開始後30秒以内に消化されることが確認された。また、ウェスタンブロット分析でも同様に、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20）。

② 人工腸液に対する感受性

ダイズMON87708の種子から抽出した改変MON87708 DMOの人工腸液中における消化性について確認するため、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分以内に消化されることが確認された（参照20）。

③ 加熱処理に対する感受性

ダイズMON87708の種子から抽出した改変MON87708 DMOの加熱処理に対する感受性を確認するため、ELISA分析を行った。その結果、改変MON87708 DMOは、55℃以上、15分及び30分間の加熱処理で免疫反応性が失われることが確認された（参照21）。

(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MON87708 DMOと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、アレルゲンデータベース（AD_2010）を用いて相同性検索を行った結果、80以上の連続するアミノ酸配列について35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等は見いだされなかった。また、抗原決定基の有無を確認するため、AD_2010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ものは見いだされなかった（参照5）。

上記、(1)～(4)及び前項3から総合的に判断し、改変MON87708 DMO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MON87708に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3世代のダイズMON87708について改変*dmo*遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、改変*dmo*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22）。

ダイズMON87708に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世代のダイズMON87708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、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14）。

さらに、改変 MON87708 DMO の発現の安定性を確認するために、5 世代のダイズ MON87708 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 MON87708 DMO が発現していることが確認された（参照 23）。

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

DMO の構造学的解析により、ジカンバのベンゼン環構造だけでなく、カルボキシル基及びクロロ基が DMO の触媒作用に重要であることが示された（参照 24,25）。

そこで、DMO が植物の代謝経路に与える影響について、植物体中に存在する化合物のうち、ジカンバと構造が類似するメトキシ基及びフェニルカルボキシル基をもつ 5 種類の化合物が DMO により代謝されるか否かについて検討した。その結果、いずれの化合物も代謝されず、DMO は植物の代謝経路に影響を及ぼさないことが確認された（参照 26）。

なお、解析には野生型 DMO の N 末端側にヒスチジンタグが付加されたものが用いられたが、ヒスチジンタグは基質特異性に影響を及ぼさないと考えられた（参照 27）。

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 MON87708 と宿主である非組換えダイズについて、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル、ビタミン類及び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 28,29）。

（1）主要構成成分

種子及び地上部の主要構成成分（水分、タンパク質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維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）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。

（3）脂肪酸組成

種子の脂肪酸 22 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。

(4) ミネラル

種子のカルシウム、銅等の主要なミネラル 9 種類の分析を行った結果、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。

(5) ビタミン類

種子のビタミン B₁、ビタミン B₂、ビタミン B₆、ナイアシン、パントテン酸、葉酸及びビタミン E (α-トコフェロール) について分析を行った結果、対照に用いた非組換え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。

(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、トリプシンインヒビター及びイソフラボン類 (ダイゼイン、ゲニステイン及びグリシテイン) 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、2010年7月に米国農務省 (USDA) に対して無規制裁培の承認申請が行われた。また、米国食品医薬品庁 (FDA) に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2011年10月に審査が終了した。

カナダにおいては、カナダ保健省 (Health Canada) に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2012年10月に承認を得た。また、カナダ食品検査庁 (CFIA) に対して環境・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2012年10月に承認を得た。

EUにおいては、2011年1月に欧州食品安全機関 (EFSA) に対して食品・飼料及び輸入のための申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、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、2012年5月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ MON87708 の栽培方法については、生育期の雑草防除にジカンバを使用できる点を除いて、従来の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 MON87708 の種子の製法及び管理方法については、従来の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

「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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. 2006. International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org>. [Accessed March 2, 2010]
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. Behrens, M.R., Mutlu, N., Chakraborty, S., Dumitru, R., Jiang, W.Z., Lavallee, B.J., Herman, P.L., Clemente, T.E., Weeks, D.P. 2007. Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science*. 316:1185-8.
4. Chakraborty S, Behrens M, Herman PL, Arendsen AF, Hagen WR, Carlson DL, Wang XZ, Weeks DP. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys*. 437:20-8.
5. Bioinformatics Evaluation of the DMO+27 Protein in MON 87708 Utilizing the AD_2010, TOX_2010 and PRT_2010 Databases : MSL0022584 (社内報告書)
6. Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. 1996. Pages 53-79 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York
7. Maiti IB, Shepherd RJ. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in

- transgenic plants. *Biochem Biophys Res Commun.* 244:440-444.
8. Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. U.S. Patent 6,018,100.
 9. 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. *EMBO J* 1984. 3:1671-1679.
 10. Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *J. Virol.* 73:9080-9088.
 11. Fluhr R, Moses P, Morelli G, Coruzzi G, Chua NH. 1986. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *EMBO J.* 5:2063-2071.
 12. Rensing SA, Maier UG. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J Mol Evol.* 39:80-86.
 13. 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.
 14. Amended Report for MSL0022670: Molecular Analysis of Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 : MSL0023278 (社内報告書)
 15. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequence Flanking the Insertion Site in MON 87708: BLASTn and BLASTx Analyses : MSL0022793 (社内報告書)
 16. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in MON 87708: Assessment of Putative Polypeptides : MSL0022682 (社内報告書)
 17. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87708 Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Database: MSL0022678 (社内報告書)
 18. Assessment of Total DMO Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87708 Produced in United States Field Trials During 2008 : MSL0022510 (社内報告書)
 19. 健康・栄養情報研究会 編 2010 国民健康・栄養の現状 平成 19 年国民健康・栄養調査報告 第一出版
 20. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids : MSL0022502 (社内報告書)
 21. The Effect of Heat Treatment on Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme Immunodetection : MSL0023031 (社内報告書)
 22. Heritability and Stability of the *dmo* Expression Cassette in Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Across Multiple Generations (RPN-08-505) (社内報告書)
 23. Western Blot Analysis of DMO Protein in Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Leaf Across Multiple Generations Produced in the Greenhouse During

- 2007 and 2008: MSL0021459 (社内報告書)
24. D'Ordine, R.L., T. J. Rydel, M.J.Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J Mol Biol* 392:481-497
 25. Dumitru, R., W.Z.Jiang, D.P.Weeks and M.A.Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol* 392:498-510
 26. Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates : RPN-10-365 (社内報告書)
 27. Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme from MON 87708 Using *o*-Anisic Acid as a Substrate : RPN-10-499 (社内報告書)
 28. Statistical Re-analysis of Compositional Data of Soybean Forage and Seed Collected from MON 87708 Grown in the United States : RAR-10-407 (社内報告書)
 29. Analysis of Minerals and B Vitamins of Seed Collected from MON 87708 Grown in the United States during 2008 : RAR-2011-0484 (社内報告書)