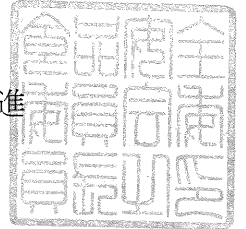




府食第741号
平成25年9月9日

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11月7日付け厚生労働省発食安1107第2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セイヨウナタネMON88302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御意見・情報の募集において、貴省に関する御意見・情報が別添の通り寄せられましたのでお伝えします。

記

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネMON88302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

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ
MON88302 系統

2013年9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.....	8
7. 近縁の植物種に関する事項.....	8
第4. ベクターに関する事項.....	8
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.....	9
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.....	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.....	15
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.....	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>.....	17

<審議の経緯>

- 2012年11月7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1107第2号）、関係書類の接受
- 2012年11月12日 第453回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2012年12月7日 第110回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2013年5月20日 第474回食品安全委員会（報告）
- 2013年5月21日から6月19日まで 国民からの御意見・情報の募集
- 2013年9月4日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2013年9月9日 第488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>

熊谷 進（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）
山添 康（委員長代理）
三森国敏（委員長代理）
石井克枝
上安平冽子
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

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 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、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入して作出されており、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できるとされている。

「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、挿入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、非組換えセイヨウナタネ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、「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 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：除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統
性質：除草剤グリホサート耐性
申請者：日本モンサント株式会社
開発者：Monsanto Company（米国）

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統」（以下「セイヨウナタネ MON88302」という。）は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（改変 *cp4 epsps* 遺伝子）を導入して作出されており、改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することで、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できるとされている。

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、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の商業品種 Ebony である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

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 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現する。

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。

2. 宿主の食経験に関する事項

セイヨウナタネは、種子中にエルカ酸及びグルコシノレートが含まれていることから、食用としては適さないと考えられていたが、品種改良により低エルカ酸及び低グルコシノレートのカノーラ品種が開発された。それ以降、セイヨウナタネから得られる油は食用として利用されており、安全な食経験がある。

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

カノーラ品種の種子の主要栄養素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 17.4～28.1%、総脂質 24.0～49.5%、灰分 4.1～5.9%、ビタミン E 71.1～108.4 mg/kg である。（参照 1,2,3,4,5）。

- (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
カノーラ品種の種子から得られた油かす中の毒性物質・栄養阻害物質はエルカ酸 0.0～2.0% (全脂肪酸中)、総グルコシノレート 6～29 $\mu\text{mol/g}$ 、フィチン酸 2.0～5.0%、シナピン 0.6～1.8%及びタンニン 1.5～3.0%である (参照 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
セイヨウナタネ MON88302 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。
- (2) 摂取 (可食) 部位
セイヨウナタネ MON88302 の摂取部位は、従来のセイヨウナタネと変わらない。
- (3) 摂取量
セイヨウナタネ MON88302 の摂取量は、従来のセイヨウナタネと変わらない。
- (4) 調理及び加工方法
セイヨウナタネ MON88302 の調理及び加工方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

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

宿主と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

セイヨウナタネ MON88302 は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の導入によって、改変 CP4 EPSPS 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、セイヨウナタネ MON88302 の安全性評価においては、既存のセイヨウナタネ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

セイヨウナタネ MON88302 は、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子が改変 CP4 EPSPS タンパク質を発現することによって、除草剤グリホサート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、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の商業品種 Ebony 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

セイヨウナタネは、アブラナ科アブラナ属の *Brassica rapa* L. と *Brassica oleracea* L. との交雑によりできた複二倍体である。原産地は北ヨーロッパと考えられており、現在では世界中に分布している。

セイヨウナタネ種子には、エルカ酸及びグルコシノレートが含まれていることから食用としては適さないと考えられていたが、低エルカ酸及び低グルコシノレートの品種が開発された。カナダでの品種改良により開発された低エルカ酸及び低グルコシノレートのセイヨウナタネが、カノーラ品種である。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

セイヨウナタネ種子の有害生理活性・栄養阻害物質は、エルカ酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン及びタンニンである（参照 2）。

エルカ酸は、動物における心臓疾患の誘引に関与するとの報告があることから、コーデックス委員会及び米国食品医薬品庁（FDA）では、セイヨウナタネ油中の全脂肪酸の 2% を超えないことと定めている（参照 6,7）。

グルコシノレートは、アブラナ属の植物に存在する硫黄と窒素を含む有機化合物であり、酵素により加水分解され甲状腺腫誘発性化合物であるイソチオシアン酸アリルとなる（参照 8）。なお、カナダ及び米国においては、カノーラ品種の油かす中のグルコシノレートの基準を最大 30 $\mu\text{mol/g}$ （対乾燥重量）としている（参照 2）。

フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄、亜鉛等の無機質とキレート結合して単胃動物に利用できない構造を形成する。

シナピンは、ナタネ中の主なフェノール類成分である。

タンニンは、鉄や亜鉛など無機質をキレート化し、これらの栄養素の吸収を妨げる。

4. アレルギー誘発性に関する事項

これまでにセイヨウナタネ種子から得られた油がアレルギーを誘発したという報告はない。

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

セイヨウナタネには、ウイルス、細菌及び糸状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

セイヨウナタネ種子から得られた油は、食用に用いられている。

7. 近縁の植物種に関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、*B. rapa* L. と *B. oleracea* L. との交雑により生じたとされており、これらの亜種には食経験のある野菜が含まれる。

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

セイヨウナタネ MON88302 の作出に使用した導入用プラスミド PV-BNHT2672 の構築にはベクターE 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耐性を付与する *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 *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 *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 *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って構築された遺伝子である。クローニングの過程で、*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。

挿入 DNA の構成要素は表 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

挿入遺伝子の塩基数、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 *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 9）。

改変 CP4 EPSPS 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、毒性タンパク質データベース（TOX_2011^a）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 PV-BNHT2672 は、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子を有するが、セイヨウナタネ MON88302 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。

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 *cp4 epsps* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ由来の *EF-1 α* 遺伝子プロモーターと Figwort mosaic virus (FMV) 由来の 35S RNA プロモーターのエンハンサー配列を結合させた *FMV/EF-1 α* プロモーターである（参照 11,12）。

^a TOX_2011:PRT_2011GenBank (GenBank protein database, 181.0 版、2010 年 12 月 18 日)に登録されているタンパク質のアミノ酸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、10,570 配列のサブセット。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーターはエンドウの *RbcS2* 遺伝子由来の *E93'* 非翻訳領域配列である (参照 13)。

(3) その他

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットには、シロイヌナズナ由来の *EF-1 α* リーダー配列及びイントロン配列 (参照 12)、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をコードする配列が挿入されている (参照 14,15)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT2672 は、中間プラスミドであるベクター A, C, D, E, F, G, H を用いて作製された。ベクター E に改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを結合させることにより、導入用プラスミド PV-BNHT2672 を構築した (参照 16)。

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-BNHT2672 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 PV-BNHT2672 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 (参照 10)。

(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

導入用プラスミド PV-BNHT2672 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 PV-BNHT2672 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 セイヨウナタネ MON88302 への挿入 DNA

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>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium 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/EF-1α</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ由来の <i>EF-1α</i> プロモーターに <i>FMV</i> 由来の 35S RNA のエンハンサー配列を結合させたプロモーター
L- <i>EF-1α</i>	<i>EF-1α</i> 遺伝子のリーダー配列
I- <i>EF-1α</i>	<i>EF-1α</i> 遺伝子のイントロン配列
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 株由来の改変 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 エンドウ由来のリブローズ 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

アグロバクテリウム法によって改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した後、グリホサートを添加した培地で選抜して再生個体が得られた。自殖により得た個体について、定量 PCR 分析によりホモ接合体を選抜した後、形態特性等を確認し、セイヨウナタネ MON88302 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

セイヨウナタネ MON88302 のゲノムに挿入された改変 *cp4 epsps* 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 *cp4 epsps* 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 17)。

導入用プラスミド PV-BNHT2672 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 17)。

セイヨウナタネ MON88302 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-BNHT2672 の T-DNA 領域と比較した結果、RB 領域の 314 bp 及び LB 領域の 169 bp 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 17)。

セイヨウナタネ MON88302 の挿入 DNA の近傍配列を解析するために、挿入 DNA の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列に対して挿入 DNA を挟むようにプライマーを設計し、PCR 分析を行い、非組換えセイヨウナタネから増幅された PCR 産物の塩基配列と比較解析を行った。その結果、29 bp の欠失、3'末端側に DNA 断片 (9 bp) の挿入、3'末端近傍配列の 1 塩基置換を除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主ゲノムの塩基配列は一致した (参照 17)。したがって、挿入 DNA の近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された。

セイヨウナタネ MON88302 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'末端上流 (826 bp)、欠失した 29 bp 及び 3'末端に付加された配列の下流領域 (947 bp) の計 1,802 bp について、EST データベース (EST_2011^b)、核酸データベース (NT_2011^c) 及びアミノ酸配列データベース (NR_2011^d) 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、挿入 DNA は二つのセイヨウナタネ内在性の既知の遺伝子の間に挿入されていることが明らかとなった (参照 18)。挿入 DNA の 3' 及び 5' 末端近傍にセリン・カルボキシペプチダーゼ様遺伝子配列及び機能未知の遺伝子配列と高い相同性を示す配列が見いだされたが、両遺伝子とも Poly-A 付加部位が導入 DNA の挿入部位の近傍に保存されていた (参照 18)。したがって、既知の内在性遺伝子のコード領域は DNA の挿入により破壊されていないと考えられた。

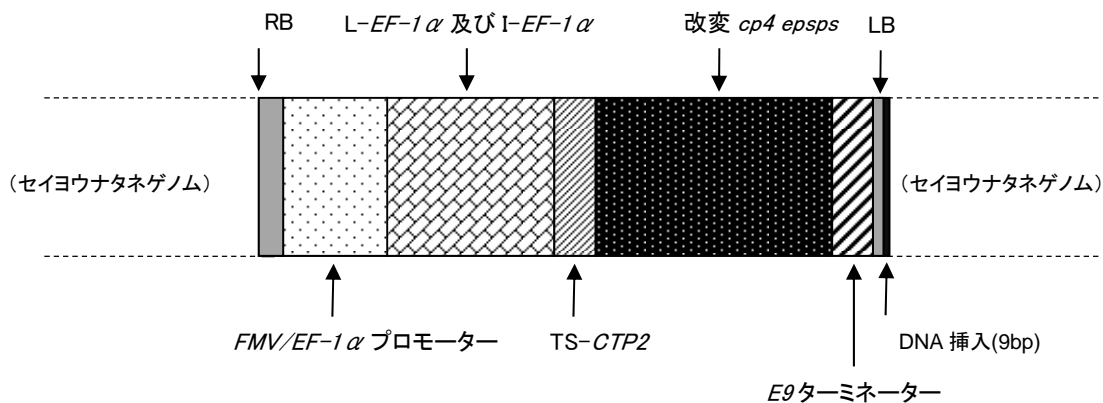


図 1 セイヨウナタネ MON88302 に挿入された DNA (模式図)

^b EST_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2011 年 2 月 18 日時点) EST 配列のデータベースで、67,857,743 配列のサブセット。

^c NT_2011 : GenBank, EMBL, DDBJ 及び PDB に登録されている (2011 年 2 月 18 日時点) 塩基配列のデータベースで、14,564,296 配列のサブセット。

^d NR_2011 : All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR 及び PRF に登録されている (2011 年 2 月 18 日時点) タンパク質のアミノ酸配列のデータベースで、12,603,350 配列のサブセット。

(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

セイヨウナタネ MON88302 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (839 bp) 及び 3'末端近傍配列 (付加配列である 9 bp を含む 907 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、六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 11 個見いだされた (参照 19)。11 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^f) 及びタンパク質データベース (PRT_2010^g) 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 19,20)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

セイヨウナタネ MON88302 の葉、根、地上部及び種子の改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。その結果は、表 2 のとおりである (参照 21)。

表 2 セイヨウナタネ MON88302 における改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重量)

分析組織*	改変 CP4 EPSPS タンパク質**
葉	10~85
根	7.0~25
地上部	14~28
種子	21~43

* 葉は 3 葉期~開花期、根は主茎伸長開始期~莢の成熟期、地上部は主茎伸長開始期、種子は収穫期の値を示した。

** 検出限界は、それぞれ 0.1 $\mu\text{g/g}$ (葉)、0.6 $\mu\text{g/g}$ (根)、0.3 $\mu\text{g/g}$ (地上部)、0.8 $\mu\text{g/g}$ (種子) である。

^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。

^f 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、集めた 8,448 配列のサブセット。

^g 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のアミノ酸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）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

セイヨウナタネから生産される主要食品は、精製された油であり、そのタンパク質含有量は検出限界以下であることが示されている（参照 22）。そのため、セイヨウナタネ MON88302 由来の改変 CP4 EPSPS タンパク質が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるとは考えにくい。

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 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株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 CP4 EPSPS 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 CP4 EPSPS 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 15 秒以内に消化されることが確認された。ウェスタンブロット分析においても、試験開始後 15 秒以内に消化されることが確認された（参照 23）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS タンパク質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 10 分後には 50%以上が消化され、100 分で完全に消化されることが確認された（参照 24）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 CP4 EPSPS 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 CP4 EPSPS タンパク質は、75°C、15 分間及び 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 25）。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項

改変 CP4 EPSPS タンパク質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 (AD_2011^h) 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 (参照 10)。

また、抗原決定基の有無を確認するために、AD_2011 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 10)。

上記 (1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、改変 CP4 EPSPS タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

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、4 世代のセイヨウナタネ MON88302 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、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 17)。

改変 CP4 EPSPS タンパク質の発現の安定性を確認するために、4 世代のセイヨウナタネ MON88302 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 CP4 EPSPS タンパク質が発現していることが確認された (参照 26)。

さらに、セイヨウナタネ MON88302 に挿入された遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のセイヨウナタネ MON88302 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 *cp4 epsps* 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 27)。

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 CP4 EPSPS タンパク質は、シキミ酸合成経路 (芳香族アミノ酸合成経路) の律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、改変 CP4 EPSPS タンパク質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (S3P) と特異的に反応することが知られている。したがって、改変 CP4 EPSPS タンパク質の作用機作は独立しており、植物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

米国及びカナダのほ場で栽培されたセイヨウナタネ MON88302 及び宿主である非組換えセイヨウナタネの種子について、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ

^h AD_2011: Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP_2011) (<http://www.allergenonline.com>) から得られた配列をもとに作成されたデータベースで 1,491 配列のサブセット。

酸組成、ミネラル類、ビタミン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並びに総食物繊維について分析を行った結果、セイヨウナタネ MON88302 と対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差が認められなかったか、認められた場合でも従来品種の分析結果に基づく許容区間内であった。

(2) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 30 種類について分析を行った結果、19 種類は定量限界以下であったため、統計解析から除外した。統計解析を行った脂肪酸のうち、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸及びベヘン酸は、対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差が認められたが、いずれも従来品種の分析結果に基づく許容区間内であった。

(3) 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、対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ミネラル類

種子のミネラル類（カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、亜鉛）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(5) ビタミン

種子のビタミン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セイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(6) 有害生理活性物質

種子の栄養阻害物質及び有害生理活性物質 6 種類(フィチン酸、シナピン酸、総タンニン、アルキルグルコシノレート、イドリルグルコシノレート、総グルコシノレート)について分析を行った結果、アルキルグルコシノレートを除き、対照に用いた非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった。セイヨウナタネ MON88302 種子中のアルキルグルコシノレート含量は非組換えセイヨウナタネと比較して有意に低かったが、従来品種の分析結果に基づく許容区間内であった。

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、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、2012年4月に承認を得た。また、2011年6月に米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請が行われた。

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6月に承認を得た。また、カナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料・環境の安全性審査の申請が行われ、2012年6月に承認を得た。

また、欧州においては、2011年8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、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、2013年2月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

セイヨウナタネ MON88302 の栽培方法は、生育期に除草剤グリホサートを使用できることを除いて、従来のセイヨウナタネと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

セイヨウナタネ MON88302 の種子の製法及び管理方法は、従来のセイヨウナタネと同じである。

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

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 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 Dairy One Forage Lab. 2010. Dairy One Forage Lab Database. Dairy One, Ithaca, New York. <http://www.dairyone.com> [Accessed July 12, 2010].
- 2 OECD. 2001. Consensus document on key nutrients and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola). ENV/JM/MONO(2001)13. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 3 Pritchard, F.M., Eagles, R.M. Norton, P.A. Salisbury and M. Nicolas. 2000. Environmental effects on seed composition of Victorian canola. Australian

- Journal of Experimental Agriculture 40: 679-685.
- 4 Barthet, V.J. and J.K. Daun. 2005. Effect of sprouting on the quality and composition of canola seed and oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82: 511-517.
 - 5 Marwede, V., A. Schierholt, C. Mölers and H.C. Becker. 2004. Genotype X environment interactions and heritability of tocopherol contents in canola. *Crop Science* 44: 728-731.
 - 6 Codex Alimentarius. 2005. Codex standard for named vegetable oils. Pages 1-13 in *Codex-STAN 210*. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
 - 7 U.S. FDA. 1988. Rapeseed oil. 21 CFR 184.1555. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C
 - 8 Bell, J.M. 1984. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: A review. *Journal of Animal Science* 58: 996-1010.
 - 9 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delanny, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
 - 10 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2011, TOX_2011, and PRT_2011 Databases (RAR-2011-0083) (社内報告書)
 - 11 Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
 - 12 Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and Genetics* 219: 106-112.
 - 13 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
 - 14 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
 - 15 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
 - 16 Information on Intermediate Plasmid (Vector E) (社内報告書)
 - 17 Molecular Analysis of Glyphosate-Tolerant Roundup Ready® 2(RR2) Canola MON88302 (MSL0022523) (社内報告書)

- 18 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON88302: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0023331) (社内報告書)
- 19 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON88302 : Assessment of Putative Polypeptides (MSL0023088) (社内報告書)
- 20 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON88302 Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases (MSL0023155) (社内報告書)
- 21 Assessment of CP4EPSPS Protein Levels in Canola Tissues Collected from MON88302 Produced in United States and Canadian Field Trials during 2009 (MSL0022681) (社内報告書)
- 22 Martín-Hernández, C., S. Bénet and L. Obert. 2008. Determination of proteins in refined and nonrefined oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:4348-4351.
- 23 Assessment of the *in vitro* digestibility of purified *E. coli*-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL17566) (社内報告書)
- 24 Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSPS synthase (MSL12949) (社内報告書)
- 25 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764) (社内報告書)
- 26 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Canola Leaf Tissue of MON88302 Across Multiple Generations by Western Blot Analysis Produced in U.S. Greenhouse during 2009-2010 (MSL0022592) (社内報告書)
- 27 Segregation of the cp4 epsps Coding Sequence in MON88302 in the F2, F3 and F4 Populations (RPN-10-085) (社内報告書)
- 28 Amended Report for MSL0022807: Compositional Analyses of Canola Seed Collected from Glyphosate Treated MON88302 Grown in the United States and Canada during the 2009 Growing Season (MSL0023615) (社内報告書)
- 29 Analysis of Tannins in Canola Seed Collected from Glyphosate-Treated MON88302 Grown in the United States and Canada during the 2009 Growing Season (RAR-2011-0237) (社内報告書)