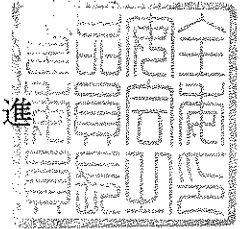




府食第880号
平成26年11月18日

厚生労働大臣
塩崎 恭久 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25年10月16日付け厚生労働省発食安1016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「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ(DP-073496-4)」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セイヨウナタネ(DP-073496-4)」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。

なお、*N*-アセチルアミノ酸の含有量が有意に増加していることから、今後、セイヨウナタネ DP-073496-4 を用いた掛け合わせ品種の安全性評価の場合には、詳細な審議が必要と考えられる。

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
DP-073496-4

2014年11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.....	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.....	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
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.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	18
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>.....	19

<審議の経緯>

- 2013年10月16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1016第1号）、関係書類の接受
- 2013年10月21日 第491回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年11月5日 第120回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年7月18日 第129回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年9月30日 第531回食品安全委員会（報告）
- 2014年10月1日から10月30日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2014年11月10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
- 2014年11月18日 第538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>

2014年3月31日まで	2014年4月1日から
澤田純一（座長）	澤田純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	小関良宏（座長代理*）
小関良宏 手島玲子	宇理須厚雄 手島玲子
宇理須厚雄 中島春紫	岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫	橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信	児玉浩明 和久井信
近藤一成	近藤一成

*2014年4月24日から

要 約

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ DP-073496-4」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、*Bacillus licheniformis* に由来する改変 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を導入して作出されており、改変 *N*-アセチルトランスフェラーゼを発現することで、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。

「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 DP-073496-4」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 DP-073496-4

性質：除草剤グリホサート耐性

申請者：デュポン株式会社

開発者：Pioneer Hi-Bred International, Inc. (米国)

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ DP-073496-4」（以下「セイヨウナタネ DP-073496-4」という。）は、*Bacillus licheniformis* に由来する改変 *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*gat4621* 遺伝子) を導入して作出されており、改変 *N*-アセチルトランスフェラーゼ (GAT4621 タンパク質) が発現することで、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、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) のカノーラ品種 1822 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

gat4621 遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

gat4621 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する GAT4621 タンパク質を発現する。*gat4621* 遺伝子は、パーティクルガン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、種子から得られた油が食品として利用されてきた経験がある。

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

セイヨウナタネのカノーラ品種の種子中の主要栄養組成（対乾燥重量）はタンパク質 23.4～31.9%、脂質 37.4～51.5%、粗繊維 24.3～35.1%、灰分 2.98～5.10%及び炭水化物 16.9～29.1%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

セイヨウナタネのカノーラ品種の種子中のエルカ酸及びグルコシノレートの含有量は、それぞれ0%（総脂肪酸）及び2.61～10.5 μmol/g（対乾燥重量）である。有害生理活性物質（対乾燥重量）は、可溶性タンニン 0.0768～0.180%、不溶性タンニン 0.155～0.824%、フィチン酸 1.04～2.86%及びシナピン 0.763～1.12%である（参照 1）。

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 DP-073496-4 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 DP-073496-4 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 DP-073496-4 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 DP-073496-4 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 DP-073496-4 は、*gat4621* 遺伝子の導入によって GAT4621 タンパク質を発現すること、*N*-アセチルアミノ酸の含有量が有意に増加してい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 DP-073496-4 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 DP-073496-4 は、ゲノムに導入された *gat4621* 遺伝子が、GAT4621 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.) のカノーラ品種 1822 系統である。

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 (*B. napus*) は、*Brassica oleracea* と *Brassica rapa* との交雑に由来すると考えられている。従来のセイヨウナタネには、ヒトや動物に有害なエルカ酸とグルコシノレートが含まれるため、これらの含量の低い品種の育種が行われた。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（参照 2）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

エルカ酸含量の多い油を多量に摂取すると心機能障害を起こす可能性があり、カノーラ品種の種子から得られる油に含まれるエルカ酸は 2%未満とされている（参照 2）。

グルコシノレートは含硫配糖体であり甲状腺肥大作用があり、油かす中のグルコシノレート含有量は、30 $\mu\text{mol/g}$ 未満（対乾燥重量）とされている（参照 2）。

その他に栄養阻害物質・有害生理活性物質としては、タンニン、フィチン酸及びシナピンが含まれる。タンニンは、タンパク質や炭水化物と結合して消化能力を低下させる。フィチン酸は、動物のミネラル吸収量を減少させる。シナピンは、辛味及び苦味を与えるアルカロイドである（参照 2、3）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

セイヨウナタネは、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

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が食用に用いられる。光過敏性皮膚炎を引き起こす原因となり得るクロロフィル等は、油の精製過程で除去される。

7. 近縁の植物種に関する事項

アブラナ属植物 (*Brassica*) の種子にエルカ酸が含まれ、種子及び茎葉にグルコシノレートが含まれ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

セイヨウナタネ DP-073496-4 の作出に用いられた直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の構築には、プラスミド pUC19 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 pUC19 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 pUC19 の制限酵素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 pUC19 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 pUC19 には、アンピシリンに対して耐性を付与する *bla* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 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

gat4621 遺伝子の供与体は、*B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株である。

(2) 安全性に関する事項

gat4621 遺伝子の供与体である *B. licheniformis* は、 α -アミラーゼなどの食品製造用酵素の生産に広く利用されている。

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

gat4621 遺伝子は、除草剤グリホサートに対して *N*-アセチル化活性を持つ *B. licheniformis* の ST401 株、B6 株及び DS3 株を選抜し、それぞれのゲノム DNA からクローニングされたグリホサート *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を DNA 消化酵素で処理し、PCR 法によりランダムに再構築することによって、除草剤グリホサートに対する *N*-アセチル化活性が高まるように作製された（参照 4、5）。

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

gat4621 遺伝子が発現する GAT4621 タンパク質によって、除草剤グリホサートを *N*-アセチルグリホサートに変化させ、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 活性を阻害する機能を失わせる。その結果、セイヨウナタネ DP-073496-4 は、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することが可能になるとされている。

GAT4621 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、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 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 6）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A に抗生物質耐性遺伝子は含まれていない。

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

gat4621 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のポリユビキチン (*UBQ10*) 遺伝子のプロモーターであり、5' 非翻訳領域及びイントロンを含む（参照 7）。

(2) ターミネーターに関する事項

gat4621 遺伝子のターミネーターは、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子の *pinII* ターミネーターである（参照 8、9）。

^a Release 188.0、2012 年 2 月 15 日公表

(3) その他

その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は組み込まれていない。

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 pUC19 を用いて、*gat4621* 遺伝子及び *pinII* ターミネーターを含む断片並びに *bla* 遺伝子及び *UBQ10* プロモーターを含む断片を作成し、これらを結合させて、導入用プラスミド PHP28181 を作製した。これを制限酵素で処理することによって、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A が得られた。

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

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 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

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 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) が含まれていないことを確認するために、EMBOSS tool GETORF を用いて検索した結果、37 個の ORF が検出されたが、いずれの ORF も既知アレルゲン及び既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった (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

意図する挿入領域は、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の全領域である。

(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

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A は、電気泳動によって単離し、精製されている。

表1 セイヨウナタネ DP-073496-4 への挿入 DNA

構成 DNA	機能及び由来
<i>UBQ10</i> プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のポリユビキチン (<i>UBQ10</i>) 遺伝子のプロモーター。5' 非翻訳領域及びイントロンを含む。
<i>gat4621</i>	<i>B. licheniformis</i> 由来の GAT4621 タンパク質をコードする遺伝子

<i>pinII</i> ターミナー	ターミネーター領域
ミナー	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビター II 遺伝子のターミネーター

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

gat4621 遺伝子を含む直鎖状 DNA 断片 PHP28181A をパーティクルガン法によって宿主に導入した後、グリホサートを添加した培地で選抜し、再生個体が得られた。得られた再生個体について、挿入遺伝子の確認を行った後、自殖及び既存の優良品種との交配を行うことによってセイヨウナタネ DP-073496-4 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 DP-073496-4 のゲノムに挿入された *gat4621* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、1 コピー挿入されていることが確認された (参照 11、12)。

セイヨウナタネ DP-073496-4 のゲノム中にプラスミド PHP28181 の外骨格領域が挿入されていないことを確認するため、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 11)。

セイヨウナタネ DP-073496-4 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A と塩基配列を比較した結果、5'末端領域の 3 bp の欠失を除き、塩基配列は一致していることが確認された (参照 13)。

セイヨウナタネ DP-073496-4 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、挿入 DNA の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列を非組換えセイヨウナタネの配列と比較した。その結果、塩基配列は、セイヨウナタネ DP-073496-4 と非組換えセイヨウナタネとの間で一致し、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 (参照 13)。

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かどうかを確認するために、5'末端近傍配列 (2,003 bp) 及び 3'末端近傍配列 (2,038 bp) について、データベース^bを用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、3'末端近傍配列の blastn 検索では、アブラナ属及びダイコン等の EST 配列との相同性が認められたが、blastx 検索においては相同性を有する配列は見いだされなかったことから、3'末端近傍配列にタンパク質を発現する配列はないと考えられた。また、5'末端近傍配列に、トリオースリン酸/リン酸輸送体 (TPT) タンパク質をコードする *tpt* 遺伝子の配列との相同性が認められた。

^b Genebank の Genome Survey Sequence サブセットにおけるゲノム配列、Genebank Release 188 の dbEST、社内データセット、NCBI Entrez Nucleotide データセット及び NCBI タンパク質データセット。

挿入 DNA 位置とセイヨウナタネ DP-073496-4 の内在性 *tpt* 遺伝子 (PG-*tpt* 遺伝子) の関連性を調べた結果、PG-*tpt* 遺伝子の 12 個存在するエクソンの 4 番目のエクソン領域の後に DNA 断片が挿入されていた。3' 末端近傍配列には PG-*tpt* 遺伝子との相同性がみられず、宿主ゲノムの欠失が生じたと考えられたが、現時点ではセイヨウナタネの全ゲノムが解析されていないことから、ゲノム上の位置の特定には至らなかった。また、PG-*tpt* 遺伝子から挿入 DNA の接合部を跨いで転写されているかどうかをノーザンブロット分析により調べた結果、その可能性は低いと考えられた。

なお、宿主の遺伝子配列に変化が生じ PG-*tpt* 遺伝子の発現量が低下しても同様の機能を有する遺伝子によりその機能が補完される可能性があることから、非組換えセイヨウナタネにおける *tpt* 遺伝子のコピー数をサザンブロット分析により調査した。その結果、非組換えセイヨウナタネゲノム中に PG-*tpt* 遺伝子と同様の機能を有すると考えられる *tpt* 遺伝子が複数存在すると考えられた。

セイヨウナタネ DP-073496-4 における *tpt* 遺伝子の発現をホモ世代の未熟種子及び葉を用いノーザンブロット法により分析した結果、セイヨウナタネ DP-073496-4 及び非組換えセイヨウナタネともに葉において、*tpt* 遺伝子の発現が確認されたが、未熟種子ではいずれも発現は認められなかった。そこで、定量 PCR 法を用いて、ホモ世代の葉における PG-*tpt* 遺伝子の発現量及び PG-*tpt* 遺伝子を含む *tpt* 遺伝子の総発現量を測定した結果、セイヨウナタネ DP-073496-4 の PG-*tpt* 遺伝子の発現量は非組換えセイヨウナタネの 7 分の 1 に、*tpt* 遺伝子の総発現量は 2 分の 1 に低下していた (参照 13)。TPT タンパク質は光合成により固定されたトリオースリン酸を葉緑体から細胞質に輸送しショ糖合成に供する機能を有することから、*tpt* 遺伝子の発現量の低下による炭素関連代謝物への影響を調べるために、商品化系統のヘテロ世代を用い種子収量、種子中のショ糖、脂質、粗繊維及び炭水化物の含有量を測定した。その結果、セイヨウナタネ DP-073496-4 及び非組換えセイヨウナタネの間において統計学的有意差は認められなかった (参照 1、14、15)。

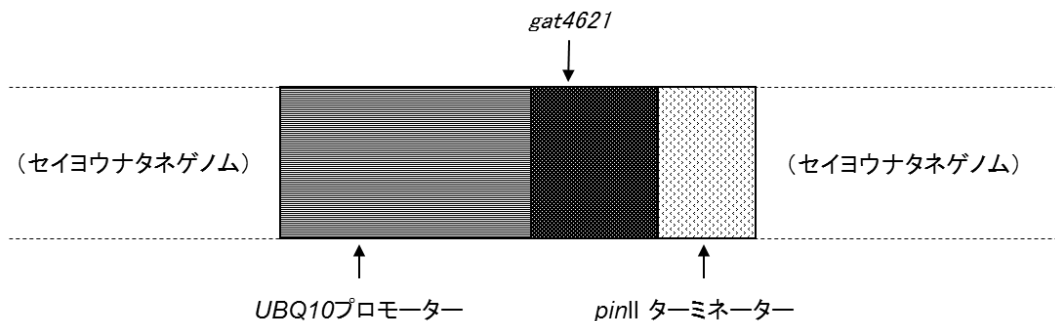


図1 セイヨウナタネ DP-073496-4 の挿入 DNA (模式図)

(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

セイヨウナタネ DP-073496-4 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列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、EMBOSS tool GETORF を用いて、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で終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が、3 個見いだされた (参照 13)。

3 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、NCBI タンパク質データセット^c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 13)。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^d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。さらに、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^dを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致する配列は見いだされなかった (参照 13)。

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 DP-073496-4 の葉、茎、根、花粉及び種子における GAT4621 タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 2 のとおりである (参照 16)。

表 2 セイヨウナタネ DP-073496-4 における GAT4621 タンパク質の発現量
(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織*	GAT4621 タンパク質**
地上部植物体	3.1~10
根	3.9~13
種子	4.8~8.4

*地上部植物体は、5 葉期、3 節間新長期及び開花期、根は開花期、種子は枯死期の値を示す。

**定量限界値は地上部植物体 0.29 ng/mg、根及び種子 0.22 ng/mg

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

セイヨウナタネは、主に精製された菜種油として食用に供される。精製された菜種油中のタンパク質は検出限界 (0.2 mg/kg) 未満であることが報告されている (参照 17)。日本人一人一日当たりの油脂類平均摂取量 (10.1 g) をすべて菜種油に置き換え、GAT4621 タンパク質が精製された菜種油中のタンパク質の検

^c Release 188、2012 年 2 月 15 日公表

^d FARRP12 データベース、保持配列数 1,603、2012 年 2 月公表

出限界値 (0.2 mg/kg) 含まれると仮定して計算すると、GAT4621 タンパク質の一人一日当たりの摂取量は 0.002 mg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 67.3 g (参照 18) に占める割合は、 3×10^{-8} 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

gat4621 遺伝子の供与体である *B. licheniformis* がアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(2) 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

GAT4621 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 GAT4621 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 分析では試験開始後 30 秒以内に GAT4621 タンパク質の約 17 kDa のバンドは検出されなくなったが、60 分後まで GAT4621 タンパク質由来の約 3 kDa のバンドが認められた。ウェスタンブロット分析では、試験開始後 30 秒以内に、約 17 kDa 及び約 3 kDa のいずれのバンドも検出されなくなった (参照 19)。

SDS-PAGE 分析で認められた約 3 kDa のバンドの消化性について確認するため、人工胃液で 30 分処理後、人工腸液で処理をしたところ、約 3 kDa のバンドは人工腸液処理開始後 30 秒以内に検出されなくなり、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

E. coli で発現させた GAT4621 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、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 2 分以内に消化されること、ウェスタンブロット分析においては試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された (参照 21)。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた GAT4621 タンパク質の加熱による酵素活性の変化を分析した。その結果、GAT4621 タンパク質の酵素活性は、46~50°C の間で約 50% に低下し、53°C、15 分間の加熱処理で 10% 未満に低下することが確認された (参照 22)。

また、100°C、30 分間の加熱処理後のウェスタンブロット分析において、

熱処理に対して不安定であることが確認された（参照 23）。

- (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

GAT4621 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、アレルゲンデータベース^d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 24）。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致する配列は見いだされなかった（参照 24）。

上記、(1)～(4)及び前項 3 から総合的に判断し、GAT4621 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

セイヨウナタネ DP-073496-4 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、4 世代のセイヨウナタネ DP-073496-4 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 11）。

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

GAT4621 タンパク質は、一般的にタンパク質の N 末端アミノ酸、遊離アミノ酸、ヒストンのアミノ酸側鎖及び一部の抗生物質などをアセチル化することが知られている *N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。

GAT4621 タンパク質の基質となり得る化合物を推定するにあたり、GAT4618 タンパク質を用いた解析の結果を参考にした。GAT4618 タンパク質は、GAT4621 タンパク質と同様に野生型 GAT タンパク質を改変したものであり、GAT4621 タンパク質と N 末端から 2 番目のアミノ酸が異なる以外は、活性中心として寄与する 4 つのアミノ酸残基も含めて一致している（参照 25）。GAT4618 タンパク質は、除草剤グリホサート以外に一部の親水性アミノ酸のみに低い触媒活性を示し、それ以外のアミノ酸、ヒストン等は基質とならなかった（参照 5）。

更に、GAT4621 タンパク質を用いて、基質となる可能性のある化合物（農薬 20 種類、抗生物質 10 種類、アミノ酸 21 種類）に対する触媒活性の測定を行った結果、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、セリン及びグリシンの 5 種類のアミノ酸について触媒活性が認められたが、それら以外の化合物について反応性は認められなかった。5 種類のアミノ酸の中で高い触媒活性が認められたアスパラギン酸及びグルタミン酸でもグリホサートに対する活性の 3%程度であった（参照 26）。

上記 5 種のアミノ酸に対して触媒活性が認められたことから、セイヨウナタネ DP-073496-4 種子中及び地上部植物体の *N*-アセチルアミノ酸量を分析した結果、*N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルトレオニンの 3 種類に加え、種子中では *N*-アセチルセリン、地上部植物体では *N*-アセチルグリシンのそれぞれ 4 種類が有意に増加していた（参照 28、29、30、31）。

N-アセチルアミノ酸の増加によるアミノ酸及び遊離アミノ酸組成への影響を調べるため、セイヨウナタネ DP-073496-4 種子中のアミノ酸及び遊離アミノ酸含有量を測定した結果、対照に用いた非組換えセイヨウナタネとの間に有意差は認められないか、有意差が認められた場合であっても非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった（参照 1、27）。以上のことから、GAT4621 タンパク質が宿主のアミノ酸組成に影響を及ぼしていないと考えられた。

なお、*N*-アセチルアミノ酸の含有量が有意に増加していることから、今後、セイヨウナタネ DP-073496-4 を用いた掛け合わせ品種の安全性評価の場合には、詳細な審議が必要と考えられる。

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 DP-073496-4 及び非組換えセイヨウナタネについて、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、遊離アミノ酸組成、*N*-アセチルアミノ酸、ミネラル類、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が行われた（参照 1、27、28、29）。

(1) 主要構成成分

タンパク質、脂質、灰分、炭水化物及び粗繊維の分析を行った結果、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。

(2) 脂肪酸組成

脂肪酸（30 種類）の分析を行った結果、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非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

アミノ酸（18 種類）及び遊離アミノ酸（26 種類）の分析を行った結果、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いか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった。

GAT4621 タンパク質が、5 種類の遊離アミノ酸（*L*-アスパラギン酸、*L*-

グルタミン酸、L-セリン、L-トレオニン及びL-グリシン)に触媒活性を示したことから、セイヨウナタネ DP-073496-4 の種子及び地上部植物体の 5 種類の *N*-アセチルアミノ酸 (*N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルトレオニン、*N*-アセチルセリン及び *N*-アセチルグリシン)を分析した。

その結果、種子中の *N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルトレオニン及び *N*-アセチルセリンの 4 種類が非組換えセイヨウナタネの分析値と比較して有意に増加していた。*N*-アセチルセリン及び *N*-アセチルトレオニンの含有量は非遺伝子組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく変動の範囲内であったが、*N*-アセチルアスパラギン酸及び *N*-アセチルグルタミン酸は変動の範囲を超えていた(参照 28、29)。また、地上部植物体においても *N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルトレオニン及び *N*-アセチルグリシンの 4 種類が非組換えセイヨウナタネの分析値と比較して有意に増加していた(参照 30、31)。

また、セイヨウナタネ DP-073496-4 の種子から得られた精製油について、5 種類の *N*-アセチルアミノ酸 (*N*-アセチルアスパラギン酸、*N*-アセチルグルタミン酸、*N*-アセチルトレオニン、*N*-アセチルセリン及び *N*-アセチルグリシン)を分析した結果、いずれも定量限界値未満であった(参照 32、33)。

地上部植物体においても *N*-アセチルアミノ酸が有意に増加していたことから、地上部植物体が食された場合を想定し、なばなを含む「その他の緑黄色野菜」の日本人一人一日当たりの摂取量を全てセイヨウナタネ DP-073496-4 に置き換えた場合、地上部植物体中で最も含有量の多かった *N*-アセチルアスパラギン酸の推定摂取量は、一人一日当たり 30.6 mg となる。ラットを用いた混餌投与による 90 日間反復投与毒性試験での *N*-アセチルアスパラギン酸の NOAEL (無毒性量)は、雄 451.6 mg/kg 体重/日、雌 490.8 mg /kg 体重/日であった(参照 34)。

以上のことから、*N*-アセチルアミノ酸の有意な増加に関し、ヒトの健康を損なうおそれは極めて低いと考えられた。

(4) ミネラル類

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セイヨウナタネ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非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 11 種類の分析を行った結果、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いか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった。

(6) 有害生理活性物質

グルコシノレート類、タンニン、フィチン酸、シナピン及びステロール類の分析を行った結果、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いか、統計学的有意差が認められた場合であっても非組換えセイヨウナタネの分析結果に基づく許容値の範囲内であった。

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、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5月に安全性が確認された。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、2013年7月に承認された。

カナダにおいては、カナダ保健省（HC）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）に対して飼料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。

EUにおいては、2012年5月に欧州食品安全機関（EFSA）に対して食品・飼料としての輸入のための申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

セイヨウナタネ DP-073496-4 の栽培方法は、雑草防除に除草剤グリホサートが散布可能である点を除き、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 DP-073496-4 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までの事項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 DP-073496-4」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。

なお、*N*-アセチルアミノ酸の含有量が有意に増加していることから、今後、セイヨウナタネ DP-073496-4 を用いた掛け合わせ品種の安全性評価の場合には、詳細な審議が必要と考えられる。

<参照>

1. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (REPORT NUMBER: PHI-2009-039/700)
2. OECD. (2011). Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No. 24.
3. OGTR. (2008). Office of the gene technology regulator (OGTR), Department of health and ageing, Australian government. The Biology of *Brassica napus* L. (canola). pp.2-3, 21-23.
4. Castle, L.A., Siehl, D.L., Gorton, R., Patten, P.A., Chen, Y.H., Sean Bertain, S., Cho, H.-J., Duck, N., Wong, J., Donglong Liu, D. and Lassner, M.W. (2004). Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science*. 304: 1151-1154.
5. Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H. Bertain, S., Cho, H.-J., Keenan, R., Liu, D. and Lassner, M.W. (2005). Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Management Science*. 61: 235-240.
6. Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the GAT4621 Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets. (社内報告書)
7. Norris, S.R., Meyer, S.E. and Callis, J. (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 21: 895-906.
8. Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14: 5641-5650.
9. An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *The Plant Cell*. 1: 115-122.
10. Reading Frame Analysis of the PHP28181A Transformation Fragment. (社内報告書)
11. Characterization of DP-Ø73496-4 Canola: Insertion Integrity, Stability, Copy Number, and Backbone Analysis. (社内報告書)
12. Characterization of DP-Ø73496-4 Canola: Insertion Integrity and Copy Number. (社内報告書)
13. Summary Report: Molecular Characterization of PHP28181A Insertion in Canola Event DP-Ø73496-4. (社内報告書)
14. Agronomic Characteristics and Yield Evaluation of a Canola Line Containing

- Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
15. Concentration Determination of Sucrose in Seed of a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4 Using HPLC/RI. (社内報告書)
 16. Quantification of GAT4621 Protein in Tissues of Herbicide-Treated Canola Lines Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
 17. Martín-Hernández, C., Bénet, S. and Obert, L. (2008). Determination of proteins in refined and nonrefined oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56: 4348-4351.
 18. 厚生労働省. (2012). 平成22年国民健康・栄養調査結果の要.pp.62-63,72-73.
 19. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of Glyphosate N-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621) Using Western Blot Analysis. (社内報告書)
 20. Characterization of GAT4621 Following *In Vitro* Pepsin and Sequential Pancreatin Digestion Using SDS-PAGE Analysis. (社内報告書)
 21. Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of Glyphosate N-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621). (社内報告書)
 22. Characterization of the Thermal Stability of Glyphosate Acetyltransferase Enzyme Activity: GAT4621. (社内報告書)
 23. Characterization of the Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the Glyphosate N-acetyltransferase 4621 (GAT4621) Protein using Western Blot Analysis. (社内報告書)
 24. Comparison of the Amino Acid Sequence Identity Between the GAT4621 Protein and Known Protein Allergens. (社内報告書)
 25. Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R. and Keenan, R.J. (2007). The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 11446-11455.
 26. Characterization of Substrate Specificity of a Microbial Acetyltransferase Optimized for Activity with Glyphosate: GAT4621. (社内報告書)
 27. Analysis of Free Amino Acid Composition in Seed from an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
 28. N-Acetylaspartate and N-Acetylglutamate Concentrations in Seed of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
 29. N-Acetylglycine, N-Acetyls erine, and N-Acetylthreonine Concentrations in Seed of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
 30. Concentration of N-Acetylaspartate and N-Acetylglutamate in Whole Plant Tissues Derived from a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4. (社内報告書)

報告書)

31. Concentration of N-Acetylglycine, N-Acetylserine, and N-Acetylthreonine in Whole Plant Tissues Derived from a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4. (社内報告書)
32. Concentration of N-Acetylaspartate and N-Acetylglutamate in Processed Products from Seed of a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
33. Concentration of N-Acetylglycine, N-Acetylserine, and N-Acetylthreonine in Processed Products from Seed of a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites. (社内報告書)
34. Karaman, S., Barnett, J. Jr., Sykes, G. P. and Delaney, B. (2011). Subchronic oral toxicity assessment of *N*-acetyl-L-aspartic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 49: 155-165.