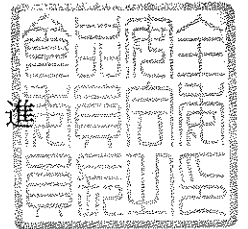




府食第908号
平成26年11月25日

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26年8月8日付け厚生労働省発食安0808第1号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた食品「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ81419系統」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ81419系統」については、「遺伝子組換え食品(種子植物)の安全性評価基準」(平成16年1月29日食品安全委員会決定)に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネー
ト耐性ダイズ 81419 系統

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	6
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	7
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	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	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	12

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	15
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>	19

<審議の経緯>

- 2014年8月8日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安0808第1号）、関係書類の接受
- 2014年8月19日 第526回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2014年9月5日 第130回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年10月14日 第533回食品安全委員会（報告）
- 2014年10月15日から11月13日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2014年11月17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25日 第539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
上安平浏子
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）
小関良宏（座長代理）
宇理須厚雄 手島玲子
岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信
近藤一成

要 約

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 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、*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子並びに *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry1F* タンパク質及び改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現することでチョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。また、選抜マーカーとして利用するために、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *pat* 遺伝子）が導入されており、PAT タンパク質を発現することで除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

「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「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統
性質：チョウ目害虫抵抗性、除草剤グルホシネート耐性
申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者：Dow AgroSciences LLC（米国）

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統」（以下「ダイズ 81419」という。）は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子並びに *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子を導入して作出されており、改変 *Cry1F* タンパク質及び改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現することでチョウ目害虫の影響を受けずに生育できるとされている。また、選抜マーカーとして利用するために、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *pat* 遺伝子）が導入されており、*PAT* タンパク質を発現することで除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

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 *Maverick* である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *cry1F* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株である。改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株である。改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*S. viridochromogenes* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子は、チョウ目害虫に対して殺虫活性を示す改変 *Cry1F* タンパク質及び改変 *Cry1Ac* タンパク質を発現する。また、改変 *pat* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する *PAT* タンパク質を発現し、形質転換体を選択するためのマーカーとして利用された。

改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 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

ダイズは世界的に食用油と家畜飼料として用いられている。アジアでは古くから、食品素材として、豆腐、味噌等に利用されている。

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素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 33.2～46.2%、脂質 8.1～27.4%、灰分 3.9～7.0%、炭水化物 27.5～50.2%、酸性デタージェント繊維 7.8～18.6%及び中性デタージェント繊維 8.5～21.3%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 19.6～118.7 TIU^a/mg、レクチン 0.11～9.4 HU^b/mg、スタキオース 0.6～5.1%、ラフィノース 0.1～1.6%、フィチン酸 0.6～2.5%、イソフラボン類（ダイゼイン 0.06～2.57 mg/g、ゲニステイン 0.14～2.84 mg/g 及びグリシテイン 0.02～0.50 mg/g）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

ダイズ 81419 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 81419 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 81419 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 81419 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

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

^a TIU : trypsin inhibitor unit

^b HU : hemagglutinating unit

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 81419 は、改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の導入によって、改変 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT 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、ダイズ 81419 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。

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 81419 は、導入された改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子が改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac タンパク質を発現することによって、チョウ目害虫の影響を受けずに生育することが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、改変 *pat* 遺伝子が導入されており、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

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 (*Glycine max* (L.) Merr.) の Maverick 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

中国を中心とするアジア地域では栽培の歴史が長い。*Glycine* 属には、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属があり、ダイズの祖先であると考えられるツルマメは、*Soja* 亜属に属している。

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り、ダイズ貯蔵タンパク質のうち、11S、7S 及び 2S グロブリンが IgE 結合活性を持つことが報告されている（参照 2）。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及びグリシニンなどが同定されている（参照 3）。

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、食用油等の様々な食品に加工され、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 81419 の作出に使用した導入用プラスミド pDAB9582 の構築には、pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 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 pDAB2407 には、スペクチノマイシン耐性遺伝子 (*specR* 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 pDAB2407 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 *cry1F* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株である。改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株である。改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*S. viridochromogenes* である。

(2) 安全性に関する事項

B. thuringiensis は、微生物農薬として長期にわたり安全に利用されている。*S. viridochromogenes* がヒトや家畜に対して病原性を有するという報告はない。

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 *cry1F* 遺伝子は、*cry1F* 遺伝子のコアタンパク質コード領域及び C 末端側コード領域（*cry1Ca3* 遺伝子及び *cry1Ab* 遺伝子由来）からなる。植物での発現が最適となるように塩基配列を改変し、アミノ酸配列の 604 番目のフェニルアラニンがロイシンに、608 番目のチロシンがセリンに、619 番目のグルタミン酸がアラニンに、640 番目のグルタミンがアルギニンに置換されている。

改変 *cry1Ac* 遺伝子は、*cry1Ac* 遺伝子のコアタンパク質コード領域及び C 末端側コード領域（*cry1Ca3* 遺伝子及び *cry1Ab* 遺伝子由来）からなる。植物での発現が最適となるように塩基配列を改変し、アミノ酸配列の 616 番目のチロシンがセリンに、627 番目のグルタミン酸がアラニンに、648 番目のグルタミンがアルギニンに置換されている。

改変 *pat* 遺伝子は *S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子の塩基配列に基づき、発現タンパク質のアミノ酸配列を改変せずに、植物での発現が最適となるように塩基配列を改変したものである。

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

改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 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 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子がコードする改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac 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。

改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac タンパク質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、タンパク質データベース^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 4、5）。

^c Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2011 年 2 月 18 日)

・ 改変 *pat* 遺伝子

改変 *pat* 遺伝子が 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、ダイズ 81419 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。

PAT タンパク質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、タンパク質データベース⁶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

導入用プラスミド pDAB9582 には、スペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が含まれているが、ダイズ 81419 には検出され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（参照 7、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

(1) プロモーターに関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナのポリユビキチン 10 (*AtUbi10*) 由来のプロモーターである（参照 9）。

改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子のプロモーターは、Cassava vein mosaic virus (CsVMV) 由来のプロモーターである（参照 10）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子のターミネーターは、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点及び 3'末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF23 3' UTR*) である（参照 11）。

改変 *pat* 遺伝子のターミネーターは、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及び 3'末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF1 3' UTR*) である（参照 11）。

(3) その他

上記のプロモーター及びターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる領域は含まれていない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子を pDAB2407 に挿入することによってプラスミド pDAB9582 が構築された。

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 pDAB9582 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 pDAB9582 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 pDAB9582 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 pDAB9582 の塩基配列は明らかになっており、目的外の遺伝子の混入はない。

表 1 ダイズ 81419 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
Border B	T-DNA を伝達する際に利用される境界配列を含む <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>AtUbi10</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ポリユビキチン 10 (<i>UBQ10</i>) プロモーター配列
改変 <i>cry1F</i>	改変 <i>Cry1F</i> タンパク質をコードする遺伝子 <i>B. thuringiensis</i> 由来の <i>Cry1F</i> 、 <i>Cry1Ab</i> 及び <i>Cry1Ca3</i> タンパク質をコードする一部領域を合成
<i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター	ターミネーター領域 アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 非翻訳領域
(改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>CsVMV</i> プロモーター	プロモーター領域 Cassava vein mosaic virus (<i>CsVMV</i>) 由来のプロモーター
改変 <i>cry1Ac</i>	改変 <i>Cry1Ac</i> タンパク質をコードする遺伝子 <i>B. thuringiensis</i> 由来の <i>Cry1Ac</i> 、 <i>Cry1Ab</i> 及び <i>Cry1Ca3</i> タンパク質をコードする一部領域を合成

<i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター	ターミネーター領域 アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 非翻訳領域 (改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット)
<i>CsVMV</i> プロモーター 改変 <i>pat</i>	プロモーター領域 Cassava vein mosaic virus (<i>CsVMV</i>) 由来のプロモーター <i>S. viridochromogenes</i> 由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子
<i>AtuORF1</i> 3' UTR ターミネーター	ターミネーター領域 アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 非翻訳領域
Border A	T-DNA を伝達する際に利用される境界配列を含む <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

プラスミド pDAB9582 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、グルホシネートを含む培地で選抜して再生個体を得た。次に、再分化個体の遺伝子解析により目的の遺伝子が導入されていることを確認後、一般的なダイズの育成プロセスに従って自殖及び交配を行い、ダイズ 81419 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

ダイズ 81419 のゲノムに挿入された改変 *cry1F* 遺伝子発現カセット、改変 *cry1Ac* 遺伝子カセット及び改変 *pat* 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、それぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された (参照 7、8)。

導入用プラスミド pDAB9582 の外骨格領域がダイズ 81419 のゲノムに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、ダイズ 81419 のゲノム中に検出されないことが確認された (参照 8、9)。

ダイズ 81419 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pDAB9582 の T-DNA 領域と比較した結果、挿入遺伝子の 5' 末端に 135 bp の挿入及び 3' 末端に 9 bp の挿入があることを除き、塩基配列は一致することが確認された。なお、5' 末端に挿入された 135 bp のうち 98 bp は、改変 *cry1Ac* 遺伝子の一部領域と 99% の相同性があった (参照 7、8)。

ダイズ 81419 の挿入 DNA 近傍配列がダイズ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 (1,297 bp) 及び 3' 末端近傍配列 (1,379 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、ダイズゲノムの 57 bp の欠失を除き、近傍配列はダイズゲノム由来であると考えられた (参照 12、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 (1,297 bp)、3'末端近傍配列 (1,379 bp) 及び欠失した 57 bp を含むダイズゲノム領域 (2,733 bp) のそれぞれについて、タンパク質データベース^dを用いて blastx 検索を行った。その結果、5'末端近傍領域及びダイズゲノム領域に、ダイズ (*Glycine max*) の ADP リボシル化因子 1 様タンパク質及びマメ科タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) の 7 つの推定タンパク質と同一性を示す領域がみられたが、その領域は短くそれぞれの全長タンパク質に対する同一性も低かった (参照 14)。さらに、ダイズゲノム領域でオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った結果、連続する 30 アミノ酸以上からなる配列は見いだされなかった。したがって、DNA の挿入によって宿主の既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた (参照 14)。

(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 81419 の挿入 DNA 領域内の各遺伝子要素の接合部並びに 5'末端近傍配列 (1,297 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,379 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 30 アミノ酸以上の ORF が 50 個見いだされた。

挿入遺伝子由来の 4 個の ORF 以外の ORF と既知の毒性タンパク質との同一性の有無を確認するために、タンパク質データベース^eを用いて blastp 検索を行った結果、同一性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった。さらに、既知のアレルゲンとの同一性の有無を確認するために、FARRP アレルゲンデータベース^fを用いて同一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%以上の同一性を示す既知のアレルゲン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に、前述のアレルゲンデータベースを用いて同一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 14)。

さらに、5'末端の接合部に挿入された改変 *cry1Ac* 遺伝子断片を含む ORF (141 bp) について、ダイズ 81419 における転写の有無をリアルタイム PCR で分析した結果、ダイズ 81419 においてこの ORF が転写されている可能性は低いと考えられた (参照 15)。

^d Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2010年6月11日)

^e Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2010年6月11日)

^f FARRP Allergen database Version10.

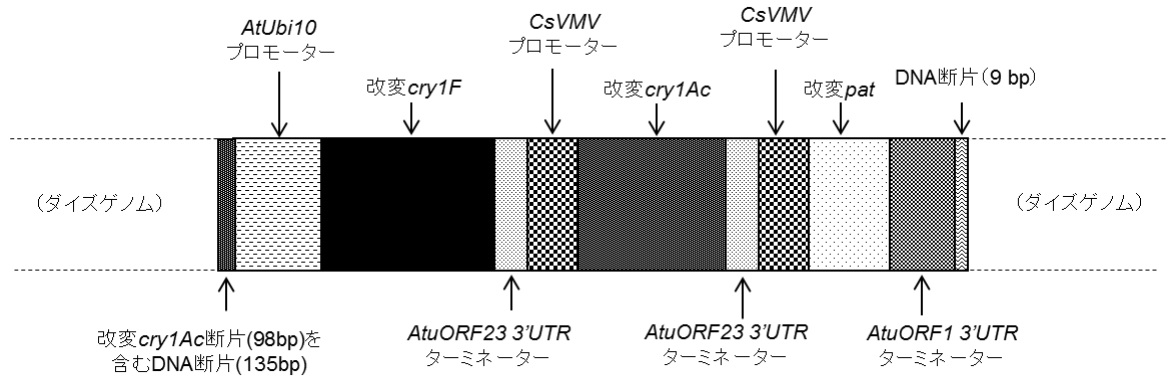


図1 ダイズ 81419 の挿入 DNA (模式図)

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 81419 の葉、茎葉、根及び種子における改変 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析を行った。結果は表 2 のとおりである (参照 16)。

表 2 ダイズ 81419 における改変 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

(単位は ng/mg 乾燥重)

分析組織	改変 Cry1F タンパク質	改変 Cry1Ac タンパク質	PAT タンパク質
葉*	56.75	25.44	5.23
葉**	39.07	23.16	5.60
茎葉***	20.08	5.54	4.06
根***	5.23	0.39	0.63
種子****	13.80	1.04	0.86

* 5 葉期、**10~12 葉期、***着莢始期、****成熟~完熟期

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

日本人一人が一日当たりに摂取する「大豆・大豆加工品」の平均摂取量 50.3g (参照 17) を全てダイズ 81419 に置き換えて計算すると、改変 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質の一人一日当たりの予想平均摂取量はそれぞれ 0.69 mg、0.05 mg 及び 0.04 mg となり、一人一日当たりのタンパク質平均摂取量 67.0 g (参照 17) に占める割合は 1.0×10^{-5} 、 0.8×10^{-6} 及び 0.7×10^{-6} 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 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株、*B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株及び *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株に関して、アレルギー誘発性の報告はない。また、改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* に関する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 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質等の Cry タンパク質に関してアレルギー誘発性の報告はない。また、PAT タンパク質についてはこれまでに多くの評価が行われ、ヒトに対してアレルギーを誘発する可能性は極めて低いと結論されている（参照 18、19）。

(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

Pseudomonas fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac 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、いずれも試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 20、21）。

② 人工腸液に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac 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、いずれも試験開始後 10 分以降にトリプシン耐性コアタンパク質になり、240 分処理後も安定であった（参照 22）。

③ 加熱処理に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するために、SDS-PAGE 分析及び ELISA 分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では 91°C60 分の加熱処理でバンド濃度の低下以外は変化がなかった。免疫反応性は、91°C60 分の加熱処理で失われることが確認された（参照 23）。

PAT タンパク質については、ダイズ 81419 で産生される PAT タンパク質と同一のアミノ酸配列である *Escherichia coli* 由来の PAT タンパク質を用いた試験において、人工胃液中及び人工腸液中で 30 秒以内に消化されることが明らかにされている（参照 24）。また、加熱処理については、90°C で 60 分間加熱しても分子量には変化がないが（参照 24）、50°C 10 分間の加熱処理に

より酵素活性が失われることが明らかにされている（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 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質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に、FARRP アレルゲンデータベース^gを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列で 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。また、抗原決定基の有無を確認するために、FARRP アレルゲンデータベース^g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 26、27、28）。

上記（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 Cry1F タンパク質、改変 Cry1Ac タンパク質及び PAT タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

ダイズ 81419 に挿入された改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の安定性を確認するために、5 世代のダイズ 81419 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 7）。

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 Cry1F タンパク質及び改変 Cry1Ac タンパク質は、いずれも *B. thuringiensis* に由来する殺虫性タンパク質（Bt タンパク質）である。Bt タンパク質は、殺虫以外の機能を有することは知られていない。したがって、これらの Bt タンパク質が酵素活性を持つことはないと考えられることから、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（参照 18）。

PAT タンパク質は、L-グルホシネートを極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他の L-アミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない。また、PAT タンパク質は、L 型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、L-グルホシネートをアセチル化する活性に影響を受けることはない。したがって、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 19）。

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 81419 の種子及び非組換えダイズの種子について、主要構成成分、ミネラル類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類及び栄養阻害物質等の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた（参照 29）。

^g FARRP Allergen database Version11.

(1) 主要構成成分

主要構成成分（タンパク質、脂質、灰分、水分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び粗繊維）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文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル類

ミネラル類 10 種類について分析を行った結果、9 種類は対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められなかった。なお、ナトリウムについては、ダイズ 81419 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(3) 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文献値の範囲内であった。

(4) 脂肪酸組成

脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、8 種類は対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても文献値の範囲内であった。なお、14 種類の脂肪酸についてはダイズ 81419 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 13 種類について分析を行った結果、11 種類は対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても従来の商業品種の分析値の範囲内であった。なお、2 種類のビタミンについては、ダイズ 81419 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(6) 栄養阻害物質等

フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、レクチン、トリプシンインヒビター及びイソフラボン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文献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、米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請が行われ、2014 年 4 月に許可された。米国食品医薬品局（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査のための申請が行われ、2014 年 2 月に安全性確認が終了した。

カナダにおいては、2012年11月にカナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料としての安全性審査及び環境放出許可の申請が、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、2014年5月に安全性確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ 81419 の栽培方法は、チョウ目害虫の防除に必要な薬剤が不要である点を除いて、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 81419 の種子の製法及び管理方法は、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

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 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. OECD. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients, Toxicants and Allergens. 2012, 48p. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25).
2. Urisu A. Commonly known allergenic sources (IgE-mediated and non IgE-mediated food allergens as well as environmental allergens). Joint FAO/WHO Expert Consultation on Foods Derived from Biotechnology. Rome, Italy, 2001, FAO/WHO
3. Cordle C. T. Soy protein allergy: Incidence and relative severity. Orlando, FL, 2003-9-21/24, American Society for Nutritional Sciences. The Journal of Nutrition, 2004, 1213-1219
4. Gao, Z. Sequence Similarity Assessment of Cry1F to Known Toxins by Bioinformatics (Update, March 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130617, 16p. (社内報告書)
5. Rapier, K.L. Similarity Assessment of Cry1Ac Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis (Update, March, 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130613, 18p. (社内報告書)
6. Richey, K.A. Sequence Similarity Assessment of the PAT Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis (Update, March, 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130615, 14p. (社内報告書)
7. Guttikonda, S. Molecular characterization of DAS-81419-2 soybean. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 110813, 54p. (社内報告書)
8. Guttikonda, S.; Ring, Shane. Supplemental Molecular Characterization of DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 120935, 28p. (社内報告書)
9. Norris S. R., Meyer S. E., Callis J. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 1993, 21(5), 895-906.
10. Verdaguer B., de Kochko A., Beachy R. N., Fauquet C. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31(6), 1129-1139.
11. Barker R. F., Idler. K. B., Thompson D.V., Kemp J.D. Nucleotide sequences of the T-DNA region from *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), 335-350.
12. ダイズ 81419 系統の挿入遺伝子配列及び隣接領域配列
13. Guttikonda, Satish; Richey, Kimberly. Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 102126, 42p. (社内報告書)
14. Guttikonda, S. Bioinformatics Analysis of the Insert and Its Flanking Border

- Sequences in DAS-81419-2 Soybean (Updated August, 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 131123, 30p. (社内報告書)
15. Rapier, K.L.; Gao, Zhifang. Analysis of a Reading Frame Containing the Partial cry1Ac in DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 120496, 33p. (社内報告書)
 16. Maldonado, P.M. Protein Expression of a Transformed Soybean Cultivar Containing Cry1Ac, Cry1F, and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 110000.02, 103p. (社内報告書)
 17. 厚生労働省. "第1部 栄養素等摂取状況調査の結果". 平成23年国民健康・栄養調査報告. 2013, p.51-106.
 18. OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis*-Derived Insect Control Proteins. 2007. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42).
 19. OECD. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. 1999, 1-26p. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11).
 20. Korjagin, V.A. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Cry1F (synpro) Produced by *Pseudomonas fluorescens* DR 1647. Dow AgroSciences LLC, 2004, Study ID: 040097, 22p. (社内報告書)
 21. Korjagin, V.A. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1Ac (synpro). Dow AgroSciences LLC, 2001, Study ID: 010026, 27p. (社内報告書)
 22. Korjagin, V.A.; Gao, Y. In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Insecticidal Crystal Proteins Cry1Ac and Cry1F. Dow AgroSciences LLC, 2005, Study ID: GH-C 5778, 52p. (社内報告書)
 23. Shan, G.; Embrey, S.K. Heat Lability of Insecticidal Crystal Proteins Cry1Ac and Cry1F. Dow AgroSciences LLC, 2005, Study ID: GH-C 5777, 35p. (社内報告書)
 24. Hérouet C., Esdaile D J., Mallyon B.A., Debruyne E., Schulz A., Currier T., Hendrickx K., Klis R-J. van der, Rouan D. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2005, 41(2), p.134-149
 25. Wehrmann A., Vliet A. V., Opsomer C., Botterman J., Schulz A., The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14(10), p. 1274-1278
 26. Gao, Z. Sequence Similarity Assessment of Cry1F Protein to Known Allergens

- by Bioinformatics Analysis (Update, March 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130616, 24p. (社内報告書)
27. Rapier, K.L. Sequence Similarity Assessment of Cry1Ac Protein to Known Allergens by Bioinformatics Analysis (Update, March, 2013). Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130612, 24p. (社内報告書)
28. Song, P. Sequence Similarity Assessment of the PAT Protein to Known Allergens by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences, LLC, 2013, Study ID: 130069, 19p. (社内報告書)
29. Fast, B.J.; Johnson, T.Y. Nutrient Composition of a Transformed Soybean Cultivar Expressing Cry1Ac, Cry1F, and PAT: Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 110000.01, 476p. (社内報告書)