



府食第390号
平成27年4月28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11月20日付け厚生労働省発食安1120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「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ1910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

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ1910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

除草剤アリルオキシアルカノエート系及び
グルホシネート耐性ワタ 1910 系統

2015年4月

食品安全委員会

目次

<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	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	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.....	13
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	14
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	16
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	16
7. 宿主との差異に関する事項.....	17
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>

2014年11月25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1120第1号）、関係書類の接受

2014年12月2日 第540回食品安全委員会（要請事項説明）

2014年12月11日 第133回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015年2月24日 第550回食品安全委員会（報告）

2015年2月25日から3月26日まで 国民からの意見・情報の募集

2015年4月23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

2015年4月28日 第559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）

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

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 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、*Delftia acidovorans* MC1 株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 遺伝子を導入して作出されており、改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 タンパク質を発現することで、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統には、選択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が導入されている。

「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、非組換えワタと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 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:除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 系統

性 質:アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性、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)

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 系統」(以下「ワタ 1910」という。)は、*Delftia acidovorans* MC1 株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 遺伝子(改変 *aad-12* 遺伝子)を導入して作出されており、改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12 タンパク質(改変 AAD-12 タンパク質)を発現することで、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できるとされている。なお、本系統には、選択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)が導入されている。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、アオイ科ワタ属に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の商業品種 Coker310 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の供与体は、*D. acidovorans* MC1 株及び *S. viridochromogenes* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *aad-12* 遺伝子は、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変 AAD-12 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 *aad-12* 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

ワタ種子から搾油した綿実油は食品として使用され、食用油やマーガリンの原料などとして用いられる。また、リンター(地毛)がセルロース源として食品に

使用される。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

- (1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

ワタ種子の主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 21.48～32.97%、総脂質 17.20～27.29%、灰分 3.76～5.34%及び炭水化物 39.0～53.6%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

ワタ種子の有害生理活性物質は、ゴシポールのうち活性を有する遊離ゴシポール 0.45～1.40%（対乾燥重量）、ジヒドロステルクリン酸 0.08～0.31%（対総脂肪酸）、マルバリン酸 0.23～0.76%（対総脂肪酸）及びステルクリン酸 0.19～0.56%（対総脂肪酸）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

ワタ 1910 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来ワタと変わらない。

- (2) 摂取（可食）部位

ワタ 1910 の摂取部位は、従来ワタと変わらない。

- (3) 摂取量

ワタ 1910 の摂取量は、従来ワタと変わらない。

- (4) 調理及び加工方法

ワタ 1910 の調理及び加工方法は、従来ワタと変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主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

ワタ 1910 は、改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の導入によって、改変 AAD-12 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、ワタ 1910 の安全性評価においては、既存ワタとの比較が可能であると判断した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ワタ 1910 は、導入された改変 *aad-12* 遺伝子が改変 AAD-12 タンパク質を発現することによって、アリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育することができるかとされている。

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、アオイ科ワタ属に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の商業品種 Coker310 である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

ワタ属に属する品種のうち、栽培種は、*G. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum* 及び *G. barbadense* の4種であり、現在生産されているワタのほとんどが *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* であり、長い栽培の歴史を持つ。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタには、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）が含まれている。ゴシポールは、哺乳類において、食欲減退、体重減少及び呼吸困難を引き起こすことがある。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の代謝を妨げることが報告されている（参照 2）。ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸は、加工により著しく量が減少する（参照 3）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ワタは主要なアレルギー誘発性食品とは考えられていない。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

ワタには、細菌及びウイルスによる各種病害が知られているが、これら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

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

7. 近縁の植物種に関する事項

ワタ属の近縁種の種子には、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸が含まれていることが知られている。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

ワタ 1910 の作出に使用した導入用プラスミド pDAB4468 の構築には、プラスミド 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 *aad-12* 遺伝子の供与体は、*D. acidovorans* MC1 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

D. acidovorans は香料の製造や医療用の生体材料の生成に利用できることが報告されている。なお、*D. acidovorans* による日和見感染や角膜感染についての報告が数例ある (参照 4,5)。*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 *aad-12* 遺伝子は、*D. acidovorans* MC1 株からクローニングされた *aad-12* 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、更にクローニングサイトが導入された遺伝子である。クローニングサイトの導入によって、N 末端側の 2 番目に 1 アミノ酸が付加されている。

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 *aad-12* 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 *aad-12* 遺伝子

改変 *aad-12* 遺伝子がコードする改変 AAD-12 タンパク質は、アリルオキシアルカノエート基をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び S 体^aを特異的に酸化する反応を触媒する酵素である (参照 6)。ワタ 1910 では、改変 AAD-12 タンパク質の作用によって、アリルオキシアルカノエート系除草剤は酸化され、除草活性のない化合物に変換される。その結果、アリルオキシアルカノエート系除草剤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、アリルオキシアルカノエート基を持つ化合物のうち、除草活性を持つものは光学異性体のないもの及び R 体^aのみである。

改変 AAD-12 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^bを用いて *blastp* 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 7)。

・改変 *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、ワタ 1910 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^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 8)。

^a カルボン酸の隣の炭素の立体配置を示す。

^b Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2013 年 8 月 23 日)

^c Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2013 年 3 月 16 日)

(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 pDAB4468 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、ワタ 1910 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 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

(1) プロモーターに関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ由来のポリユビキチン 10 プロモーター (*AtUbi10*) である（参照 10）。

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

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *aad-12* 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 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'非翻訳領域 (*AtuORF23 3' UTR*) である（参照 12）。

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 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'非翻訳領域 (*AtuORF1 3' UTR*) である（参照 12）。

(3) その他

改変 *aad-12* 遺伝子の発現を安定させるために、*AtUbi10* の上流にタバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の核マトリックス結合領域である RB7 Matrix Attachment Region (*RB7 MAR*) が使用された（参照 13,14,15）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子をプラスミド pDAB2407 に挿入することによってプラスミド pDAB4468 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 pDAB4468 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 pDAB4468 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 pDAB4468 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 pDAB4468 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 ワタ 1910 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
<i>RB7 MAR</i>	タバコ由来の核マトリックス結合領域 (RB7 Matrix Attachment Region)
(改変 <i>aad-12</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>aad-12</i>	<i>D. acidovorans</i> 株由来の改変 AAD-12 タンパク質をコードする遺伝子
<i>AtuORF23 3' UTR</i> 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	プロモーター領域 Cassava vein mosaic virus 由来のプロモーター
改変 <i>pat</i>	<i>S. viridochromogenes</i> 由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子
<i>AtuORF1 3' UTR</i> 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 pDAB4468 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、一般的なワタの育成プロセスに従って自殖及び他殖を行い、ワタ 1910 が得られた。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

ワタ 1910 のゲノムに挿入された改変 *aad-12* 遺伝子発現カセット及び改変 *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 9)。

導入用プラスミド pDAB4468 の外骨格領域がワタ 1910 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、ワタ 1910 のゲノム中に検出されないことが確認された (参照 9)。

ワタ 1910 に挿入された DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド pDAB4468 の T-DNA 領域と比較した結果、T-DNA Border A がゲノムに挿入されておらず、Border B の一部のみが挿入されていることを除き、塩基配列は一致することが確認された (参照 16)。

ワタ 1910 の挿入 DNA 近傍配列がワタ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 (1,373 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,071 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。その結果、159 bp の欠失を除き塩基配列は一致しており、挿入 DNA 近傍配列はワタゲノム由来であると考えられた (参照 17)。

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 (1,373 bp)、3'末端近傍配列 (1,071 bp) 及び欠失した 159 bp を含むワタゲノム領域 (2,603 bp) 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'末端近傍配列領域に相同性を示す配列は見いだされなかった。3'末端近傍配列領域及びワタゲノム領域での blastx 検索結果では、アリ (蟻) (*Componotus floridanus*) の推定タンパク質が検索されたが、既知のワタタンパク質との相同性は認められなかった。さらに、ワタ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、30 アミノ酸からなる配列が 1 個見いだされたが、blastp 検索の結果、既知のワタタンパク質との相同性は認められなかった。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 18)。

^d Non-redundant GenBank CDS translations, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB (2013 年 6 月 1 日及び 7 月 20 日)

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

ワタ 1910 の挿入 DNA 領域と 5'末端及び 3'末端との接合部並びに挿入 DNA 領域における各遺伝要素の接合部について、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 41 個見いだされた。改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質のアミノ酸配列と重複する 2 個を除く 39 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、タンパク質データベース^d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。さらに、既知のアレルゲンとの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^e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。

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 18）。

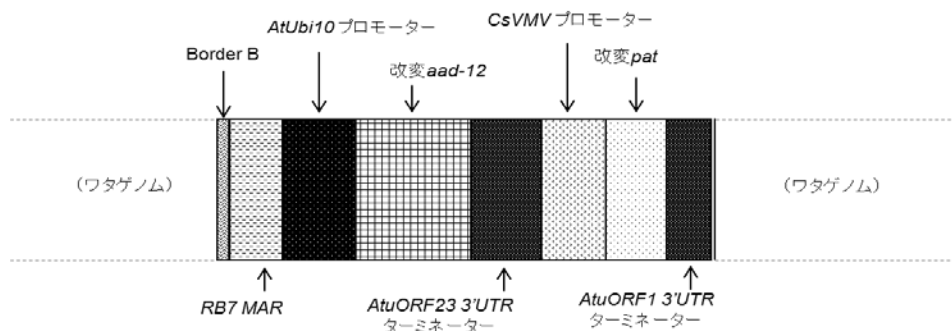


図1 ワタ 1910 の挿入 DNA (模式図)

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

除草剤 2,4-D 及び除草剤グルホシネートを散布又は無散布で栽培したワタ 1910 のさく、花、葉、花粉、根、種子及び全植物体における改変 AAD-12 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 19）。

^e FARRP Allergen database Version 13

表2 ワタ 1910 における改変 AAD-12 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 AAD-12 タンパク質		PAT タンパク質	
	無散布	除草剤散布	無散布	除草剤散布
さく*	16.87	17.46	3.10	3.21
花*	30.02	31.24	5.39	5.21
葉**	16.48~76.22	18.59~66.11	8.17~13.64	8.19~12.95
花粉***	74.46	66.95	0.08	0.14
根****	10.40	11.08	1.71	1.55
種子****	19.61	17.89	3.74	3.96
全植物体 ****	16.91	15.93	1.00	0.94

* 開花最盛期、**4 葉期~開じょ始期、***開花初期、****成熟期

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

ワタは主として綿実油として摂取される。ワタ 1910 から得られた精製された綿実油に含まれる改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質含有量を ELISA 法を用いて分析を行った結果、検出限界値未満(改変 AAD-12 タンパク質:6 ng/g、PAT タンパク質:0.3 ng/g)であった(参照 20)。

改変 AAD-12 タンパク質及び PAT タンパク質の含有量を検出限界値とし、日本人一人が一日あたりに摂取する油脂類の平均摂取量 10.4 g (参照 21) を全てワタ 1910 から製造された綿実油に置き換えて計算すると、改変 AAD-12 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 62.4 ng 及び 3.12 ng となり、一人一日当たりのタンパク質平均摂取量 68.0 g (参照 21) に占める割合は 9.2×10^{-10} 及び 4.6×10^{-11} 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 *aad-12* 遺伝子の供与体である *D. acidovorans* 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 AAD-12 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 22)。

(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 AAD-12 タンパク質の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 23）。

② 人工腸液に対する感受性

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-12 タンパク質の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 5 分以内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

P. fluorescens で発現させた改変 AAD-12 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、ELISA 分析及び酵素活性の測定を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では 50℃、70℃及び 95℃、30 分の加熱処理で僅かな多量体の形成が見られた以外は変化がなかった。免疫反応性及び酵素活性は、50℃、30 分の加熱処理で失われることが確認された（参照 25）。

PAT タンパク質については、ワタ 1910 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 26）。また、加熱処理については、90℃で 60 分間加熱しても分子量には変化がないが（参照 26）、50℃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 27）。

(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 AAD-12 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^oを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった。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^o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 28）。

PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの相同性がないことが、FARRP アレルゲンデータベース^oを用いた検索により確認された（参照 29）。

上記(1)～(4)及び前項3から総合的に判断し、改変 AAD-12 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が確認された。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

ワタ 1910 に挿入された改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の安定性を確認するために、5 世代のワタ 1910 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 9)。

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 AAD-12 タンパク質

改変 AAD-12 タンパク質はアリルオキシアルカノエート系除草剤のうち、光学異性体のないもの及び S 体^aを特異的に分解することが報告されている。*in vitro* における改変 AAD-12 タンパク質の基質に対する活性を測定した結果、(R,S)-ジクロルプロップ、(S)-ジクロルプロップ及び 2,4-D に対して高い活性を示した。また、数種類のアリルオキシアルカノエート系除草剤を基質として用いて改変 AAD-12 タンパク質の反応速度の解析を行った結果、アルカノエート基(部位)にあるメチル基が重要であることが示唆された(参照 30)。

改変 AAD-12 タンパク質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アリルオキシアルカノエート基を持つ化合物と構造及び生理機能が類似する化合物等が改変 AAD-12 タンパク質と反応するか否かについて検討を行った。コハク酸測定法による酵素活性の測定を行った結果、植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体で僅かな反応が見られた。そのため、反応が見られた基質が実際に酸化されているか確認するため、フーリエ変換質量分析(FT/MS)による酸化物の測定を行った結果、インドール-3-酢酸及び桂皮酸の酸化物が検出されたが、その反応速度は非常に遅いことが確認された(参照 31,32)。また、桂皮酸を前駆物質とするイソフラボン類の分析の結果、非組換えワタ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。

以上のことから、改変 AAD-12 タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

・PAT タンパク質

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-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 22)。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたワタ 1910 の種子及び非組換えワタの種子について、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、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。除草剤のドリフトによる非組換えワタへの薬害を避けるため、2つの試験区を設定し、試験区1では除草剤無散布の条件でワタ 1910 と非組換えワタを比較し、試験区2では除草剤を散布したワタ 1910 と除草剤無散布のワタ 1910 を比較した（参照 33）。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（タンパク質、脂質、灰分、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。試験区1では対照に用いた非組換えワタ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り、試験区2ではワタ 1910 の除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。

(2) ミネラル類

ミネラル類 12 種類について分析を行った結果、試験区1では対照に用いた非組換えワタ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り、試験区2ではワタ 1910 の除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。

(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、試験区1では対照に用いた非組換えワタ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り、試験区2ではワタ 1910 の除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。

(4) 脂肪酸組成

脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、9 種類は、試験区1において対照に用いた非組換えワタ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及び従来の商業品種の分析値の範囲内であった。試験区2では、ワタ 1910 の除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。なお、両試験区での 13 種類の脂肪酸についてはサンプルの半数以上が定量限界未満であった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 7 種類について分析を行った結果、6 種類は、試験区1において対照に用いた非組換えワタとの間に有意差は認められず、試験区2において除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。なお、 β -カロテンについては、サンプルの半数以上が定量限界未満であった。

(6) 栄養阻害物質等

遊離型ゴシポール、総ゴシポール、マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸について分析を行った結果、試験区1では対照に用いた非組換えワタ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。試験区2ではワタ 1910 の除草剤散布と無散布との間に有意差は認められなかった。

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、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11月に安全性の確認が終了した。

カナダにおいては、2013年9月にカナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての、また、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10月に安全性の確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ワタ 1910 の栽培方法は、生育期の雑草防除にアリルオキシアルカノエート系除草剤を使用できる点を除いて、従来ワタと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ 1910 の種子の製法及び管理方法は、従来ワタと同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第6まで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

「除草剤アリルオキシアルカノエート及びグルホシネート耐性ワタ 1910 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. ILSI Crop Composition Database. Version 4.2., 2010
2. OECD. Consensus document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.). 2008, 64p. (Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45)
3. OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and Anti-nutrients. 2004, 32p. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.11)
4. Horowitz, Harold; Gilroy, Shelly; Feinstein, Stuart; Gilardi, Gerald. Endocarditis associated with *Comamonas acidovorans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990, 28(1), p.143-145.
5. Brinser, John H.; Torczynski, Elise. Unusual *Pseudomonas* corneal ulcers. *American Journal of Ophthalmology*. 1977, 84(4), p. 462-466.
6. Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Authony; Merlo, Donald J.; Jayakumar, Pon, samuel; Lin, Gaofeng. Novel herbicide resistance genes. WO 2007/053482 A2. 2007-05-10.
7. Richey, K.A. Sequence Similarity Assessment of AAD-12 Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 131201, 14p. (社内報告書)
8. Richey, K.A. Sequence Similarity Assessment of PAT Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130615, 14p. (社内報告書)
9. Mo, J.; Ring, S. Molecular Characterization of DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 120456, 56p. (社内報告書)
10. Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. 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), p.895-906.
11. Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31(6), p.1129-1139.
12. Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), p.335-350.
13. Hall, Gerald JR.; Allen, George C.; Loer, Deborah S.; Thompson, William F.; Spiker, Steven. Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991, 88(20), p.9320-9324.

14. Allen, George C.; Spiker, Steven; Thompson, William F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), p.361-376.
15. Halweg, Christopher; Thompson, William F.; Spiker, Steven. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell*. 2005, 17(2), p.418-429.
16. Mo, J.; Cruse J. Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 110752, 26p. (社内報告書)
17. Gao, Z.; Ring, S.; Guttikonda, S.; Cruse J.K. Cloning and Analysis of the DNA Sequence for the DAS-81910-7 Cotton Insertion Site in Coker 310 Cotton. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130924, 31p. (社内報告書)
18. Richey, K.A. Bioinformatics Analysis of Insert and Its Flanking Border Sequences in DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 131238, 27p. (社内報告書)
19. Fast, B.J.; Hill, R.C. Protein Expression of a Transformed Cotton Line Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase (AAD-12) and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-81910-7. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 120040.07, 149p. (社内報告書)
20. Smith, Katie. Event DAS-81910-7 Cotton MOR Processing Oil Expression Analysis- AAD-12, PAT. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 131119, 16p. (社内報告書)
21. 厚生労働省“第1部 栄養素等摂取状況調査の結果”平成24年国民健康・栄養調査報告. 2014 p.53-107.
22. OECD. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. 1999, 26p. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11).
23. Embrey, S.K.; Schafer, B.W. In vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (abbreviation AAD-12). Dow AgroSciences LLC, 2008, Study ID: 080064, 21p. (社内報告書)
24. Embrey, S.K.; Cruse, J.K.; Korjagin, V.A. In vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, 2008, Study ID: 080065, 22p. (社内報告書)
25. Schafer, B.W. Summary of the Effect of Heat Treatment on a Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 Protein. Dow AgroSciences LLC, 2012, Study ID: 120595, 20p. (社内報告書)
26. Hérouet, Corinne; Esdaile, David J.; Mallyon, Bryan A.; Debruyne, Eric; Schulz, Arno; Currier, Thomas; Hendrickx, Koen; Klis, Robert-Jan van der; Rouan, Dominique. 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.
27. Wehrmann, Axel; Vliet, Adri Van; Opsomer, Chris; Botterman Johan, Schulz, Arno. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14(10), p. 1274-1278.
 28. Song, P. Sequence Similarity Assessment of AAD-12 Protein to Known Allergens by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 130068, 17p. (社内報告書)
 29. 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)
 30. Cicchillo, R.M. Substrate Scope and Kinetic Analyses of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, 2011, Study ID: 110576, 20p. (社内報告書)
 31. Wright, Terry R.; Shan, Guomin; Walsh, Terence A.; Lira, Justin M.; Cui, Cory; Song, Ping; Zhuang, Meibao; Arnold, Nicole L.; Lin, Gaofeng; Yau, Kerm; Russell, Sean M.; Cicchillo, Robert M.; Peterson, Mark A.; Simpson, David M.; Zhou, Ning; Ponsamuel, Jayakumar; Zhang, Zhanyuan. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(47), p.20240-20245.
 32. Cicchillo, Robert M.; Godbey, Jeff; Wright, Terry. Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, 2010, Study ID: 101617, 26p. (社内報告書)
 33. Fast, B.J.; Johnson, T.Y. Nutrient Composition of a Cotton Cultivar Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT): Event DAS-81910-7. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 120040.01, 458p. (社内報告書)