

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐
性トウモロコシ *B. t.*Cry34 / 35Ab1 Event DAS-59122-7

2005年8月

食品安全委員会 遺伝子組換え食品等専門調査会

目次

	頁
審議の経緯	1
食品安全委員会委員名簿	1
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	1
コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ <i>B. t. Cry34/35Ab1</i> Event DAS-59122-7 に係る食品健康影響評価に関する審議結果	2
．はじめに	2
．評価食品の概要	2
．食品健康影響評価	2
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	2
1 宿主及び導入DNAに関する事項	2
2 宿主の食経験に関する事項	3
3 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	3
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	3
5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項	3
6 安全性評価において検討が必要とされる相違点	3
第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
第3 宿主に関する事項	4
1 分類学上の位置付け（学名、品種名及び系統名等）	4
2 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯	4
3 有害生理活性物質の生産に関する事項	4
4 アレルギー誘発性に関する事項	4
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	4
6 安全な摂取に関する事項	4
7 近縁の植物種に関する事項	5
第4 ベクターに関する事項	5
1 名称及び由来に関する事項	5
2 性質に関する事項	5
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	5
1 挿入DNAの供与体に関する事項	5
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	5
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	6

4	ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	6
5	構築された発現ベクターに関する事項	6
6	DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	7
第 6	組換え体に関する事項	7
1	遺伝子導入に関する事項	7
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	8
3	遺伝子産物（タンパク質）が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かに関する 事項	8
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	9
5	組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	10
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	10
7	宿主との差異に関する事項	11
8	諸外国における認可、食用等	11
9	栽培方法	12
10	種子の製法及び管理方法	12
第 7	第 2 から第 6 までにより安全性の知見が得られていない場合に必要事項	12
	評価結果	12
	参考文献	12

審議の経緯

平成16年5月28日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の接受
平成16年6月3日	第47回食品安全委員会（要望事項説明）
平成16年6月18日	第14回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成16年11月29日	第19回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年1月24日	第21回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年5月30日	第27回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年7月15日	第29回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年8月1日	第30回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成17年8月18日	第107回食品安全委員会（報告）

食品安全委員会委員

委員長	寺田雅昭
委員長代理	寺尾允男
	小泉直子
	坂本元子
	中村靖彦
	本間清一
	見上 彪

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

座長	早川堯夫	
座長代理	澤田純一	
	五十君静信	手島玲子
	池上幸江	丹生谷博
	今井田克己	日野明寛
	宇理須厚雄	室伏きみ子
	小関良宏	山川隆
	澁谷直人	山崎壮
		渡邊雄一郎

コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性
トウモロコシ *B. t. Cry34 / 35Ab1* Event DAS-59122-7 に係る
食品健康影響評価に関する審議結果

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ *B. t. Cry34/35Ab1* Event DAS-59122-7 の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 16 年 5 月 28 日、関係書類を接受)

評価対象食品の概要

- 名称 : コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ
B. t. Cry34/35Ab1 Event DAS-59122-7
- 性質 : コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性
- 申請者 : デュポン株式会社
- 開発者 : ダウ・アグロサイエンス社、
パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社

遺伝子組換えトウモロコシ「*B. t. Cry34 / 35Ab1* Event DAS-59122-7」(以下、「Event DAS-59122-7」という)は、グラム陽性菌 *Bacillus thuringiensis* PS149B1 株に由来する *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子並びにグラム陽性放線菌である *Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子を導入して作製され、コーンルートワーム (corn rootworm: *Diabrotica* spp.) を防除し、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できるトウモロコシである。

本食品の宿主であるトウモロコシ(デント種)は、コーンスターチの原料及び様々なスナック菓子の原材料として用いられている。

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

宿主植物として用いたトウモロコシ *Zea mays* L. は、イネ科トウモロコシ属トウモロコシのデント種のものである。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

Event DAS-59122-7 に挿入された *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、土壌中のグラム陽性菌である *B. thuringiensis* PS149B1 株に由来する。*pat* 遺伝子は、土壌中のグラム陽性放線菌である *S. viridochromogenes* に由来する。

(3) 導入 DNA の性質及び導入方法

組換え植物のゲノムに組み込まれた *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、
-エンドトキ

シンとして知られる殺虫性タンパク質 (B.t.タンパク質) を発現させる。このタンパク質は、トウモロコシ栽培の主要害虫であるコーンルートワームに対する抵抗性を付与する。

pat 遺伝子により発現する PAT タンパク質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、グルホシネートの除草作用に対する耐性を付与する。

これら 3 種類の遺伝子は、アグロバクテリウム法でトウモロコシゲノム中に導入された。

2 宿主の食経験に関する事項

宿主のトウモロコシ (デント種、イネ科トウモロコシ属) は、コーンスターチの原料及び様々なスナック菓子に加工され、これまで長い間摂取されている。

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

宿主のトウモロコシ (デント種) の穀粒中の主要栄養組成はタンパク質 6.0-15.0%、脂質 1.2-18.8%、粗繊維 1.6-5.5%、灰分 0.62-6.28%、炭水化物 63.3-89.8%と報告されている(参考文献 1~4)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質(栄養素の消化・吸収等を阻害する物質。例えばトリプシンインヒビター、フィチン酸等)等の種類及びその量の概要

宿主であるトウモロコシ (デント種) には、ヒトの健康に悪影響を与える毒性物質の産生性は知られていない。栄養阻害物質としては、フィチン酸及びトリプシンインヒビターが知られている。トウモロコシ穀粒中のフィチン酸含有量は 0.29~1.29%(乾物重中)、トリプシンインヒビター含有量は 1.1~7.18 TIU/g (TIU; Trypsin Inhibitor Unit) である。(参考文献 1~4) トリプシンインヒビターはトウモロコシ中の含有量が低く、栄養学的に問題とならないとされている。(参考文献 3)

4 宿主の組換え体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

Event DAS-59122-7 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のトウモロコシと変わらない。

(2) 摂取 (可食) 部位

Event DAS-59122-7 の可食部位は、従来のトウモロコシと変わらない。

(3) 摂取量

摂取量は、従来のトウモロコシ及びその加工品の摂取量中に含まれる。

(4) 調理及び加工方法

非組換えトウモロコシと Event DAS-59122-7 との調理及び加工方法に相違はない。

5 宿主以外のものを比較対象に追加している場合、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

Event DAS-59122-7 において、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の導入により、それぞれ Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質及び PAT タンパク質が産生され

ていることが、宿主との相違点と考えられる。

以上、1~6により、Event DAS-59122-7の安全性評価においては、既存のトウモロコシとの比較が可能であると判断された。

第2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

Event DAS-59122-7のゲノムに組み込まれた *cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、B.t.タンパク質（殺虫性タンパク質）を産生し、コウチュウ目害虫であるコーンルートワーム (corn rootworm : *Diabrotica* spp.) に対して抵抗性を示し、本害虫の防除を可能にする。

また、同様に組み込まれた *pat* 遺伝子は、PAT タンパク質を産生し、グルホシネート除草剤の作用を不活性化し、植物の枯死（除草効果）を妨げる。この作用によりグルホシネート耐性組換え植物は、栽培中にグルホシネートを散布しても影響を受けずに作物の成長を続ける一方、耐性を持たない一般の雑草の防除をすることが可能になる。（参考文献5）

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（学名、品種及び系統名等）に関する事項

宿主植物として用いたトウモロコシはデント種である。

2 遺伝的祖先並びに育種開発の経緯に関する事項

トウモロコシの原産地は、決定的な説はないが、メキシコ、あるいはグアテマラと考えられている。植物学的には、育種の過程でブタモロコシ (teosinte, *Zea mexicana*) から派生したとする説が有力とされている。現在では広く栽培され、食品、飼料等として利用されている。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

トウモロコシには、有害生理活性物質の産生は知られていない。（参考文献6）

なお、トウモロコシに含まれる栄養阻害物質としては、フィチン酸及びトリプシンインヒビターが知られているが、トウモロコシ中のトリプシンインヒビターの含有量は栄養学的に問題にならないとされている。（参考文献3）

4 アレルギー誘発性に関する事項

食物アレルギーを持つ患者の遡及的研究から、トウモロコシがアレルギーを誘発する可能性は稀であり（参考文献7）、トウモロコシは、ヒトに対してアレルギーを誘発する可能性の低い食物と考えられている。（参考文献8）

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

多くの植物と同様に、トウモロコシの病気も多く知られているが、それらがヒトや動物に感染することは知られていない。

6 安全な摂取に関する事項

トウモロコシは、米、小麦とともに、世界の主要な穀物の一つであり、古くから食されている。

我が国では、約 1642 万トンのトウモロコシを輸入しており、そのほぼ 100% がデント種である(2002 年貿易統計)。

7 近縁の植物種に関する事項

トウモロコシの近縁種は、ブタモロコシ (teosinte , *Zea mexicana*) とトリプサカム属 (*Tripsacum*) であるが、これらが食用に供されることはない。また、これらについて、有害生理活性物質を産生するという報告はない。

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

Event DAS-59122-7 を作製するためのベクターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株由来のプラスミド pSB1 を用いて作出された。

2 性質に関する事項

・ DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pSB1 の塩基数は 36,909bp である。

・ プラスミド中の既知の有害塩基配列等の有無

プラスミド pSB1 に存在する全ての遺伝子は、その特性が各々明らかとなっており、既知の有害な塩基配列を含んでいない。

・ 薬剤耐性

プラスミド pSB1 には、形質転換プラスミドを含む微生物を選抜するための抗生物質耐性マーカー *tet* 遺伝子(テトラサイクリン耐性遺伝子)が含まれている。なお、サザンブロット分析により、この *tet* 遺伝子は宿主ゲノム中に導入されていないことが確認されている。

・ 伝達性

プラスミド pSB1 は、プラスミドの伝達を可能とする配列を含まない。

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

Event DAS-59122-7 に挿入された遺伝子のうち、*cry34Ab1* 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* PS149B1 株に由来する。また、*pat* 遺伝子は、土壤中のグラム陽性細菌である *S. viridochromogenes* に由来する。

(2) 安全性に関する事項

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子が由来する *B. thuringiensis* は、普遍的に土壤中に存在するグラム陽性菌であり、ヒトや家畜に対し病原性等の問題は報告されていない。

S. viridochromogenes には、ヒト及びその他の動物に対しての病原性は知られていない。(参考文献 5)

2 挿入 DNA または遺伝子 (抗生物質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

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子は、*B. thuringiensis* PS149B1 株からクローニングされた。*pat* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* からクローニングされた。挿入 DNA の遺伝要素は表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。抗生物質耐性マーカー遺伝子は導入されていない。

一般に、*B. t.* タンパク質は、標的昆虫の中腸細胞に存在する特異的な受容体に結合し、細胞に小孔を形成することで、イオンチャネルの透過性を高め、結果的に中腸細胞を破壊し、殺虫効果を示す。ヒトの腸管には、*B. t.* タンパク質に対する受容体が存在しないため、*B. t.* タンパク質に対して、感受性を示さない。*B. t.* タンパク質の安全性については、これまで多くの試験が行われており、ヒト及び家畜に対しては毒性がないことが示されている。(参考文献 9)

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子より産生される *B. t.* タンパク質のうち、*Cry34Ab1* タンパク質は、単独で標的昆虫に殺虫効果を示し、*Cry35Ab1* タンパク質は、単独では殺虫効果を示さないが、*Cry34Ab1* タンパク質の殺虫効果を高めると考えられている。結果として、*Cry34Ab1* タンパク質と *Cry35Ab1* タンパク質が、一緒に存在することで、標的昆虫に対する殺虫活性に相乗効果を示すと考えられている。

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

cry34Ab1 遺伝子には、トウモロコシ由来のユビキチンプロモーターが連結されている。(参考文献 10)

cry35Ab1 遺伝子には、根における発現特異性が知られている小麦由来のペルオキシダーゼプロモーターが連結されている。(参考文献 11)

pat 遺伝子には、カリフラワーモザイクウイルス Strasbourg 株由来の *35S* プロモーターが連結されている。(参考文献 12)

(2) ターミネーターに関する事項

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子には、ばれいしょ由来のプロテアーゼインヒビターターミネーターが連結されている。(参考文献 13)

pat 遺伝子には、カリフラワーモザイクウイルス Strasbourg 株由来の *35S* ターミネーターが連結されている。(参考文献 12)

(3) その他

上記プロモーター、ターミネーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は導入されていない。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

Event DAS-59122-7 の作出に用いた発現ベクター PHP17662 は、*R. radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 株由来のプラスミド pSB1 の T-DNA 領域に、*cry34Ab1* 遺伝子発現カセット、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットを導入して構築された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

- ・ Event DAS-59122-7 は、発現ベクター PHP17662 を用いて作出された。

- ・発現ベクターPHP17662 の塩基数は 50,321bp である。本プラスミドの塩基配列は明らかとなっている。
- ・Event DAS-59122-7 に導入された挿入部位は、PHP17662 の T-DNA に挟まれた領域であるが、その中には、*cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子以外のオープンリーディングフレームは含まれないことが確認されている。
- ・発現ベクターの各要素は純化され、目的外の遺伝子の混入はない。

・遺伝子組換えトウモロコシ Event DAS-59122-7 への挿入 DNA

略 称	機 能
<i>cry34Ab1</i> 遺伝子カセット	
<i>UBI1ZM PRO</i>	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） トウモロコシ由来のユビキチンプロモーター
<i>cry34Ab1</i>	<i>cry34Ab1</i> 遺伝子、B.t.タンパク質産生遺伝子
<i>PIN TERM</i>	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） ばれいしょ由来のプロテアーゼインヒビターターミネーター
<i>cry35Ab1</i> 遺伝子カセット	
<i>TA Peroxidase PRO</i>	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） 小麦由来のペルオキシダーゼプロモーター
<i>cry35Ab1</i>	<i>cry35Ab1</i> 遺伝子、B.t.タンパク質産生遺伝子
<i>PIN TERM</i>	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） ばれいしょ由来のプロテアーゼインヒビターターミネーター
<i>pat</i> 遺伝子カセット	
<i>35S PRO</i>	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーター
<i>Pat</i>	<i>pat</i> 遺伝子、グルホシネート除草剤耐性遺伝子
<i>35S TERM</i>	ターミネーター領域（遺伝子の発現を終結させるための配列） カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S 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

発現ベクターPHP17662 を用いて、アグロバクテリウム法により、T-DNA 領域が宿主に導入されている。宿主であるトウモロコシの Hi- カルスの穂軸から単離した未成熟胚を、プラスミド PHP17662 を保持するアグロバクテリウムとともに 6 日間共存培養し、その後、グルホシネートに耐性があるカルスを選択し、植物体を再生、栽培した。

なお、植物体の生育後、導入遺伝子の有無が PCR 法により、また、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質の産生が ELISA 法により確認されている。

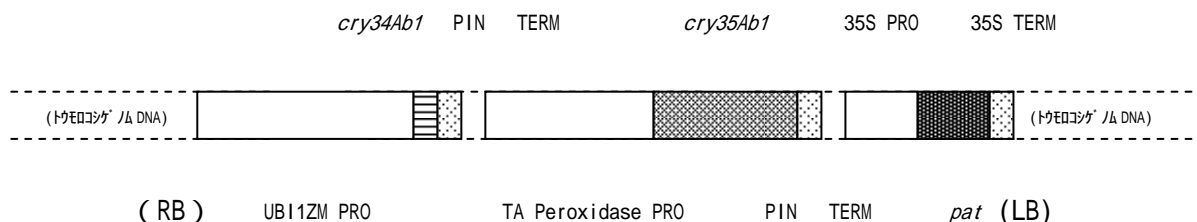
第 6 組換え体に関する事項

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

Event DAS-59122-7 のゲノム中に挿入された *cry34Ab1* 遺伝子、*cry35Ab1* 遺伝子及び *pat* 遺伝子のコピー数と完全性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、PHP17662 の T-DNA 領域中の 3 種類の遺伝子発現カセットが、完全な状態で、トウモロコシゲノム中に 1 コピーずつ導入されていることが確認された。また、挿入近傍配列も明らかとなっている。

・組換えトウモロコシ Event DAS-59122-7 に挿入された DNA (模式図)



(2) オープンリーディングフレームの有無ならびにその転写及び発現の可能性

Event DAS-59122-7 に挿入された T-DNA と発現ベクター PHP17662 の T-DNA 領域の DNA 配列を比較したところ、*cry35Ab1* 遺伝子発現カセットのペルオキシダーゼプロモーター配列のうち 2 塩基が異なっていたが、目的とする Cry35Ab1 タンパク質が適切に産生されていたことから、発現に影響を与えないと結論された。

また、挿入 T-DNA の 5' 末端で 22bp、3' 末端で 25bp の欠失が確認されたが、このような欠失はしばしば起こりうることで報告されており (参考文献 14) また、遺伝子解析ソフト Vector NTI8.0 を用いた分析により、新たな意図しないオープンリーディングフレームが生じていないことが確認されている (参考文献 15)。

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

Event DAS-59122-7 の T1S1 世代 (F2) 及び BC1 世代 (F1 の戻し交雑) の穀粒 (成熟期の植物体より採取) を試料として、ELISA 法により、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質、PAT タンパク質の穀粒中の発現量が測定された。

分析の結果、T1S1 世代では、乾組織重 1mg 当たり、Cry34Ab1 タンパク質は 34.1-130ng (平均 62.7ng)、Cry35Ab1 タンパク質は 0.67-3.09ng (平均 1.61ng)、PAT タンパク質は測定下限値 (0.100ng/mg 組織重) 未満であった。また、BC1 世代では、Cry34Ab1 タンパク質は 28.9-84.8ng (平均 49.7ng)、Cry35Ab1 タンパク質は 0.48-1.58ng (平均 0.99ng)、PAT タンパク質は測定下限値 (0.06ng/mg 組織重) 未満であった。

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

・Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質

「トウモロコシ (玄穀) 及びフライ味付けジャイアントコーン、ポップコーン、コーンフレーク」を含む「とうもろこし・加工品」の日本人一日一人当たりの平均摂取量 0.4g (国民栄養の現状、平成 14 年厚生労働省国民栄養調査結果) を用い、その全てが本トウモロコシ由来であると仮定し、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質の一日一人当たりの予想摂取量を算出したところ、加工による損失が全くない場合、一日最大摂取量は、Cry34Ab1 タンパク質が 19.9 µg、

Cry35Ab1 タンパク質が 0.40 µg となる。

また、日本人の一日一人当たりのタンパク質平均摂取量 72.2g (国民栄養の現状、平成 14 年厚生労働省国民栄養調査結果) に基づき、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質が一日タンパク摂取量に占める割合を計算したところ、Cry34Ab1 タンパク質の一日最大摂取量 19.9 µg が一日タンパク摂取量に占める割合は 0.27ppm、Cry35Ab1 タンパク質の 0.40 µg については 0.006ppm となり、両タンパク質ともに極めてわずかであることが示された。

・ PAT タンパク質

PAT タンパク質は測定下限値未満であったが、仮に乾組織重当たり 0.10ng 産生していると仮定すると、本タンパク質の一日最大予想摂取量は 0.04 µg であり、一日タンパク摂取量に占める割合は、0.0006ppm となり、極めてわずかとなる。

4 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* PS149B1 株がヒトに対してアレルギー誘発性を持つことは知られていない。

(2) 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

cry34Ab1 遺伝子及び *cry35Ab1* 遺伝子が発現する Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質について、ヒトに対するアレルギー誘発性を有するという報告はされていない。

pat 遺伝子が発現する PAT タンパク質についてもこれまでアレルギーを誘発したという報告はない。なお、PAT タンパク質については、これまで多くの評価試験が行われているが、本タンパク質がヒトにアレルギー誘発性を示す可能性は極めて低いと結論されている (参考文献 5)。

(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

人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

組換え微生物 (*Pseudomonas fluorescens*) 中で産生させた Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質を人工胃液中で処理し、SDS-PAGE 及びウェスタンブロット分析を行ったところ、Cry34Ab1 タンパク質ではその 90% が 6.3 分 ~ 6.8 分で、また、Cry35Ab1 タンパク質ではその 97% が 5 分以内で消化された。本試験における消化時間は、ペプシン飽和状態下 (0.32%)、pH1.2、37 °C でのタンパク質の消化性を、反応速度理論に基づき計算されたものである (参考文献 16、17)。

なお、消化性の良い RUBISCO タンパク質、消化性の悪い大豆トリプシンインヒビターのタンパク質も含め、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 タンパク質の消化性について、他のタンパク質と同じ条件下で 90% 消化性を比較したところ、Cry34Ab1 タンパク質については、中程度の消化時間を要したが、Cry35Ab1 タンパク質については、消化に特段の時間を要するとは認められなかった。(参考文献 18)

人工腸液によるアルカリ処理及び酵素(パンクレアチン)処理

B. t. タンパク質のコアタンパク部分はトリプシン耐性であり、人工腸液中では消化されにくいことが知られているが、組換え微生物 (*Pseudomonas fluorescens*) 中で産生させた Cry34Ab1 タンパク質を人工腸液中で処理したところ、ウェスタンブロット分析の結果では、240 分経過後でもバンドが検出された。また、Cry35Ab1 タンパク質は、80 分後には消化されたことが示

された。

加熱処理に対する感受性

デント種のトウモロコシの加工・調理工程を想定して、50、48時間、さらに100、5分間の加熱処理を行って、SDS-PAGE 及び ELISA 法により分析したところ、分子量に変化はなかったが、免疫反応性はほぼ消失することが示された。

(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

Cry34Ab1 タンパク質と Cry35Ab1 タンパク質について、既知アレルゲンとの構造相同性を確認するため、公開データベース(Swiss-Prot、TrEMBL、NCBI、PIR 等)に登録されている配列情報をもとにデータベースを構築し、アミノ酸配列を比較するとともに、Cry34Ab1 タンパク質と Cry35Ab1 タンパク質のアミノ酸配列について、データベース中のタンパク質との間に8つの連続するアミノ酸残基の同一性がないかを検索ソフト FINDPATTERNS で検索した結果、完全に一致するものはなかった。また80残基の範囲で35%以上の相同性を示すタンパク質について、検索ソフト FASTA を用いた検索も行ったが、相同性は検出されなかった。

以上のことから、Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質は、既知アレルゲン及びグルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質との間に一次構造において相同性を有しないと判断された。

なお、PAT タンパク質については、これまでに多くの評価がなされてきており、OECD バイオテクノロジーの規制監督の調和に関する作業グループが作成したコンセンサス文書にまとめられた PAT タンパク質のアレルギー誘発性に関する評価試験結果では、本タンパク質ならびにその供与体にアレルギー誘発性が知られていないこと、人工胃液中で15秒以内に消化されること、哺乳類の胃内環境を模した条件下では1分以内に失活すること、データベース GENBANK に登録されている既知アレルゲンとアミノ酸配列の相同性を示さないこと、加熱、酸性環境下で速やかに変性することが報告されている(参考文献5)。

(1)～(4)及び前項3の結果から総合的に判断し、Cry34Ab1 タンパク質、Cry35Ab1 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

Event DAS-59122-7 の T1S1 世代(遺伝子導入した組換え当代から2世代目)及び BC1 ハイブリッド(遺伝子導入した組換え当代から4世代目)との雑種第1代世代の各4個体について、サザンブロット分析したところ、3種類の遺伝子発現カセットが安定して後代品種に遺伝することが示された。

6 遺伝子産物(タンパク質)の代謝経路への影響

Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質は、他の *B. thuringiensis* の Cry タンパク質と同様に、植物体内で酵素として働くことは報告されていない。

PAT タンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートに対して高い基質特異性を有し、L-グルホシネートの光学異性体である D-グルホシネートをも基質としないこと

が報告されている。

以上から、これら遺伝子産物が、宿主であるトウモロコシの代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考察した。

7 宿主との差異に関する事項

Event DAS-59122-7 及び宿主であるトウモロコシの穀粒について、主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、栄養阻害物質、その他特定成分の分析、比較を行った。

主要構成成分についてタンパク質、脂質、繊維質、灰分及び炭水化物を分析したところ、タンパク質および灰分以外の成分では、Event DAS-59122-7 と非組換え対照品種との間に統計学的な有意差は認められなかった。また、タンパク質及び灰分についても、文献値の範囲内であった。

脂肪酸組成について、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸を分析したところ、オレイン酸を除き、統計学的有意差が認められたが、いずれも文献値の範囲内であった。

アミノ酸 18 種類について測定したところ、トリプトファン、イソロイシン、ヒスチジン、バリン、ロイシン、アルギニン、フェニルアラニン、プロリン、チロシンについて統計学的な有意差が認められたが、いずれも文献値の範囲内であった。

ミネラル類について、カルシウム、カリウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、ナトリウム、亜鉛を測定したところ、カルシウムを除き統計学的な有意差は認められなかった。また、カルシウムについても、文献値の範囲内であった。

ビタミン類について、 β -カロチン(ビタミン A)、ビタミン B1、ビタミン B2、葉酸、 α -トコフェノール(ビタミン E)を測定したところ、葉酸及び α -トコフェノール以外のビタミンには統計学的な有意差は認められなかった。また、葉酸及び α -トコフェノールについても、文献値の範囲内であった。

栄養阻害物質であるフィチン酸及びトリプシンインヒビターの分析を行ったところ、フィチン酸及びトリプシンインヒビターとも統計学的な有意差は認められなかった。

ラフィノース及びイノシトール、フルフラール、p-クマル酸、フェルラ酸についても分析を行ったが、フルフラールについては、いずれのサンプルからも検出されなかった。その他の成分については、統計学的な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、2003 年 10 月 31 日に米国環境保護庁 (EPA) に植物農薬登録申請を行い、その諮問機関 (Scientific Advisory Panel) で、2005 年 3 月に安全性の確認が終了した。また、2003 年 12 月 11 日に米国食品医薬品局 (FDA) と食品及び飼料としての安全性に関する協議を開始し、2004 年 10 月 4 日付けで承認が得られている。

2003 年 12 月 18 日、米国農務省 (USDA) の動植物検疫局 (APHIS) に無規制栽培許可の申請を行った。

また、カナダにおいては、2004 年 4 月 7 日にカナダ保健省 (Health Canada) に新規食品としての安全性確認申請を、また、カナダ食品検査庁 (Canadian Food Inspection Agency) に飼料としての安全性確認及び環境放出の許可申請を行った。

さらに、オーストラリア及びニュージーランド(2004 年 7 月)、韓国(2004 年 9 月)、台湾(2004

年 9 月)、南アフリカ(2005 年 2 月)において、本組換えトウモロコシの食品の安全性に係る申請が行われた。EU には、2005 年 1 月に輸入のための申請が行われ、栽培に関する申請も 2005 年中に行う予定とのことである。

9 栽培方法に関する事項

EventDAS-59122-7 と従来のトウモロコシの栽培方法の違いは、コウチュウ目害虫の防除に必要な薬剤の使用が軽減できること及び生育期間を通じて除草剤グルホシネートを利用できる点であり、それ以外は従来と同じである。

10 種子の製法及び管理方法に関する事項

EventDAS-59122-7 の種子の製法及び管理方法については、従来のトウモロコシ品種と同じである。

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 までの安全性に関する事項に加え、次に示された急性毒性試験及び亜急性毒性試験のデータを確認した。

1 . 急性毒性に関する試験

Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質が急性毒性を示さないことの確認するため、組換え微生物 *Pseudomonas fluorescens* で産生させた Cry34Ab1 タンパク質 2,700mg/kg、または、Cry35Ab1 タンパク質 1,850mg/kg、生後 2 ヶ月の雄マウス各 5 匹に単回強制経口投与したところ、試験終了時(摂取 2 週間後)まで何ら臨床症状は認められず、病理学的所見も認められなかった。

なお本投与量は、加工損失がないと仮定して、体重 50kg の日本人が、トウモロコシからタンパク質を摂取すると考えられる一日最大予想摂取量に換算すると、Cry34Ab1 タンパク質はその約 136 万倍、Cry35Ab1 タンパク質はその約 4,684 万倍に相当する。

さらに Cry34Ab1 タンパク質及び Cry35Ab1 タンパク質を、等モル比(1:3)になるように混合し、2 つのタンパク質を一緒にマウスに強制経口投与したところでも、臨床症状や病理学的所見は認められなかった。なお、このときの投与量は、Cry34Ab1 タンパク質 482mg/kg、Cry35Ab1 タンパク質 1,520mg/kg に相当する。

2 . 亜急性毒性に関する試験

Cry34Ab1 及び Cry35Ab1 タンパク質が、哺乳類に対して亜急性毒性を示さないことを確認するため、トウモロコシ EventDAS-59122 の割合を 35%になるように調整した飼料をラット(雄、雌各 12 匹)に対し 90 日間与えたところ、試験終了時に有意な毒性影響及び病理学的知見は観察されなかった。

評価結果

遺伝子組換えトウモロコシ(コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ *B. t. Cry34/35Ab1* Event DAS-59122-7)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」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ものと判断された。

参考文献

1. Watson SA. Corn: Amazing maize. General Properties. CRC Handbook of Processing and Utilization in Agriculture, vol II, Part 1 Plant Products. Wolf IA. (ed.) (1982) 3-29. CRC Press Inc., Florida.
2. Watson SA. Structure and Composition. Corn: Chemistry and Technology. Watson SA. Ransted PE. (eds.) (1987) 53-82. American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota.
3. OECD. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 6: Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2002)25. (2002)
4. ILSI (International Life Sciences Institute). ILSI Crop Composition Database (<http://www.cropcomposition.org>). Accessed 8/12/2003.
5. OECD. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. (1999)
6. White PJ, Pollack LM. Corn as a food source in the United States: Part II. Processes, Products, Composition and Nutritive Values. *Cereal Foods World*. (1995) 40: 756-762.
7. Moneret-Vautrin *et al*. L'allergie alimentaire au maïs existe-t-elle? *Allerg Immunol*. (1998) 30:230
8. Hefle SL, Nordlee JA, Taylor SL. Allergenic Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. (1996) 36(S): S69-S89.
9. MacKenzie D, McLean M. Who's afraid of GM feed? *FEED MIX* (2002) 10(3): 16-19.
10. Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH. Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol*. (1992) 18: 675-689.
11. Hertig C, Rebmann G, Bull J, Mauch, F, Dudler R. Sequence and tissue specific expression of a putative peroxidase gene from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol*. (1991) 16: 171-174.
12. Hohn T, Richards K, Genevieve-Lebeurier. Cauliflower mosaic virus on its way to becoming useful plant vector. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. (1982) 96: 194-236.
13. An G, Mitra A, Choi HK, Costa M, An K, Thornburg RW, Ryan CA. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible protease inhibitor II gene. *Plant Cell*. (1989) 1: 115-122.
14. Tinland, B. The integration of T-DNA into plant genomes. *Trends in Plant Science*. (1996) 1: 178-184.
15. Summary Report-2004-001. Locke ME, Weber N, Igo E, Dietrich N, Cressman RF, Luckring AK, Sanders CD, Hunt SL, Coats I. Summary of molecular characterization for corn rootworm-protected corn event DAS-59122-7.(2004) (未公表)
16. Herman RA. *et al*, Digestion Efficiency of Allergens and Non-Allergens in Simulated Gastric

- Fluid. Dow AgroSciences LLC, The Dow Chemical Company and Pioneer Hi-Bred International, Inc. unpublished report. Study ID: GH-C 5761. (2004) (未公表)
17. Herman RA. *et al*, Quantitative Measurement of Protein Digestion in Simulated Gastric Fluid. Regulatory Toxicology and Pharmacology (in press) (未公表)
 18. Futagami S, Commuri P. Digestion of Cry34Ab1 Protein in Simulated Gastric Fluid at 0.01mM Protein Concentration. (2005) (社内報告書)