

⑤)。

L-カナバニンは種子及びスプラウトの乾燥重の約 1.5%含まれている。

4 アレルギー誘発性に関する事項

これまで、アルファルファの摂食が原因で明確な食物アレルギーが生じたという報告はない。

5 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

他の植物同様に、アルファルファの病害は多く知られているが、それらがヒトに対する病原性をもつことは知られていない。

6 安全な摂取に関する事項

アルファルファの食品としての利用については、アルファルファ・スプラウト(もやし)が利用されているほか、主に開花 10%期に収穫された茎葉を粉砕したものがいわゆる健康食品として利用されている。これまでにアルファルファを食用に供して何らかの問題が生じたという報告はない。

7 近縁の植物種に関する事項

アルファルファの近縁種である他の *Medicago* 属の種において、有害生理活性物質の産生は知られていない。

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

J101 系統、J163 系統の形質転換に用いられたベクター PV-MSHT4 は、中間的に用いられたプラスミド A1、A2 から構築されたプラスミド A、中間的に用いられたプラスミド B1、B2、B3 から構築されたプラスミド B を用いて作出されたものである。これらのプラスミドは、いずれも *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*)あるいは非病原性の *E. coli* 由来のプラスミドから作製されたものであり、PV-MSHT4 には、プラスミド A1 由来の [CTP2] 領域、プラスミド A2 由来の [改変 *cp4 epsps*]-[E9 3'] 領域及び外骨格領域、プラスミド B2 由来の [P-eFMV]-[HSP70-Leader] 領域がクローニングされている。

2 性質に関する事項

プラスミド A、B 及び A1、A2、B1~B3 の制限酵素切断地図は明らかとなっており、また、これらのプラスミドからベクター PV-MSHT4 の作出のために用いた各構成要素の機能は明らかとなっている。

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

J101 系統、J163 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から単離した *cp4 epsps* 遺伝子配列に植物中での発現を高めるため、CP4 EPSPS タンパク質の機能活性を変更しないよう、塩基配列に変更を加えたものである。*Agrobacterium* sp. は、土壤中及び植物の根圏に存在する微生物類の一つである。

(2) 安全性に関する事項

Agrobacterium sp. は、土壤中及び植物の根圏に存在し、ヒトや家畜に対し病原性等の問題は

報告されていない。

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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株からクローニングされた。挿入 DNA の遺伝要素は以下の表のとおりであり、制限酵素による切断地図、機能等は明らかとなっている。

・ J101 系統、J163 系統への挿入 DNA

略 称	機 能
<i>cp4 epsps</i> 遺伝子カセット	
P-eFMV	プロモーター領域（遺伝子の転写に必要な配列） ゴマノハグサモザイクウイルス由来の重複エンハンサー-35Sプロモーター
HSP70-Leader	パチュエの熱ショックタンパク質遺伝子の 5' 非翻訳リーダー配列
CTP2	シロイヌナズナの <i>epsps</i> 遺伝子の葉緑体輸送ペプチド配列（CP4 EPSPS タンパク質を芳香族アミノ酸合成部位である葉緑体へ輸送するのに必要な配列）
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の合成 <i>epsps</i> 遺伝子配列
E9 3'	エンドウの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (rbcS) E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域（遺伝子の転写を終結させる配列）

3 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子には、ゴマノハグサモザイクウイルス由来の重複エンハンサー-35S プロモーターP-eFMV が連結されている（引用文献③）。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子には、エンドウの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域（E9 3'）が連結されている。

(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

J101 系統、J163 系統の作出に用いた発現ベクターPV-MSHT4 は、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 両境界型植物形質転換ベクターであり、その T-DNA の右境界配列から左境界配列との間に改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット（[P-eFMV] - [HSP70-Leader] - [CTP2] - [改変 *cp4 epsps*] - [E9 3']）を挿入して構築された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

- ・ J101、J163 系統は、発現ベクターPV-MSHT4 を用いて作出された。
- ・ 発現ベクターPV-MSHT4 の塩基数は 9,023bp である。本プラスミド・ベクターの塩基配列は明らかとなっている。
- ・ 発現ベクターPV-MSHT4 の各構成要素の機能は既に明らかとなっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

6 DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項

DNAの宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられ、発現ベクターPV-MSHT4のT-DNA領域が導入された。

導入方法の詳細は、R2336系統の植物組織に、プラスミド・ベクターPV-MSHT4を含む*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB I株と共置培養接種したものを、組織培養培地に移して、*Rhizobium radiobacter* AB I株の除菌を行った後、さらにグリホサートを添加した培地に置床し、増殖してきたカルス組織から植物体を再分化させた。

得られた再分化個体(=T₀世代)については、グリホサート耐性検定及びサザンブロット分析により導入遺伝子の確認が行われており、最終的にJ101系統及びJ163系統が選抜された。

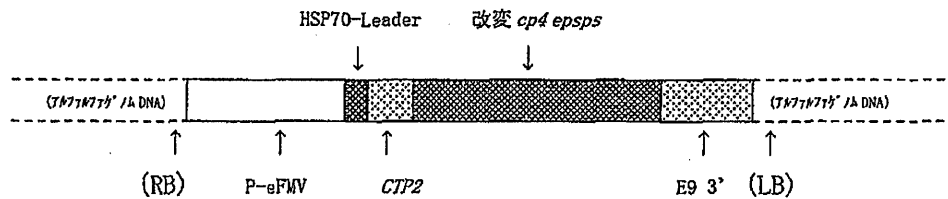
第6 組換え体に関する事項

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

J101系統、J163系統のゲノム中に挿入された改変 *cp4 epsps* 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い、さらに、挿入遺伝子の5'及び3'末端の配列を確認するためにポリメラーゼ連鎖反応法(PCR)を行った結果、1箇所に改変 *cp4 epsps* 遺伝子カセットの完全な1コピーがアルファルファゲノムに組み込まれていることが示された。また、プラスミド骨格は検出されなかった。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

・ J101系統、J163系統に挿入された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に関する事項

J101系統、J163系統における5'及び3'末端の挿入遺伝子接合領域のDNA配列を解析した結果、5'末端は右側境界領域、ポリリンカー配列、P-eFMVプロモーターが続く形で接合していることが示され、3'末端は、E9 3'からT-DNA由来のポリリンカー、左側境界領域に続いて、アルファルファゲノムに接合していることが示された。

また、決定された挿入遺伝子接合領域の塩基配列に基づいて、5'及び3'末端近傍配列に特異的なプライマー対を作成してPCR分析を行った結果、予想されたサイズの特異的なPCR増幅産物が得られた。

従って、J101系統、J163系統はいずれも完全な改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットがゲノム中に導入されており、目的以外のタンパク質を発現する可能性のあるオープンリーディングフレームは含まれていないと考えられた。

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

J101系統、J163系統でのCP4 EPSPSタンパク質の発現量について調べるため、カリフォルニア州、イリノイ州、ワシントン州の3箇所のほ場で収穫されたアルファルファ茎葉(計6つ)及びアイオワ州、ニューヨーク州、ウィスコンシン州で収穫されたアルファルファ茎葉(計3つ)のCP4 EPSPSタンパク質の発現量(計9つ)をELISA法で分析した。

この結果、J101 系統における CP4 EPSPS タンパク質発現量は、2001 年は平均 276 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重 (範囲：220~340 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)、2002 年は平均 238 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重 (範囲：160~340 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重) であった。J163 系統では、CP4 EPSPS タンパク質発現量は、2001 年は平均 317 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重 (範囲：270~380 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重)、2002 年は平均 223 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重 (範囲：140~340 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重) であった。

なお、J101 系統、J163 系統のスプラウトにおける CP4 EPSPS タンパク質の発現量は直接測定されていないが、J101 系統、J163 系統と全く同様の方法で同時に作出され、我が国における模擬的環境利用における環境安全性の認可を受けている J119 系統、J286 系統との掛け合わせ品種 (J101 \times J119 系統、J163 \times J286 系統) のスプラウトについてウエスタンブロット分析が行われている。この結果と、莖葉での発現量とを合わせて考えると、アルファルファ・スプラウトにおける CP4 EPSPS タンパク質の発現量は、開花 10%期の莖葉より高い傾向はあるもののほぼ同等と判断されている。

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

米国のほ場試験において収穫された J101 系統、J163 系統の莖葉における CP4 EPSPS タンパク質の最大発現量は、それぞれ 340 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重、380 $\mu\text{g/g}$ 新鮮重であった。これら、アルファルファの莖葉の水分含量を 80%とし、健康食品に含まれるアルファルファ乾燥粉末中の CP4 EPSPS タンパク質含量を加工損失がないと仮定して試算した場合、アルファルファにおける CP4 EPSPS タンパク質は 1.9mg/g 乾燥重となる。財団法人日本健康・栄養食品協会が策定したアルファルファ加工食品の規格基準における一日摂取目安量はアルファルファ乾燥粉末 20g/人日とされていることから、本 20g 中には最大 38mg の CP4 EPSPS タンパク質が含まれると推算される。

これは、日本人の一日一人当たりのタンパク摂取量 72.15g (平成 14 年国民栄養調査) の 0.053% となり、一日蛋白摂取量の有意な量を占めないと判断される。

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に関する知見

cp4 epsps 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* sp. CP4 株がアレルギーを誘発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に関する知見

CP4 EPSPS タンパク質が、既知アレルゲンと構造相同性を持たないことについては、既に安全性審査を経て承認された、ラウンドアップ・レディー・ダイズ 40-3-2 系統、ラウンドアップ・レディー・カノーラ RT-73 系統・RT-200 系統、ラウンドアップ・レディー・トウモロコシ NK603 系統、ラウンドアップ・レディー・ワタ 1445 系統においても確認されている。

(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 人工胃液による酸処理及び酵素処理

人工胃液中での CP4 EPSPS タンパク質の消化液に対する安定性を *in vitro* で評価したところ、人工胃液中の CP4 EPSPS タンパク質は、試験開始後 15 秒以内で検出限界以下に消化された。

なお、人工胃液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia, 2000) に記載されている方法に従って調製した。

② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理

人工腸液中での CP4 EPSPS タンパク質の消化性をウエスタンブロット分析により評価したところ、10 分後に CP4 EPSPS タンパク質の大半が失われ、100 分後には完全に消失することが確認された。

なお、人工腸液は、米国薬局方 (The United States Pharmacopeia, 2000) に記載されている

方法に従って調製した。

③ 加熱処理

CP4 EPSPS タンパク質を産生するラウンドアップ・レディー・大豆を用いた加熱試験では、熱処理によって脱脂大豆中での免疫反応性が 99%以上失われることが ELISA 分析によって確認されている。また、CP4 EPSPS タンパク質の酵素活性も 99%以上消失することが確認されている(引用文献⑨、⑩)。

なお、一般的にアルファルファをスプラウトとして摂食する場合は、生食されることが多い。
(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

CP4 EPSPS タンパク質が既知のアレルゲン等と機能上重要なアミノ酸配列を有するかどうかを確認するため、利用可能な全てのタンパク質データベース(AD4、TOXIN5、ALLPEPTIDES: SwissProt version 38+、TrEMBL、Genpept version 116 から構築されるデータベース、2003年10月時点)を用いて、アレルゲン、グリアジン及びグルテニンをキーワードとしてタンパク質を抽出し、相同性比較用データベースを構築してそのペプチド配列を比較した。

配列の比較は、データベース検索の標準法である FASTA 型アルゴリズムを使用した(Pearson and Lipman, 1988; Wilbur and Lipman, 1983; Pearson, 1990; Gibskov and Devereux, 1992; Doolittle, 1990)。また、CP4 EPSPS タンパク質のアミノ酸配列中に抗原決定基(エピトープ)を示す可能性のある配列が含まれているかを確認するために、連続する8つのアミノ酸による相同性検索を行った結果、既知アレルゲンと相同性を示す配列は含まれていなかった。

既知アレルゲンとの相同性比較の結果、CP4 EPSPS タンパク質は既知アレルゲン及びグリアジンあるいはグルテニンと免疫学的な類似性を示す配列を共有していないことが確認された。

(1)～(4)及び前項3から総合的に検討した結果、CP4 EPSPS タンパク質のアレルギー誘発性については、その安全性を確認しようと判断された。

5 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

J101 系統、J163 系統に挿入された遺伝子の安定性を確認するため、J101 系統と J163 系統の T₀ 世代及び J101 系統と J163 系統の掛け合わせ品種のサザンブロット分析を行ったところ、J101 系統の T₀、J163 系統の T₀、及び J101 系統と J163 系統の掛け合わせた品種との間で一致したバンド・パターンが認められたことから、J101 系統及び J163 系統では挿入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが示された。

6 遺伝子産物(タンパク質)の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS タンパク質は、芳香族アミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路を触媒し、植物が固定する炭素のおよそ5分の1に関与していると推測されている(引用文献⑪、⑫)。

本経路における炭素の流れは、3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素の活性による調節を受け制御されることが証明されているが(引用文献⑬、⑭)、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階は、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制されることはほとんどないことが知られている(引用文献⑬、⑭)。

これらのことは、EPSPS タンパク質が本経路における律速酵素ではないことを示唆するものであり、仮に EPSPS タンパク質活性が増加したとしても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高くなることはないと推測され、その代謝に影響を及ぼすことは考えにくい。