

ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及び
ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統に係る
食品健康影響評価に関する審議結果（案）

I 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、ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統及びラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統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10月4日、関係書類を接受）

II 評価対象食品の概要

名称 : ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統
ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統
性質 : 除草剤グリホサート耐性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : モンサント社（米国）
Forage Genetics Incorporated 社（米国）

遺伝子組換えアルファルファ「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J101 系統」（以下、J101 系統）、「ラウンドアップ・レディー・アルファルファ J163 系統」（以下、J163 系統）は *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素発現遺伝子（改変 *cp4 epsps* 遺伝子）を導入することにより、CP4 EPSPS タンパク質が発現し、除草剤グリホサート（ラウンドアップ）の影響を受けずに生育することができるアルファルファである。

本食品の宿主であるアルファルファは、食用としては、いわゆる健康食品の素材として用いられているほか、播種後、数日間生育させたもやし（アルファルファ・スプラウト）がサラダ向けで生食される。

III 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

J101 系統、J163 系統の宿主として用いたアルファルファは、マメ科 *Medicago* 属のアルファルファ (*Medicago sativa* L.) であり、いずれの系統の作出にも、アルファルファ品種の育種母本群である R2336 系統が用いられている。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

J101 系統、J163 系統に挿入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株から分離された。

(3) 導入DNAの性質及び導入方法

植物中での発現量を高めるため塩基配列の一部を変更した改変 *cp4 epsps* 遺伝子が、組換え植物のゲノムに組み込まれている。この改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性の CP4 EPSPS タンパク質を発現させる。このタンパク質は、除草剤グリホサート耐性を植物に付与する。

アルファルファ品種の育種母本群である R2336 系統に、この遺伝子を含んだプラスミド・ベク

ターPV-MSHT4 をアグロバクテリウム法で導入した。

2 宿主の食経験に関する事項

アルファルファは、古くから牧草として栽培されてきたものであり、食用としては、播種後3～7日後の幼苗がアルファルファ・スプラウトとして食されるほか、茎葉を粉碎し圧縮したもの、あるいはそれを固めたものがいわゆる健康食品等として利用されている。

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

アルファルファの可食部である茎葉部の主要構成成分（水分、タンパク質、灰分、炭水化物、総脂質）は、水分77%、タンパク質17-27%、灰分9.5%と報告されている（引用文献①）。炭水化物、総脂質については文献報告がない。また、アルファルファ・スプラウトについては、水分91.14%、粗タンパク質45%、粗脂質7.8%、炭水化物43%、灰分4.5%と報告されている（引用文献②）。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質（栄養素の吸収、代謝を阻害する物質。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

アルファルファの食品としての利用における有害な物質として、サポニン及びレーカナニンが報告されている（引用文献③）。発芽後8日目までの間に、アルファルファ中のサポニン蓄積量は2.1mol/gから6.0mol/gまで増加する。これはアルファルファ・スプラウトの乾物重の0.6%に相当するが、脱脂ダイズ粉末等と同程度の含有量である（引用文献④）。

また、レーカナニンについては、種子及びスプラウトの乾物重の約1.5%含まれており、アルギニンにより生成される（引用文献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

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

アルファルファ・スプラウトは、播種後、3～7日で食用に供される状態に生育する。また、いわゆる健康食品（サプリメント）としての利用では、茎葉の栄養成分が最も高まった開花10%期頃に収穫されているとのことであり、J101系統、J163系統の栽培においても変わりはない。また、収穫後の収穫物の使用方法や貯蔵方法にも相違はない。

(2) 摂取（可食）部位

J101系統、J163系統の可食部位は、従来のアルファルファと変わらない。

(3) 摂取量

アルファルファの摂取量は正確に把握されていないが、可食部位等に変わりはないことから、J101系統、J163系統の摂取量も従来のアルファルファと変わらないと考えられる。

(4) 調理及び加工方法

非組換えのアルファルファとJ101系統、J163系統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に関する事項

J101系統、J163系統は、*cp4 epsps* 遺伝子の導入により、それぞれCP4 EPSPS タンパク質を産生することが、宿主との唯一の相違点と考えられる。

以上、1~6により、J101系統、J163系統の安全性評価においては、既存のアルファルファ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

アルファルファの食品としての利用においては、いわゆる健康食品として茎葉を粉碎した乾燥粉末が用いられる。

J101系統、J163系統のゲノムに組み込まれた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、CP4 EPSPS タンパク質を産生し、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育することができる。

この作用により、ほ場における、除草剤グリホサート耐性をもたない一般の雑草の防除が可能になる。

また、播種後 3~7 日の幼苗をスプラウト（もやし）として消費するが、スプラウト生産は室内でおこなわれるため、グリホサートを含む除草剤を使用することはない。

第3 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け等（学名、品種及び系統名等）に関する事項

宿主植物として用いたアルファルファは、マメ科の *Medicago sativa* L. の育種母本群 R2336 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

アルファルファの属する *Medicago* 属は、60 種以上の種からなる。

現在、商業栽培が行われているアルファルファは、*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*（紫花アルファルファ）、*Medicago sativa* L. subsp. *falcata*（黄花アルファルファ）の2つの亜種とこれらの交雑種が存在しており、栽培種の多くは、*Medicago sativa* L. subsp. *sativa* に属する。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファは、サポニン、L-カナバニンといった有害物質を産生することが報告されている（引用文献③）。

(1) サポニン

サポニンは植物界に広く分布する配糖体で、ステロイドやトリテルペノイドを非糖部とする一群の化合物の総称であり、その水溶液が著しい起泡性を持ち、溶血作用を示す（引用文献⑤）。発芽したアルファルファには発芽後 8 日目までの間に徐々にトリテルペンのサポニンが蓄積されるが、量的にヒトに対して有害な量とは考えられないとの報告がある（引用文献④）。

アルファルファのサポニンは、トリテルペノイドグルコシドの混合体であり、化学構造からメディカジェニック酸グリコシド、ヒドラジングリコシド、ソヤサポニン、ザーニック酸グリコシドに分類され、メディカジェニック酸グリコシド、ソヤサポニンの2種類で総サポニンの約 90% を占めている（引用文献⑥）。これら特定のサポニンがヒトに対して有害であるとの報告は見られないが、ザーニック酸グリコシドについては、ヒトが摂取した際に苦味と咽喉への刺激を生ずることが報告されている。（引用文献⑥）

(2) L-カナバニン

L-カナバニンはアルギニンの構造類似体として作用し、例えばアルギニンに関する拮抗阻害剤として作用したり、アルギニンが阻害する酵素活性をアルギニンと同様に阻害する（引用文献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	7 ^o 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 7 ^o プロモーター
HSP70-Leader	パチュエア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 (<i>rbcS</i>) 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⑧）。

(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。

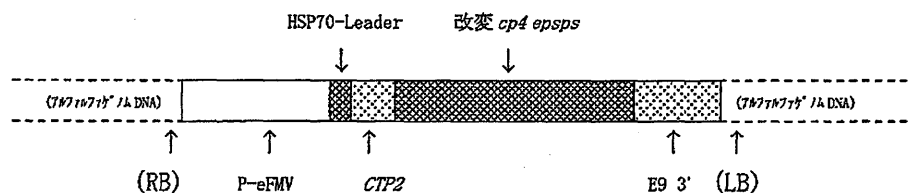
第6 組換え体に関する事項

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 μ g/g 新鮮重 (範