

困：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) であつた。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) であつた。

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×J119 系統、J163×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、茎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%期の茎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 系統の茎葉における 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  $\mu\text{g/g}$  新鮮重であつた。これら、アルファルファの茎葉の水分含量を 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うると判断された。

### 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 T<sub>0</sub> 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 T<sub>0</sub>、J163 系統の T<sub>0</sub>、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。

また、EPSPS タンパク質はホスホエノールピルビン酸(PEP)及びシキミ酸-3-リン酸(S3P)と特

異的に反応することが知られているが(引用文献⑮)、この PEP と S3P 以外に唯一 EPSPS タンパク質と反応することが報告されているのは、S3P の類似体であるシキミ酸のみである(引用文献⑯)。

しかしながら、EPSPS タンパク質とシキミ酸の反応性は、EPSPS タンパク質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であり、したがって、シキミ酸が植物中で EPSPS タンパク質と反応することはないと考えられ、代謝に影響は及ぼすことは考えにくい。

#### 7 宿主との差異に関する事項

J101 系統、J163 系統と非組換えアルファルファとの主要構成成分、アミノ酸組成等を比較するため、米国内の 5 箇所のは場から適期に茎葉を収穫し、分析に供試した。

なお、対照のアルファルファとしては、各は場で栽培された非組換えの商業アルファルファ 12 品種とラウンドアップ・レディー・アルファルファの BC2 世代から分離によって得られた Null 個体(RR(-))の後代が用いられている。

この結果、J101 系統、J163 系統の主要構成成分(灰分、炭水化物、水分、タンパク質、総脂質、アミノ酸組成、無機物(カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛)、繊維(酸性デタージェントファイバー(ADF; Acid Detergent Fiber)、中性デタージェントファイバー(NDF; Neutral Detergent Fiber)、リグニン)について、非組換え商業アルファルファ 12 品種及び Null 個体の分析値の範囲内であった。

また、J101 系統、J163 系統、アルファルファ商業品種 6 品種ならびに Null 個体を用いて、開花 10%期の茎葉とスプラウトにおける総サポニン、L-カナバニン、ザーニック酸の含有量を測定したところ、すべての分析値において、J101 系統、J163 系統は、従来品種とほぼ同等の値であった。

#### 8 諸外国における認可、食用等に関する事項

J101 系統、J163 系統については、米国では、2003 年 10 月、米国食品医薬品局に食品及び飼料利用のための申請を行い、2004 年 12 月に認可された。また、2004 年 4 月、米国農務省に無規制栽培(商業栽培)のための申請を行い、同年 10 月、認可された。

カナダでは、2003 年 12 月、カナダ保健省及びカナダ食品検査庁へ食品及び飼料利用のための申請を行った。

#### 9 栽培方法に関する事項

J101 系統、J163 系統と従来のアルファルファの栽培方法の違いは、栽培期間中に除草剤グリホサートが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

J101 系統、J163 系統の種子の製法及び管理方法については、従来のアルファルファ品種と同じである。

### 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な事項

第 2 から第 6 までにより安全性の知見は得られており、次に示された試験は必要ないと判断された。なお、CP4 EPSPS タンパク質については、これまでマウスを用いた急性経口投与毒性試験の報告があり、572mg/kg 体重/マウスの投与でも有害な影響は認められていない。

1. 急性毒性に関する試験
2. 亜急性毒性に関する試験
3. 慢性毒性に関する試験

4. 生殖に及ぼす影響に関する試験
5. 変異原性に関する試験
6. がん原性に関する試験
7. その他必要な試験 (腸管毒性試験、免疫毒性試験、神経毒性試験、栄養試験等)

#### IV 評価結果

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 系統及び J163 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」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。

#### V 引用文献

- ① National Research Council, United States-Canadian Tables of Feed Composition, 1982
- ② USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 17, 2004
- ③ Peary, W., and Peavy, W. 2004. Natural toxins in sprouted seeds: separating myth from reality [http://chetday.com/sprouttoxins.html] (accessed 11/04).
- ④ Bialy, Z., Jurzysta, M., Oleszek, W., Piacente, S., and Pizza, C. 1999. Saponins in alfalfa (*Medicago sativa* L.) root and their structural elucidation. *J. Agric. Food. Chem.* 47:3185-3192.
- ⑤ 生化学辞典, 1990. 東京化学同人
- ⑥ Oleszek, W. 1996. Alfalfa saponins: structure, biological activity, and chemotaxonomy. (New York: Plenum Press)
- ⑦ Fling, M., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide Sequence of the Transposon Tn7 Gene Encoding an Aminoglycoside-Modifying Enzyme, 3(9)-O-Nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 13(9): 7095-7106.
- ⑧ Richins, R. D., H. B. Scholthof, and R. J. Shepard. 1987. Sequence of Figwort Mosaic Virus DNA (Caulimovirus Group). *Nucl. Acids Res.* 15: 8451-8466.
- ⑨ Padgett, S. R. et al. 1993b. Glyphosate Tolerant Soybeans in Puerto Rico in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation, Study #92-01-30-01 (Monsanto), MSL-12902.
- ⑩ Padgett, S. R., Nida, D. L., Biest, N. A., Bailey, M. R. and Zobel, J. F. 1993c. Glyphosate Tolerant Soybeans in the U. S. in 1992: Field Test, Processing Studies & Analytical Evaluation, Study #92-01-30-02 (Monsanto), MSL-12906.
- ⑪ Haslam, E. 1974. The Shikimate Pathway. John Wiley and Sons, New York, New York.
- ⑫ Haslam, E. 1993. Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites, John Wiley and Sons, Chichester, England.
- ⑬ Herrmann, K. M. 1983. The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. In *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. K. M. Herrmann and R. L. Somerville, eds. Addison-Wesley, Reading, MA. 301-322.
- ⑭ Weiss, U. and J. M. Edwards. 1980. Regulation of the Shikimate Pathway. In *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley and Sons, New York. pp287-301.
- ⑮ Gruys, K. J., M. C. Walker, and J. A. Sikorski. 1992. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *E. coli*. *Biochem.* 31, 5534-5544.

安全性審査の手続を経た遺伝子組換え食品一覧

厚生労働省医薬食品局食品安全部  
平成16年12月9日現在

No.	対象品種/品目	名称	性質	申請者/開発者等	
1	じゃがいも	ニューリーフ・ジカ <sup>®</sup> 任 BT-6系統	害虫抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
2	じゃがいも	ニューリーフ・ジカ <sup>®</sup> 任 SPBT02-05系統	害虫抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
3	じゃがいも	ニューリーフ・プラス・ジカ <sup>®</sup> 任 RBMT21-129系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
4	じゃがいも	ニューリーフ・プラス・ジカ <sup>®</sup> 任 RBMT21-350系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
5	じゃがいも	ニューリーフ・プラス・ジカ <sup>®</sup> 任 RBMT22-82系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
6	じゃがいも	ニューリーフY・ジカ <sup>®</sup> 任 RBMT15-101系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
7	じゃがいも	ニューリーフY・ジカ <sup>®</sup> 任 SEMT15-15系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
8	じゃがいも	ニューリーフY・ジカ <sup>®</sup> 任 SEMT15-02系統	害虫抵抗性 ウイルス抵抗性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
1	大豆	ラウンドアップ・レイ <sup>®</sup> ・大豆 40-3-2系統	除草剤耐性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
2	大豆	260-05系統	高オレイン 酸形質	デュポン株式会社	Optimum Quality Grains L.L.C. (米国)
3	大豆	A2704-12	除草剤耐性	アベンティス クロップ サイ エンス オバギ <sup>®</sup> 株式会社	Bayer CropScience (ドイツ)
4	大豆	A5547-127	除草剤耐性	アベンティス クロップ サイ エンス オバギ <sup>®</sup> 株式会社	Bayer CropScience (ドイツ)
1	てんさい	T120-7	除草剤耐性	アベンティス クロップ サイ エンス オバギ <sup>®</sup> 株式会社	Bayer CropScience (ドイツ)
2	てんさい	ラウンドアップ・レイ <sup>®</sup> ・テンサイ 77系統	除草剤耐性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国) Syngenta Seeds AG (スイス)
3	てんさい	ラウンドアップ・レイ <sup>®</sup> ・テンサイ H7-1系統	除草剤耐性	日本モンサント 株式会社	Monsanto Company (米国)
1	とうもろこし	Bt11	害虫抵抗性 除草剤耐性	シジエンタ シード株式 会社	Syngenta Seeds AG (スイス)
2	とうもろこし	Event 176	害虫抵抗性	シジエンタ シード株式 会社	Syngenta Seeds AG (スイス)