

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

ステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統

平成24年7月5日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
(1)	遺伝的素材に関する事項	3
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	4
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
3	宿主に関する事項	5
(1)	学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
(2)	遺伝的先祖に関する事項	5
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	5
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	5
(5)	ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
(6)	自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	5
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項	6
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	6
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
4	ベクターに関する事項	7
(1)	名称及び由来に関する事項	7
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	7
(4)	伝達性に関する事項	7
(5)	宿主依存性に関する事項	7
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	7
(7)	発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	8
5	挿入遺伝子に関する事項	8
(1)	供与体に関する事項	8
(2)	遺伝子の挿入方法に関する事項	8
(3)	構造に関する事項	9
(4)	性質に関する事項	9
(5)	純度に関する事項	13
(6)	コピー数に関する事項	13
(7)	安定性に関する事項	13

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	1 4
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	1 4
(10) 外来の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	1 4
6 組換え体に関する事項	1 5
(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項	1 5
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	1 5
(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項	1 5
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	1 6
(5) 宿主との差異に関する事項	1 7
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	2 0
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	2 0
(8) 不活化法に関する事項	2 0
(9) 外国における認可等に関する事項	2 1
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	2 1
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	2 1
7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項	2 1
IV 審議結果	2 1
V 参考文献及び参考資料	2 1

「ステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統」に係る安全性確認

I はじめに

ステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統（以下「MON87769 ダイズ」という。）について、平成 23 年 7 月 6 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : ステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統
性 質 : ステアリドン酸産生性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

MON87769 ダイズは、オメガ-3 脂肪酸の 1 つであるステアリドン酸（以下「SDA」とする。）の安定した生産性を付与するため、 $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする改変 *Nc.Fad3* 遺伝子が導入されたダイズである。*Pj.D6D* 遺伝子の供与体はサクラソウ属の *Primula juliae* であり、改変 *Nc.Fad3* 遺伝子の供与体は *Neurospora crassa*（アカパンカビ）である。 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び $\Delta 15$ デサチュラーゼの働きにより、MON87769 ダイズの種子では、従来のダイズの種子には含まれない SDA 及び γ -リノレン酸が産生され、それに伴い、従来のダイズ種子と比較してリノール酸の含有量が減少する。

また、MON87769 ダイズの作出過程における選抜マーカーとして利用するため、改変 CP4 EPSPS たん白質をコードする改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、土壌細菌の *Agrobacterium sp.* CP4 株である。改変 CP4 EPSPS たん白質の働きにより、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されるため、除草剤グリホサートを用いた形質転換体の選抜が可能となる。なお、MON87769 ダイズは、その後の遺伝的分離により、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たず、*Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子のみを持つ個体を選抜したものである。

MON87769 ダイズと既存のダイズを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そこで、遺伝子組換え操作により付与された性質について安全性を評価したところ、飼料としての安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、MON87769 ダイズが飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、ダイズは主に大豆油かすの形態で飼料に利用されている。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

MON87769 ダイズの宿主植物はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine*

max (L.) Merr. の商業品種 A3525 である。

Δ6 デサチュラーゼをコードする *Pj.D6D* 遺伝子は、サクラソウ属の *Primula juliae* に由来する。Δ15 デサチュラーゼをコードする改変 *Nc.Fad3* 遺伝子は、自然環境中に普遍的に存在する真菌であるアカパンカビ (*Neurospora crassa*) (Turner *et al.*, 2001) に由来する *Nc.Fad3* 遺伝子の塩基配列を一部改変している。

改変 CP4 EPSPS たん白質をコードする改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列を一部改変している。なお、遺伝子導入の後、従来の育種法により、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たず、*Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子のみを持つ個体を選抜している。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるダイズは、優れたたん白質の供給源であり、主に育すう・成鶏用、ブロイラー用、養豚用、乳牛用及び肉牛用飼料の原料として用いられている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON87769 ダイズ及び非組換えダイズの主要構成成分(たん白質、脂質、灰分、水分、炭水化物、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維) ビタミン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成) 及び有害生理活性物質(トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン、スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸) についての分析値及び文献値が明らかとなっており、それらを比較することによる差異の有無の確認が可能である(OECD, 2001、ILSI, 2008)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON87769 ダイズに導入されているのは、*Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセットのみである。MON87769 ダイズは、Δ6 デサチュラーゼ及び Δ15 デサチュラーゼを発現することにより、従来のダイズの種子には含まれない SDA 及び γ-リノレン酸含有量が増加し、リノール酸含有量が減少する。これらの点を除けば、MON87769 ダイズは既存のダイズと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取(可食) 部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について既存のダイズと相違は認められない。

(1) ~ (4) より、MON87769 ダイズの飼料としての安全性評価においては、既存のダイズとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON87769 ダイズは、炭素数：不飽和結合数が 18:4 のオメガ-3 脂肪酸である SDA の産生性が新たに付与されている。SDA は生体内において長鎖オメガ-3 脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA(20:5))及びドコサヘキサエン酸(DHA(22:6))等に代謝される。MON87769 ダイズは、EPA 及び DHA 等の持続可能な供給源として、SDA を含む油を製造する目的で開発された。なお、飼料としての利用目的及び利用

方法については既存のダイズと変わらない。

3 宿主に関する事項

80 (1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

MON87769 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr.の商業品種 A3525 である。

85 (2) 遺伝的先祖に関する事項

Glycine 属はアジアとオーストラリアを起源とし、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分かれる。*Soja* 亜属にはダイズ(*G.max*)の他に、その野生近縁種であるツルマメ(*G. soja* Sieb. and Zucc.)が存在し、共に一年生である。

90 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズに含まれる有害生理活性物質として、主にトリプシンインヒビター及びレクチンが含まれている他、イソフラボン、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が含まれていることが知られている(OECD2001)。

トリプシンインヒビターは、たん白質の分解を妨害することにより、結果として動物の生育に悪影響を及ぼすが(Liener,1994)、ダイズの加工過程における加熱により不活化され、実際に摂取するダイズ製品中に含まれるトリプシンインヒビターの量はごくわずかであると考えられる(OECD,2001)。

レクチンは、細胞膜を構成する糖タンパクや糖脂質の糖と結合することで、細胞の凝集や細胞分裂を引き起こす。レクチンは生で摂取された場合には動物の生育を阻害し、場合によっては死をもたらすこともあるが、トリプシンインヒビター同様、レクチンの活性も加熱により大きく減少することが報告されている。したがって、実際に摂取するダイズ製品に含まれるレクチンの量はごくわずかであると考えられる(Liener,1994)。

なお、ダイズは長い食経験の中で、これまでに内在性の有害生理活性物質によりヒトや動物の健康に影響を及ぼしたという報告はない(OECD, 2001)。

105 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

ダイズは種子植物であり、ダイズが家畜等に寄生又は定着することはない。

110 (5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

ダイズの主要病害として、立ち枯れ病、ダイズシスト線虫及びダイズさび病が知られているが、これらの病原体のヒトや家畜等に対する病原性を示す報告はない(Faghihi and Ferris, 2006; Dorrance *et al.*, 2007; Pedersen, 2008)。

115 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

ダイズは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

120 ダイズは一年生の種子植物で、高い自家受粉率を示し、通常、他家受粉率は 1%
未満となっている(Caviness,1966; OECD,2000)。北半球では 4 月から 5 月にかけて播種が行われる。ダイズ種子は土壌温度が 10℃に達すると発芽し、5~7 日の期間で地上へ出てくる (OECD,2000)。栄養成長期は約 40 日ほどであり、この時期にも根粒形成は行われているが、完全に機能しているものではない。ダイズは気温が 25~30℃に達すると急速に生育を始める。夏の終わりになると莢の形成が始まり、収穫は秋に行われる。ダイズにおける有性生殖周期は約 100 日~160 日であるが、品種や栽培地によっても異なる(Beversdorf,1993)。

125 *Soja* 亜属には、栽培ダイズ品種である *G. max* 及び一年生野生種であるツルマメ(*G. soja* Sieb. and Zucc.)が属している。ツルマメは中国、台湾、日本、韓国及びロシアに生息しており、*G. max* との自然交雑が可能である(Hymowitz,2004)。

130 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

 ダイズの飼料としての利用形態は大豆油かす、大豆皮、きなこ、エクストルーダー処理大豆等が挙げられる。中でも約 48%のたん白質と 1.5%以下の脂質が含まれる大豆油かすは(SMIC,2006)、その栄養成分、供給量、そして価格面での利点のため、補助たん白質源として家畜用飼料に幅広く利用されている。

135 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

 ダイズにはトリプシンインヒビター及びレクチン等の有害生理活性物質が含まれるが、これらは加工段階で適切な加熱処理を施すことにより、不活性化することができるため、大豆油かすは飼料として安全に使用されている。

140 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

145 栽培ダイズ品種は一年生であり、種子によって繁殖する。ダイズ種子に休眠性はなく(TeKrony *et al.*, 1987)、寒さに弱いため(Raper and Kramer, 1987)、ほ場に種子が残っていたとしても、次の生育期まで越冬して生存する可能性は低い。休眠性がないため、適切な温度と湿度であればダイズ種子はすぐに発芽し、自生植物として生育する。しかし、このような自生植物は秋冬の霜により枯死する。仮にこのようなこぼれ落ち種子が自生したとしても、物理的あるいは化学的な従来の方法で防除することができる(OECD, 2000)。

150 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

 ダイズと同じ *Soja* 亜属に属する近縁種として、ツルマメ(*G. soja* Sieb. et Zucc.)が知られている。ツルマメは主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している (浅野, 1995; 高橋ら, 1996; 沼田ら, 1997; 大橋, 1999)。

155 ダイズの祖先であるツルマメにはトリプシンインヒビター(Mies and Hymowitz, 1973; Natarajan *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008)、ラフィノースやスタキオース

(Hymowitz and Collins, 1974) 及びフィチン酸(Raboy and Dickinson, 1993)といったダイズに含まれる有害生理活性物質が含まれていることが知られている。

160 4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON87769 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMPQ1972 は、中間プラスミド A~F から構成される合成ベクターである(参考資料 1)。この導入用プラスミドに病原性はなく、ヒト及び家畜等に対する有害性は知られていない。

165

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の塩基数は 16,465 bp である。各構成要素の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかにされている(参考資料 1, 2)。導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の構築に用いられた全ての中間プラスミドは非病原性の *Escherichia coli* 又は *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) に由来するものであり、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない

170

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 及びその合成に用いた中間プラスミドには、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードする *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に含まれており、*E. coli* や *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 中での選択マーカーとして使用された(参考資料 1)。なお、*aadA* 遺伝子が作出された MON87769 ダイズ中に存在しないことはサザンブロット分析によって確認されている(参考資料 4)。

175

180

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 は伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

185

(5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 には外側骨格領域に広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *ori V* 及び *ori-pBR322* が組み込まれているが、植物及び家畜等が導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の宿主となることはない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON87769 ダイズ中には、これら複製開始領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認されている。

190

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 は、*Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA I 並びに改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA II を有している。導入用プラスミド PV-GMPQ1972 は中間

195

プラスミドA~Fを用いて作出されており、その方法の安全性は確認されている(参考資料1)。

200 (7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

205 導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の有する 2 つの T-DNA 領域を、アグロバクテリウム法により従来商業ダイズ品種 A3525 に導入することにより作出されている。なお、T-DNA II を構成する改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、MON87769 ダイズを作出する過程で形質転換体の選択マーカーとして使用されたが、その後の遺伝的分離により、MON87769 ダイズには含まれていない。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

210 MON87769 ダイズに導入された *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子は、それぞれ *P. juliae* 及び *N. crassa* に由来する。

また、MON87769 ダイズ作出の過程で選抜マーカーとして使用された *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

215 ② 安全性に関する事項

P. juliae が属する *Primula* (サクラソウ属) は、一般的に Primrose (和名：サクラソウ) として知られている植物の属である。この属の植物は葉に相当量の SDA を含有している。*Primula* (サクラソウ属) は薬草として知られており、花、種子、葉及び根など、植物体のあらゆる部分が医療目的で用いられている (Bown, 1995)。

220 *N. crassa* が属する *Neurospora* (アカパンカビ属) は、古くから遺伝学研究や生物学研究に広く使用されているモデル生物である。そのため、*Neurospora* に関する文献も数千報に及んでいる (Perkins and Davis, 2000a)。*Neurospora* が食品として安全であることを述べた総説もある (Perkins and Davis, 2000b)。

225 *N. crassa* は自然環境中に普遍的に存在する (Turner *et al.*, 2001) が、人や家畜の健康を害することはない。これまでに *N. crassa* の経口摂取が食物アレルギーの原因となることを示す証拠はない。以上のことから、*N. crassa* は病原性やアレルギー誘発性を持たないと考えられる。これらのデータにより、

230 MON87769 ダイズで発現される改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの供与体について、その安全性が裏づけられている。

Agrobacterium sp. CP4 株は土壌中に一般的に存在する微生物類の一つであり、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

235 MON87769 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMPQ1972 は、中間プラスミドであるベクターA~F から構成される合成ベクターである。

240 導入用プラスミド PV-GMPQ1972 を含むアグロバクテリウムを分裂組織と共置
培養した後、グリホサートを含む選択培地に入れて形質転換されていない細胞を
除去し、カルベニシリン及びセフトキシムを添加してアグロバクテリウムを除
去した。その後、選抜された細胞から植物体を再分化させ、目的とする表現型を
示す個体を選抜し、生育特性等の評価を行った。

245 得られた再分化個体(R₀)を自殖させることにより R₁ 世代を作成した。R₁ 世代に
おいて、T-DNA I 領域 (*Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発
現カセットを含む領域) が 1 ヶ所にホモで挿入され、T-DNAII (改変 *cp4 epsps* 遺
伝子発現カセットを含む領域) が分離した 1 個体をインベーター分析及びサザンブ
ロット分析により選抜した。この R₁ 世代から自殖を繰り返して得られた後代を対
象に、形態特性についての評価を行い、MON87769 ダイズを最終的な商品化系統
として選抜した。

250 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

MON87769 ダイズへ導入された *Pj.D6D* 遺伝子は、ダイズに由来する *7Sa'*
プロモーターによりその発現を制御されている (Doyle *et al.*, 1986)。

255 また、MON87769 ダイズへ導入された改変 *Nc.Fad3* 遺伝子は、ダイズに由来
する *7Sa* プロモーターによりその発現が制御されている (Wang and Dubois,
2004)。

なお、*7Sa'* プロモーター及び *7Sa* プロモーターは主に種子の登熟期に働くプ
ロモーターであり、完熟種子での発現は比較的低いことが報告されている
(Wang and Dubois, 2004; Allen *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1986)。

260 *CTP2* 標的配列及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子は Figwort mosaic virus に由来す
る *FMV* プロモーターによりその発現が制御されている (Rogers, 2000)。

② ターミネーターに関する事項

265 MON87769 ダイズへ導入された *Pj.D6D* 遺伝子のターミネーター(T-*tml*)は、
R. radiobacter (*A. tumefaciens*) のオクトピン型 Ti プラスミドの *tml* 遺伝子の
3'末端非翻訳領域である (Kemp *et al.*, 2000)。

また、MON87769 ダイズへ導入された改変 *Nc.Fad3* 遺伝子のターミネーター
(T-*E9*)は、*Pisum sativum* (エンドウ) のリブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラ
ーゼ小サブユニットをコードする *rbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である。

270 *CTP2* 標的配列及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーター(T-*E9*)は、*P.*
sativum のリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコード
する *rbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域である (Coruzzi *et al.*, 1984)。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

275 導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の各構成要素の機能は既に明らかになっ
ており、既知の有害塩基配列は含まない。各構成要素の機能は次項のとおり。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*Pj.D6D* 遺伝子、改変 *Nc.Fad3* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

280

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>Pj.D6D</i> 遺伝子発現カセット	
7S α プロモーター	ダイズの β -コングリシニン貯蔵たん白質(alpha'-bcsp)をコードする <i>Sphas1</i> 遺伝子の転写を誘導するプロモーター及びリーダー配列 (Doyle <i>et al.</i> , 1986)。mRNA の転写を種子特異的に誘導する。
<i>Pj.D6D</i> 遺伝子	<i>Primula juliae</i> (サクラソウの 1 種)に由来する $\Delta 6$ デサチュラーゼのコード配列 (Ursin <i>et al.</i> , 2008)。
<i>tml</i> ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)のオクトピン型 Ti プラスミドの <i>tml</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域 (Kemp <i>et al.</i> , 2000)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。
改変 <i>Nc.Fad3</i> 遺伝子発現カセット	
7S α プロモーター	<i>G. max</i> の β -コングリシニン貯蔵たん白質をコードする遺伝子 (<i>Sphas2</i>) の転写を誘導するプロモーター及びリーダー配列 (Wang and Dubois, 2004)。mRNA の転写を種子特異的に誘導する。
改変 <i>Nc.Fad3</i> 遺伝子	<i>Neurospora crassa</i> (アカパンカビ)の $\Delta 15$ デサチュラーゼのコード配列 (Ursin <i>et al.</i> , 2006)。
<i>E9</i> ターミネーター	<i>P. sativum</i> のリブローソム-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。
改変 <i>cp4epsps</i> 遺伝子発現カセット	
<i>FMV</i> プロモーター	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーター (Rogers, 2000)。植物細胞内での転写を誘導する。
<i>ShkG</i> リーダー配列	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ)の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子の 5'末端非翻訳領域 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子発現の調整に関与する。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	<i>A. thaliana</i> の EPSPS をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。改変 CP4EPSPS たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4-epsps</i> 遺伝子	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996; Barry <i>et al.</i> , 1997)。
<i>E9</i> ターミネーター	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ)のリブローソム-1, 5-二リン酸カルボキシラ

	ーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子に由来する 3'末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。
--	--

① *Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子の機能

285 *Pj.D6D* 遺伝子は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼをコードする遺伝子であり、改変 *Nc.Fad 3* 遺伝子は、改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼをコードする遺伝子である。これらのデサチュラーゼが種子特異的に発現することにより、MON87769 ダイズの種子において従来のダイズには存在しない SDA と γ -リノレン酸が産生される。

290 $\Delta 6$ デサチュラーゼは、フロントエンドデサチュラーゼ (既存の二重結合とカルボキシル末端との間に二重結合を挿入するデサチュラーゼの総称) である。 $\Delta 6$ デサチュラーゼは特定の脂肪酸においてカルボキシル末端から 6 番目と 7 番目の炭素間に二重結合を挿入する。改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは特定の脂肪酸のカルボキシル末端から 15 番目と 16 番目の炭素間に二重結合を挿入する。

295 MON87769 ダイズにおいて、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現することにより改変される脂肪酸合成経路を図 1 に示す。 $\Delta 6$ デサチュラーゼによって、 α -リノレン酸、リノール酸及びオレイン酸(18:1) に二重結合が挿入されることで、SDA、 γ -リノレン酸、イソリノール酸に変換される。ダイズは $\Delta 6$ デサチュラーゼを持たないため、本来は SDA を産生することができないが、MON87769 ダイズでは *Pj.D6D* 遺伝子を導入したことにより、SDA が産生される。

300 上述した $\Delta 6$ デサチュラーゼによる脂肪酸代謝の改変に加えて、MON87769 ダイズでは、改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現によりリノール酸から α -リノレン酸への代謝経路及び γ -リノレン酸から SDA への代謝経路が促進される。なお、ダイズにはもともと内在性の $\Delta 15$ デサチュラーゼが存在するが、その活性レベルは極めて低いことが知られている。MON87769 ダイズでは、改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現により、効率的に種子中の SDA 含量を高めることができる。

305 MON87769 ダイズの種子を供試し、発現した $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼによって含有量の変動すると予想される脂肪酸(SDA、 γ -リノレン酸、イソリノール酸、 α -リノレン酸、リノール酸及びオレイン酸) を分析した。その結果、表 2 に示したとおり、MON87769 ダイズの全脂肪酸に占める含有量の平均値は、SDA が 26.13%、 γ -リノレン酸が 7.09%、 α -リノレン酸が 11.18%であり、イソリノール酸は定量限界(全脂肪酸の 0.13%)以下であった。また、MON87769 ダイズにおけるリノール酸及びオレイン酸の平均値はそれぞれ 22.78%及び 15.18%であり、これらは対照の非組換えダイズよりも低い値であった。これらの脂肪酸含量の変化は、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼによる脂肪酸代謝経路の改変により生じたものであると考えられた。

315

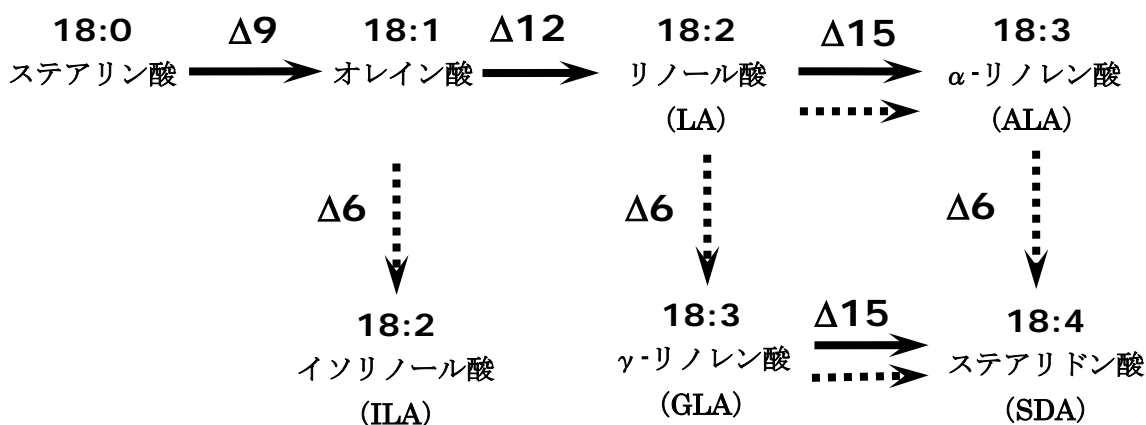


図 1 MON87769 ダイズにおいて $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが発現することにより改変される脂肪酸合成経路

320

- ダイズ内在性デサチュラーゼが働く脂肪酸合成経路
 → 導入した $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが働く脂肪酸合成経路

表 2 MON87769 ダイズの導入遺伝子の働きにより影響を受けると考えられた脂肪酸の種子における含有量¹

325

	全脂肪酸に占める割合%		
	MON87769 ダイズ	A3525	p-値
	平均値 (S.E.) ² [範囲]	平均値 (S.E.) [範囲]	
18:1 オレイン酸	15.18 (0.95) [12.66 - 18.80]	19.19 (0.95) [17.24 - 21.17]	0.001
18:2 リノール酸	22.78 (1.64) [16.46 - 30.81]	54.93 (1.64) [54.05 - 56.04]	<0.001
18:2 イソリノール酸 (ILA)	- ³	-	NA ⁴
18:3 α -リノレン酸	11.18 (0.46) [10.20 - 11.80]	9.20 (0.46) [7.42 - 10.66]	0.016
18:3 γ -リノレン酸	7.09 (0.19) [6.07 - 8.03]	-	NA
18:4 ステアリドン酸 (SDA)	26.13 (1.64) [16.83 - 33.92]	-	NA

¹ 米国の 5 カ所のほ場から得られたサンプルについて分析を行った (n=5)。

² S.E. = 標準誤差

³ -: 定量限界以下 (定量限界は全脂肪酸の 0.13%)

⁴ NA; 対照の非組換えダイズの分析値、又は本組換えダイズと対照の非組換えダイズの分析値の両方が定量限界以下のため適用せず。

330

② 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能

335 除草剤グリホサートは植物細胞内の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合
成酵素(EPSPS)に結合し、植物の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成を
阻害する(Steinrücken and Amrhein, 1980; Haslam, 1993)。その結果、植物は
生育に必要な芳香族アミノ酸を生産できずに枯死する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子に
340 よって発現する改変 CP4 EPSPS たん白質は、EPSPS と構造的に類似し同一の
機能を持つが、除草剤グリホサートとの結合親和性が低いため、除草剤グリホサ
ート存在下においても改変 CP4 EPSPS たん白質が除草剤グリホサートと結合し
ないことから、芳香族アミノ酸を生産し続けることができる(Padgett *et al.*,
1996)。

(5) 純度に関する事項

345 塩基配列解析により、T-DNA I 及び T-DNA II 領域内に目的外の遺伝子の混入
はないことを確認している(参考資料 2)。

(6) コピー数に関する事項

MON87769 ダイズにおける導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、導入遺伝子発
現カセットの完全性及び導入遺伝子領域以外の領域(外側骨格領域)の有無を確
350 認するため、サザンブロット分析を実施した。また、導入遺伝子の塩基配列解析
により、導入遺伝子の塩基配列が PV-GMPQ1972 中の対応する塩基配列と同一か
確認した。更に、導入遺伝子の挿入部位の解析から、挿入部位におけるダイズ内
在性の既知の遺伝子が破壊されていないことを確認した。

355 サザンブロット分析の結果、MON87769 ダイズ中のゲノム DNA の 1 カ所に、
完全な *Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び完全な改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセット
を持つ T-DNAI 領域が 1 コピー導入されていることが確認された。また、T-
DNAII 領域及び外側骨格領域由来の非意図的な遺伝子断片が導入されていないこ
とが確認された(参考資料 4)。

360 導入遺伝子の塩基配列解析を行った結果、MON87769 ダイズ中の導入遺伝子と、
導入用プラスミド PV-GMPQ1972 の T-DNAI 領域の各構成要素の塩基配列が同一
であることが確認された(参考資料 4)。

365 MON87769 ダイズの導入遺伝子挿入部位における 5'及び 3' 末端近傍配列がダ
イズゲノム由来であることを PCR 分析及び塩基配列解析により確認した。導入遺
伝子挿入部位のダイズ内在性配列に 9 bp の欠損があること、導入遺伝子の 5'及び
3'末端近傍配列にそれぞれ 17 bp と 8 bp の付加されていることが確認された。し
かし、近傍配列の BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、MON87769 ダイズの導入
遺伝子挿入部位においてダイズ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことが
確認された(参考資料 4,5)。

370 (7) 安定性に関する事項

導入遺伝子が複数世代に安定して遺伝しているか確認するため、4 世代の

MON87769 ダイズから得られたゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を実施したところ、*Pj.D6D* 遺伝子発現カセット及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子発現カセットを持つ T-DNAI 領域が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された (参考資料 4)。

375

また、導入遺伝子が複数世代で安定して発現しているか確認するため、4 世代の MON87769 ダイズを用いて Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼのウエスタンブロット分析を実施したところ、これらのたん白質が複数世代にわたり安定して発現していることが確認された(参考資料 6)。

380

さらに、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MON87769 ダイズを用いてインベーターアッセイにより T-DNAI 領域の分離比を算出し、カイ二乗検定により期待値との比較を実施したところ、MON87769 ダイズ中の導入遺伝子がメンデルの法則に従って後代に遺伝していることが確認された(参考資料 6)。

385

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON87769 ダイズにおける Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼの発現量を、2006 年に米国の 5 ヶ所の試験ほ場から採集した植物組織を用いて、ウエスタンブロット分析により実施した(参考資料 6)。その結果、種子特異的プロモーターの働きにより、種子を含む試料からのみ Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼが検出された。

390

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMPQ1972 には、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来の 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードしている *aadA* 遺伝子が外側骨格領域に存在している (Fling *et al.*, 1985)。なお、5 の (6) に記載したとおり、MON87769 ダイズには外側骨格領域が存在しないことが確認されている。

395

(10) 外来の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

400

MON87769 ダイズ中の導入遺伝子とその 5'末端側境界配列及び 3'末端側境界配列についてストップコドン (TGA, TAG, TAA) を検索し、導入遺伝子領域のストップコドンから近傍のダイズゲノムのストップコドンまでの配列を ORF と仮定し検索したところ、11 個の ORF が確認された。これら 11 個の ORF について、既知の毒素及び有害な生理活性のあるたん白質とのアミノ酸相同性検索を行った結果、相同性を示す配列は検出されなかった (参考資料 7)。

405

また、MON87769 ダイズ中の導入遺伝子において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想定し、既知の毒素およびその他の関連する生理活性のあるたん白質との相同性を調べた。その結果、既知の毒素及び生理活性のあるたん白質との相同性を示す配列は検出されなかった(参考資料 8)。

410

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

415 MON87769 ダイズに導入されたのは、*Pj.D6D* 遺伝子及び改変 *Nc.Fad3* 遺伝子のみである。MON87769 ダイズは、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの発現により従来のダイズの種子には含まれない SDA 及び γ -リノレン酸が生産され、従来のダイズの種子と比較してリノール酸の含有量が減少する。この点を除けば、MON87769 ダイズは既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わらない。

420 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

425 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼが既知の毒素と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか確認するため、「毒素」として登録されている既知のたん白質からなる毒性たん白質データベース中の相同性を示す配列の有無を検索した。その結果、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは既知の毒性たん白質及びその他のヒトや家畜等に有害なたん白質との間に構造的に類似性のある配列を共有していなかった(参考資料 3)。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

430 物理化学的処理により遺伝子産物の分子量、酵素活性、免疫反応性等が変化するか明らかにするため、以下の①～③の検討を行った。

① 人工胃液に対する感受性

a. $\Delta 6$ デサチュラーゼ (参考資料 9)

435 $\Delta 6$ デサチュラーゼの人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、完全長の $\Delta 6$ デサチュラーゼは、人工胃液中で試験開始から 30 秒間以内に検出限界(SDS-PAGE: 0.005 μg 、ウエスタンブロット分析 0.5 ng)以下まで分解されたことが確認された。

440 SDS-PAGE 法において、人工胃液処理により約 3.5、4 及び 5 kDa の、 $\Delta 6$ デサチュラーゼまたは一緒に精製されたダイズ内在性のたん白質に由来するポリペプチド断片が検出された。そこで、 $\Delta 6$ デサチュラーゼを人工胃液中で 2 分間消化した後、人工腸液中で消化を行ったところ、人工胃液処理後に確認されたポリペプチド断片は 5 分間の人工腸液処理により検出されなくなった。

445 ウエスタンブロット分析においても、30 秒間の人工胃液処理では約 10 kDa のポリペプチド断片が検出されたが、2 分間の人工胃液処理により検出されなくなった。

b. 改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼ (参考資料 10)

450 改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、完全長の改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは、人工胃液中で試験開始から 30 秒以内に検出限界(SDS-PAGE:

0.02 µg、ウエスタンブロット分析 0.5 ng)以下まで分解されたことが確認された。

455

SDS-PAGE 法において、人工胃液処理後に約 4~17 kDa のバンドが検出された。そこで、Δ6 デサチュラーゼを人工胃液中で 2 分間消化した後、人工腸液中で消化したところ、人工胃液処理後に確認されたポリペプチド断片は 2 分間の人工腸液処理により検出されなくなった。

460

ウエスタンブロット分析においても、30 秒間の人工胃液処理では約 12 及び 17 kDa のポリペプチド断片が検出されたが、10 分間の人工胃液処理によりいずれのポリペプチド断片も検出されなくなった。

② 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

a. Δ6 デサチュラーゼ（参考資料 9）

465

Δ6 デサチュラーゼの人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により評価した。その結果、完全長の Δ6 デサチュラーゼは、人工腸液中で試験開始から 5 分間以内に検出限界(2.5 ng)以下まで分解されたことが確認された。また、Δ6 デサチュラーゼに由来するポリペプチド断片は検出されなかった。これにより、完全長の Δ6 デサチュラーゼはパンクレアチン処理によって速やかに消化されることが示唆された。

470

b. 改変 Δ15 デサチュラーゼ（参考資料 10）

475

改変 Δ15 デサチュラーゼの人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により評価した。その結果、完全長の改変 Δ15 デサチュラーゼは、人工腸液中で試験開始から 5 分間以内に検出限界(0.5 ng)以下まで分解されたことが確認された。また、改変 Δ15 デサチュラーゼに由来するポリペプチド断片は検出されなかった。これにより、完全長の改変 Δ15 デサチュラーゼはパンクレアチン処理によって速やかに消化されることが示唆された。

③ 加熱処理(参考資料 11、12)

480

Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼの加熱処理に対する熱感受性を、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼは非加熱時と比べ、75°C・30 分間の加熱処理により有意に減少し、95°C・30 分間の処理により、Δ6 デサチュラーゼは更に減少し、改変 Δ15 デサチュラーゼは検出されなかった。これにより、Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼは、75°C以上の加熱処理によってその免疫学的反応性が低下することが明らかとなった。したがって、Δ6 デサチュラーゼ及び改変 Δ15 デサチュラーゼは熱に安定でないことが示された。

485

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

490 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼの基質特異性については、これ
まで酵母を用いた発現系で調べられており(参考資料 13)、*P. juliae* 由来の $\Delta 6$ デ
サチュラーゼはオレイン酸やリノール酸、 α -リノレン酸の $\Delta 6$ 不飽和化に働くこと、
495 *N. crassa* 由来の改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼはリノール酸や γ -リノレン酸、ジホモ
 γ -リノレン酸 (DGLA)、アラキドン酸のオメガ-3 の不飽和化に働くことが確認さ
れている。

なお、酵母を用いた発現系では、上述した炭素数が 18 以外の脂肪酸が $\Delta 6$ 及び
改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼによる飽和化を受けることが示されている。このうち $\Delta 6$
デサチュラーゼは、パルミトレイン酸 (16:1) をヘキサデカジエン酸 (16:2) へ変
換し、改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼは、ジホモ γ -リノレン酸 (DGLA) (20:3) をエイコ
500 サテトラエン酸 (20:4) へ、アラキドン酸 (20:4) を EPA (20:5) へ変換することが
確認された。これらの反応の基質となる脂肪酸がダイズ種子中に存在する場合には、
同様の脂肪酸が生じる可能性があると考えられた。しかしながら、
MON87769 ダイズ及び対照の非組換えダイズの種子における構成成分分析の結果
505 において、パルミトレイン酸(16:1)、DGLA(20:3)及びアラキドン酸(20:4)は定量限
界以下であることが確認されたことから、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチ
ュラーゼの基質特異性について、オレイン酸(18:1)、リノール酸(18:2)、 α -リノ
レン酸(18:3)及び γ -リノレン酸(18:3)以外の脂肪酸が不飽和化される可能性が考えら
510 れたが、MON87769 ダイズにおいて脂肪酸の含有量が既存のダイズと比べて有意
に変化しているのは、 $\Delta 6$ デサチュラーゼ及び改変 $\Delta 15$ デサチュラーゼにより新た
に産生された SDA 及び γ -リノレン酸と、この反応の基質であるために含有量が減
少するリノール酸のみであり、意図しない脂肪酸の変化は生じていないと結論さ
れた。

(5) 宿主との差異に関する事項

515 MON87769 ダイズと従来のダイズとの差異を評価するため、2006 年に米国の 5
箇所のほ場において栽培した MON87769 ダイズ、対照の非組換えダイズ品種
A3525 及び商業栽培品種 10 種の栽培試験を行い、収穫された種子及び地上部を用
いて、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ビタミン類及び⑤有
害生理活性物質の分析を行った(参考資料 14)。

520

①主要構成成分

種子及び地上部の主要構成成分(水分、たん白質、脂質、灰分、炭水化物、酸
性デタージェント繊維(ADF)及び中性デタージェント繊維(NDF))について分
析した結果、いずれの成分も対照の非組換えダイズ品種又は商業栽培品種の分
525 析値から計算された許容区間の範囲内であった。

②脂肪酸組成

種子中の脂肪酸組成について分析した結果、オレイン酸、リノール酸及び α -
リノレン酸については、いずれのほ場においても対照の組換えダイズ品種の分

530 析値と比べ有意に低くなった。しかし、遺伝子組換えにより含有量の減少が予想されたリノール酸を除き、いずれの脂肪酸も商業栽培品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。また、SDA、 γ -リノレン酸、トランス SDA 及びトランス α -リノレン酸については、対照の非組換えダイズでは定量限界以下であったが、MON87769 ダイズでは定量限界を超える値として検出された。

535 SDA 及び γ -リノレン酸の増加は、導入遺伝子の働きによるものと考えられ、トランス SDA 及びトランス α -リノレン酸の増加は、ダイズ油の抽出及び生成過程の高温条件でトランス異性化(Chardigny *et al.*, 1996)を受けたことによると考えられた。含有量の平均値及び範囲（括弧内数値）は、SDA が 26.13%(16.83~33.92%)、 γ -リノレン酸が 7.09%(6.07~8.03%)、トランス SDA が 0.18%(0.058~0.26%)、トランス α -リノレン酸が 0.44%(0.38~0.48%)であった。なお、これら 4 つの脂肪酸の安全性に関する考察は以下のとおり。

a. ステアリドン酸(SDA)及び γ -リノレン酸

545 SDA は魚油に含まれる脂肪酸であり(Bimbo and Crowther, 1992)、家畜はこれまでに魚油または魚油を含む魚粉等を介して SDA を摂取している。 γ -リノレン酸はエン麦及び大麦に含まれる脂肪酸であり (Horrobin, 1990)、家畜はこれまでにエン麦及び大麦を飼料として摂取している。したがって、SDA 及び γ -リノレン酸は食経験のある脂肪酸であり、これらの脂肪酸を投与した動物試験においても有害性は認められていない(参考資料 15)。

550 また、SDA は α -リノレン酸が EPA のような長鎖オメガ-3 脂肪酸へと代謝される過程で産生される中間代謝物である(Sprecher, 2000)。 γ -リノレン酸は、哺乳類の体内においてリノール酸がアラキドン酸のような長鎖オメガ-6 脂肪酸に変換されるときに生じる中間代謝物質である (Horrobin, 1990)。さらに、脂肪酸は β 酸化により分解されることが一般に知られている。

555 以上のことから、SDA 及び γ -リノレン酸には食経験があり、家畜体内で長鎖オメガ-3 脂肪酸等へ代謝される、又は、 β 酸化によって分解されると考えられる。

560 なお、仮に飼料中のダイズ由来原料が全てMON87769 ダイズに由来していた場合、ダイズ由来原料に含まれるダイズ油が飼料に占める割合は最大で 7.8%¹ (肉牛用飼料)(OECD, 2009、日本標準飼料成分表, 2010)、MON87769

¹例 肉牛用飼料

A (飼料の最大摂取量 (g/kg 体重/日)) × B (ダイズ由来原料の配合割合 (%) の最大値) × C (ダイズ由来原料別油分含量(%)) = D (各ダイズ由来原料に含まれるダイズ油の一日最大摂取量)

A : 13 g/kg 体重/日

B : ダイズ 15%、ダイズ油かす 25%、おから 40%

(原料別ダイズ油含有量と配合割合から、この 3 原料を選択したときダイズ油の一日最大摂取量が最大となる。)

C : ダイズ 18.6%、ダイズ油かす 1.5%、おから 11.6%

D : ダイズ 0.36 g/kg 体重/日、ダイズ油かす 0.05 g/kg 体重/日、おから 0.60 g/kg 体重/日

以上のことから、ダイズ由来原料から摂取するダイズ油の一日最大摂取量 : 1.01 g/kg 体重/日、ダイズ由来原料から摂取するダイズ油が肉牛用飼料に占める割合 : 7.8%。

ダイズに由来するSDAダイズ油中のSDA及び γ -リノレン酸含有量は 26.13%及び 7.09%であることから、家畜がMON87769 ダイズを含む飼料から摂取するSDA及び γ -リノレン酸の量は最大でも飼料の 2.04%及び 0.55%程度と試算される。この量のSDA等の摂取により家畜の体内脂肪酸組成が大きく変動することはないと考えられる。

565

b. トランス SDA 及びトランス α -リノレン酸

MON87769 ダイズから抽出及び精製されたダイズ油におけるトランス SDA 及びトランス α -リノレン酸が占める割合は 0.18%及び 0.44%である。また、前述のとおり、ダイズ由来原料中に含まれるダイズ油が飼料に占める割合は最大で 7.8%と推定される。したがって、仮に飼料に利用されるダイズ由来原料の全量が MON87769 ダイズに置き換わり、その脂質中にトランス SDA 及びトランス α -リノレン酸が SDA ダイズ油と同じ割合で含まれていたとしても、飼料に含まれるトランス SDA 及びトランス α -リノレン酸の割合は飼料の 0.014%以下及び 0.034%以下と極めて微量であり、これらのトランス脂肪酸が家畜の健康に影響を与えるとは考えにくい。

570

575

また、反芻動物の場合、上述した MON87769 ダイズ由来の飼料に含まれるトランス脂肪酸以外にも、MON87769 ダイズに含まれる SDA や γ -リノレン酸が胃内において細菌によるトランス異性化を受けることでトランス異性体が生じ、その一部が体内に吸収されることが考えられる。しかし、上述のとおり、仮に飼料中のダイズ由来原料の全量が MON87769 ダイズに由来していたとしても、ダイズ由来原料から摂取される SDA 及び γ -リノレン酸の摂取量は最大で飼料の 2.04%及び 0.55%程度である。また、牛を用いた動物試験において、飼料に全体の 2.7%に相当する n-3 系多価不飽和脂肪酸を添加した場合 (Lock, 2010) であっても牛の健康に悪影響はみられなかったと報告されている。これらのことから、反芻動物の胃内でトランス異性化されたこれらの脂肪酸が、家畜の健康に影響を及ぼす量に達するとは考えにくい。

580

585

c. SDA ダイズ油の曝露マージン

家畜の健康に影響を及ぼす可能性のある量の SDA ダイズ油を家畜が飼料から摂取するおそれの有無を検討するため、ラットを用いた 90 日間反復経口(混餌)投与毒性/1 世代生殖毒性試験(Hammond *et al.*, 2008)において確認された SDA ダイズ油の無毒性量 (NOAEL) と、飼料中のダイズ由来原料に含まれるダイズ油の全量が SDA ダイズ油に置き換わったと推定したときの SDA ダイズ油の一日最大摂取量(日本飼養標準 豚,2005、日本飼養標準 家禽,2007、日本飼養標準 乳牛,2008、日本飼養標準 肉用牛,2009、OECD, 2009、日本標準飼料成分表,2010)との比較により考察した。SDA ダイズ油の NOAEL は 4 g/kg 体重/日、SDA ダイズ油の一日最大摂取量はブロイラー、豚、乳牛及び肉牛で、0.55、0.77、1.73、1.01 g/kg 体重/日であり、SDA ダイズ油の NOAEL を上回る量の SDA ダイズ油を家畜が飼料から摂取するおそれはなく、安全上の問題はないと考えられた。

590

595

600

なお、SDA ダイズ油は、2009 年 9 月、米国食品医薬品局(FDA)により、一般的に安全な物質と見なされる、GRAS 物質としての認定を受けている (GRAS Notice No. GRN 000283)。

605

以上に示した食経験及び想定される摂取量に関する考察から、SDA、 γ -リノレン酸、トランス SDA 及びトランス α -リノレン酸が MON87769 ダイズの飼料としての安全性に影響を与えるものではないと考えられた。

610

③アミノ酸組成

種子中のアミノ酸組成について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えダイズ品種又は商業栽培品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

615

④ビタミン類

種子中のビタミン類について分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えダイズ品種又は商業栽培品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

620

⑤有害生理活性物質

有害生理活性物質として、レクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、トリプシンインヒビター及びイソフラボン(ダイゼイン、グリシテイン及びゲニステイン)、について分析した結果、いずれの有害生理活性物質も対照の非組換えダイズ品種又は商業栽培品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

625

以上の結果から、MON87769 ダイズには、遺伝子組換えによる意図しない差異は構成成分等には生じていないことが確認された。

630

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

2003 年以来、MON87769 ダイズのほ場試験は米国を中心として延べ 350 箇所以上で行われているが、MON87769 ダイズの生存及び増殖能力は対照の非組換え品種と同等であることが確認されている。

635

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

6 (6) に記載のとおり、MON87769 ダイズの生存・増殖能力は非組換えダイズと同等であり、生存・増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

640

(8) 不活化法に関する事項

MON87769 ダイズは、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の使用)など、ダイズを枯死させる従来の方法で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

645 米国食品医薬品局 (FDA) へ 2009 年 3 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。

カナダ食品検査庁(CFIA)において 2011 年 10 月に飼料・環境に対する安全性が確認された。

650 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)において 2011 年 11 月に食品としての安全性が確認された。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

作出、育種及び栽培方法について MON87769 ダイズと従来のダイズの違いはない。

655

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON87769 ダイズの種子の製法及び管理方法は、従来のダイズ品種と同じである。

660 7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項該当しない。

IV 審議結果

665 ステアリドン酸産生ダイズ MON87769 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

670 参考文献

- 1 Allen, R.D., François Bernier, Philip A. Lessard, and Roger N. Beachy. 1989. Nuclear Factors Interact with a Soybean β -Conglycinin Enhancer. *The Plant Cell*, Vol. 1, 623-631
- 2 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett, and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. U.S.A. Patent 5,633,435. <http://www.patentstorm.us/patents/7214535.html>.
- 3 Beversdorf, W. 1993. Soybean. In *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role on Modern Biotechnology*. 17-26.
- 4 Bimbo, A.P. and J.B. Crowther. 1992. Fish Meal and Oil: Current Uses. *JAOCS*, 69 (3): 221- 227.
- 5 Bown, D. 1995. *Encyclopedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, London.
- 6 Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6:211-212.
- 7 Chardigny, J.M., J.L. Sébédio, and O. Berdeux. 1996. Trans polyunsaturated fatty acids:

- occurrence and nutritional implications. Pages 1-33 in *Advances in applied lipid research*, F.B. Padley, (ed.) JAI Press, London, U.K.
- 8 Chen, Z.L., M.A. Schuler, and R.N. Beachy. (1986) Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 8560-8564.
- 9 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards, and N. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO* 3:1671-1679.
- 10 Dorrance, A.E., M.A. Draper, and D. Hershman. 2007. Using foliar fungicides to manage soybean rust. Ohio State University, USDA-Csrees and University of Kentucky. <http://oardc.osu.edu/soyrust/2007edition/fungisoyrust.pdf> [Accessed May 29, 2009]
- 11 Doyle, J.J., M.A. Schuler, W.D. Godette, V. Zenger, R.N. Beachy and J.L. Slightom. 1986. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Biological Chemistry* 261:9228-9238.
- 12 Faghihi, J., and V.R. Ferris. 2006. Soybean Cyst nematode. in E210-W, P.U. Department of Entomology, Editor: West Lafayette, Indiana.
- 13 Fling, M.E., 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.* 13:7095-7106.
- 14 GRAS Notice No. GRN 000283
<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm185688.htm>
- 15 Hammond, B.G., J.K. Lemen, G. Ahmed, K.D. Miller, J. Kirkpatrick, and T. Fleeman. 2008. Safety assessment of SDA soybean oil: results of a 28-day gavage study and a 90-day/one generation reproduction feeding study in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 52:311-323.
- 16 Haslam, E. 1993. Pages 3-50 in *In Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- 17 Horrobin, D.F. 1990. Gamma Linolenic Acid: An intermediate in essential fatty acid metabolism with potential as an ethical pharmaceutical and as a food. *Rev. Contemp. Pharmacother.* 1:1-41.
- 18 Hymowitz, T. 2004. Speciation and cytogenetics. Pages 97-136 in *Soybeans: improvement, production, and uses*, H.R. Boerma and J.E. Specht, (eds.) ASA, CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, U.S.A.
- 19 Hymowitz, T., F.I Collins. 1974. Variability of Sugar Content in Seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal* 66: 239-240.
- 20 ILSI. 2008. International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 3.0 <http://www.cropcomposition.org> . Search criteria soybean seed, all locations, all years, all proximates, amino acids, fatty acids, bio-actives, fiber, dry weight other than moisture [Accessed Mar 2, 2010]
- 21 Kemp, J.D., R.F. Barker, and M.J. Adang. 2000. Octopine T-DNA structural genes. USA Patent US 6090627. <Go to ISI>://BIOSIS:PREV200100174447.

- 22 Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an Arabidopsis thaliana gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210:437-442.
- 23 Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34:31-67.
- 24 Lock, L.L. 2010. Update on dietary and management effects on milk fat. Tri-State Dairy Nutrition Conference.
- 25 Mies, D.W. & Hymowitz, T. 1973. Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors of seed of the genus Glycine. *Botanical Gazette*, 134, 121-125
- 26 Natarajan, S., C. Xu, H. Bae, and B.A. Bailey. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *Journal of Plant Physiology.* 164(6): 756-63.
- 27 OECD (Organization of Economic Co-operation and Development). 2000. Consensus document on the biology of Glycine max (L). Merr. (soybean). OECD, ENV/JM/MONO(2000)15.
- 28 OECD (2009) OECD feed table
http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/OECD_Feed_table_2009.10.07.xls
- 29 OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients. OECD ENV/JM/MONO(2001)15.
- 30 Padgett, S.R., D. Re, G. Barry, D. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G. Kishore, and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-79 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York.
- 31 Pedersen, P. 2008. Iowa State University Extension.
http://extension.agron.iastate.edu/soybean/production_planting.html [Accessed June 5, 2008]
- 32 Perkins, D.D., and R.H. Davis. 2000a. Neurospora at the millennium. *FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY* 31:153-167.
- 33 Perkins, D.D., and R.H. Davis. 2000b. Evidence for safety of Neurospora species for academic and commercial uses. *Applied and environmental microbiology* 66:5107-5109.
- 34 Raboy, V. and Dickinson, D.B. 1993. Phytic acid levels in seeds of Glycine max and G. soja as influenced by phosphorus status. *Crop Sci* 33,1300-1305
- 35 Raper, C.D., Jr., and P.J. Kramer. 1987. Stress physiology. Pp 589-641. In *Soybeans: Improvement, production, and uses*, Second Edition. Wilcox, J.R. (ed.). ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
- 36 Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. U.S. Patent 6,018,100.
- 37 SMIC (Soybean Meal Information Center). 2006. Soybean processing fact sheet. [Accessed: May 3, 2006]
- 38 Sprecher, H. 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim*

Biophys Acta 1486:219-231.

- 39 TeKrony, D.M., D.B. Egli, and G.M.White. 1987. Seed production and technology. Pp 295-354. In Soybeans: Improvement, Production, and Uses; Second Edition. Wilcox, J.R. (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
- 40 Turner, B., D. Perkins, and A. Fairfield. 2001. Neurospora from natural populations: a global study. Fungal Genetics And Biology 32:67-92
- 41 Ursin, V., B. Froman, J. Gonzales, S.E. Screen, F. Dong, and T.J. Larosa. 2008. Fatty acid Desaturases From Primula. United States Patent Application 20080063691.
- 42 Ursin, V., T. Voelker, and B. Froman. 2006. Fatty acid desaturases from fungi. United States Patent Application 20060156435.
- 43 Wang, Q., and P. Dubois. 2004. Seed specific 7S α promoter for expressing genes in plants. U.S. patent 6,825,398.
- 44 Wang, K.J., Takahata, Y., Kono, Y., & Kaizuma N. 2008. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (Glycine soja). Theor Appl Genet. 117, 565-573
- 45 浅野 貞夫 (1995) 原色図鑑/芽ばえとたね、全国農村教育協会
- 46 大橋 広好 (1999), マメ科, Pages 186-213 in 日本の野生植物 草本 II 離弁花類, 佐竹 義輔、大井 次三郎、北村 四郎、亘理 俊次、富成 忠夫、平凡社, 東京
- 47 飼料月報 2011. 飼料月報 平成 23 年 8 月. 社団法人配合飼料供給安定機
- 48 高橋 将一、羽鹿 牧太、異儀田 和典 (1996) 九州中部で収集したツルマメの生育特性、九州農業研究(九農研) 第 58 号
- 49 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 2007. 日本飼養標準 家禽 (2004 年版) 中央畜産会
- 50 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 2005. 日本飼養標準 豚 (2005 年版) 中央畜産会
- 51 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 2008. 日本飼養標準 乳牛 (2006 年版) 中央畜産会
- 52 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 2009. 日本飼養標準 肉用牛 (2008 年版) 中央畜産会
- 53 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編 2010. 日本標準飼料成分表 (2009 年版) 中央畜産会
- 54 沼田 真、吉沢 長人 (1997) 新版・日本原色雑草図鑑、全国農村教育協会
- 55 丸山伸之 2010, 2. 細胞内小器官, in P 102- 109 in 大豆のすべて、サイエンスフォーラム

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Plasmid Lineage Diagram for PV-GMPQ1972
- 2 Sequence of the Genetic Elements in Plasmid Vector PV-GMPQ1972
- 3 Updated Bioinformatics Evaluation of $\Delta 6$ and $\Delta 15$ Desaturases Utilizing the AD_2009, TOX_2009 and PRT_2009 Databases (RAR-09-520)
- 4 Amended Report for MSL0021074: Molecular Analysis of Stearidonic Acid Producing Soybean MON 87769 (MSL0021926)

- 5 Bioinformatics Evaluation of the Extended DNA Sequence Flanking the Insertion Site in MON 87769: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0022354)
- 6 Assessment of Delta 6 and Delta 15 Desaturase Protein Levels in Tissues from MON 87769 Soybean Grown in 2006 U.S. Field Trials (MSL0021169)
- 7 Updated Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in MON 87769 Utilizing the AD_2009, TOX_2009 and PRT_2009 Databases: Assessment of Putative Polypeptides (RAR-09-353)
- 8 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in Stearidonic Acid Producing Soybean MON 87769 (MSL0022002)
- 9 Assessment of the *in vitro* Digestibility of the *Primula juliae* $\Delta 6$ Desaturase Protein (Pj $\Delta 6$ D) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0023314)
- 10 Assessment of the *in vitro* Digestibility of the *Neurospora crassa* $\Delta 15$ Desaturase Protein (Nc $\Delta 15$ D) in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0021427)
- 11 a) Immunodetection of *Primula juliae* $\Delta 6$ Desaturase Following Heat Treatment (MSL0022772)
b) SDS-PAGE of *Primula juliae* $\Delta 6$ Desaturase Following Heat Treatment (MSL0022771)
- 12 a) Immunodetection of *Neurospora crassa* $\Delta 15$ Desaturase Following Heat Treatment (MSL0022856)
b) SDS-PAGE of *Neurospora crassa* $\Delta 15$ Desaturase Following Heat Treatment (MSL0022925)
- 13 Functional Characterization of NcD15 and PjD6 Desaturases (PAR-07-309)
- 14 Compositional Analyses of Forage and Seed Collected from Stearidonic Acid-Containing Soybeans, MON 87769, Grown in the United States during 2006 (MSL0020866)
- 15 Supplemental Safety Assessment for Soybean Oil from MON 87769