

1 「高オレイン酸含有ダイズ(DP-305423-1)」に係る安全性確認(案)

2

3 I はじめに

4 高オレイン酸含有ダイズ(DP-305423-1)(以下「DP-305423-1」  
5 という。)について、「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全  
6 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  
7 1780号)に基づき審議を行った。

8

9 II 確認対象飼料の概要

10

11 飼料名：高オレイン酸含有ダイズ(DP-305423-1)

12

13 性質：高オレイン酸産生性

14

15 申請者：デュポン株式会社

16

17 開発者：パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社

18

19 DP-305423-1は、*gm-fad2-1* 遺伝子及び改変アセト乳酸合成酵素遺伝子  
20 (*gm-hra* 遺伝子)が導入されている。*gm-fad2-1* 遺伝子によりオレイン酸の  
21 含有量が高まり、*gm-hra* 遺伝子により、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に  
22 対する耐性が付与されている。

23

24 なお、DP-305423-1には、抗生物質耐性遺伝子は含まれていないことが確  
25 認されている。

26

27 一般に、ダイズは主にその油かすが家畜等の飼料として使用され  
28 ている。

29

30 III 審議内容

31

32 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

33

34 (1) 遺伝的素材に関する事項

35

36 宿主に用いた植物は、ダイズ(*Glycine max* (L.) Merr.)である。

37

38 DP-305423-1に導入された*gm-fad2-1* 遺伝子及び*gm-hra* 遺伝子の供与  
39 体はダイズである。

40

41

42 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

43

44 宿主であるダイズは、主として油かすの形態で広範囲な家畜等の飼養  
45 経験を持つ。

46

47

48 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

49

50 宿主であるダイズ及びDP-305423-1の主要構成成分(タンパク質、脂  
51 質、灰分、炭水化物、粗繊維分、酸性デタージェントファイバー、中性  
52 デタージェントファイバー)、毒性物質・抗栄養素(トリプシンインヒビ  
53 ター、レクチン、フィチン酸、スタキオース、ラフィノース、イソフラ  
54 ボン)の量は明らかになっている。(参考文献1)

55

56

57 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

58

59 DP-305423-1と既存のダイズとの相違は、DP-305423-1が*gm-fad2-1*  
60 遺伝子によるダイズ内在性*FAD2-1* 遺伝子のジーンサイレンシング及び  
61 *gm-hra* 遺伝子によるGM-HRAタンパク質の発現により、オレイン酸

62

46 を多く含み、アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けずに生育できる点  
47 である。これらの点を除けば、既存種と比較して①収穫時期(成熟程度)  
48 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  
49 び加工方法について相違はない。なお、飼料として利用されるのは、オ  
50 レイン酸を多く含む食用油の搾油かすであり、従来のダイズと同様に利  
51 用される。

52  
53 以上(1)～(4)により、DP-305423-1の飼料としての安全性を評価  
54 するために、既存のダイズを比較対象として用いる方法が適用できると判  
55 断された。

## 56 57 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

58 DP-305423-1は、*gm-fad2-1*遺伝子によるダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子  
59 のジーンサイレンシングにより、 $\omega 6$  デサチュラーゼの産生を抑制させ、  
60 種子中のオレイン酸含有量を高めることを目的に作出された(参考文献2、  
61 3)。なお DP-305423-1には、選択マーカー遺伝子としてダイズ由来のア  
62 セト乳酸合成酵素遺伝子(*gm-als* 遺伝子)を改変した *gm-hra* 遺伝子が  
63 導入されている。

## 64 65 3 宿主に関する事項

### 66 (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

67 宿主はダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) で、DP-305423-1の作出に  
68 はダイズ品種 Jack が用いられた。

### 69 70 (2) 遺伝的先祖に関する事項

71 ダイズの原産地は中国で、その祖先は野生種のツルマメ (*G. soja*) で  
72 あると考えられている(参考文献4、5)。

### 73 74 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

75 ダイズに含まれる有害生理活性物質として、トリプシンインヒビター、  
76 レクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース及びイソフラボン  
77 が知られている(参考文献6)。

78 トリプシンインヒビターはタンパク質分解酵素阻害物質であり、消化  
79 酵素であるトリプシンを不活化し、結果として摂取したタンパク質の消  
80 化を阻害する(参考文献6)。

81 レクチンは炭水化物含有化合物に結合するタンパク質で、血液凝固の  
82 原因となる赤血球凝集素として作用することが知られている。レクチン  
83 は、熱で速やかに分解され、生のダイズを脱脂したり、ダイズ粉にして  
84 炒ったりすると約100分の一に減少する(参考文献6)。

85 フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄及び亜鉛等  
86 とキレート化合物を形成し、反芻動物以外の動物において、これらのミ  
87 ネラルの吸収を阻害することが知られている(参考文献6)。

88 スタキオース及びラフィノースは低分子量の炭水化物で、摂取によっ  
89 てガス化し、腹部を膨張させる原因物質である(参考文献6)。

90 イソフラボンは植物エストロゲンであり、哺乳動物に対してエストロ

- 91                   ゲン、抗エストロゲン及びコレステロール低下作用などの生化学活性を  
92                   示す（参考文献 6）。
- 93  
94
- 95                   (4) 寄生性及び定着性に関する事項  
96                         ダイズの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。
- 97
- 98                   (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  
99                         ダイズには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られてい  
100                         るが（参考文献 5）、これらのウイルス及び病原菌が動物に感染するとの  
101                         報告はない。
- 102
- 103                   (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  
104                         ダイズは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い。
- 105
- 106                   (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項  
107                         ダイズは一年生植物で、我が国では春に播種され、夏から秋に収穫さ  
108                         れる（参考文献 7）。
- 109                         ダイズと交雑可能な近縁野生種は、ツルマメである（参考文献 5）。
- 110                         ダイズとツルマメ間の交雑率は、0.7%以下と低いことが報告されている  
111                         （参考文献 8、9、10）。
- 112
- 113                   (8) 飼料に利用された歴史に関する事項  
114                         約 5,000 年前の中国の文献にダイズの存在が記録されており、紀元前  
115                         11 世紀頃の周時代には既にダイズの栽培が行われていたと考えられて  
116                         いる（参考文献 4、5）。ダイズ栽培の普及に伴い、搾油後の油かすが飼  
117                         料として利用されてきた。
- 118
- 119                   (9) 飼料の安全な利用に関する事項  
120                         上記（8）のとおり、搾油後の油かすは、飼料として利用される。そ  
121                         の量は、我が国の配合・混合飼料用原料総使用量の 14%を占める（2007）  
122                         （参考文献 11）。ダイズ種子に含まれるトリプシンインヒビター、レク  
123                         チン等の有害生理活性物質は、加工により不活化又は除去されるため、  
124                         ダイズ油かすは飼料として安全に利用される。
- 125
- 126                   (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項  
127                         ダイズ種子には休眠性がなく、まれに越年した種子が翌年に発芽する  
128                         ことがあるが、その場合も十分に育つことはない（参考文献 5）。なお、  
129                         種子を乾燥・低温条件下で貯蔵した場合、その寿命を長期間維持できる  
130                         が、多湿や乾燥状態が繰り返される自然条件下では、種子は急速に発芽  
131                         能力を失う（参考文献 12）。
- 132
- 133                   (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項  
134                         ダイズの近縁種であるツルマメが、トリプシンインヒビターを生産す  
135                         るとの報告がある（参考文献 13）

136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180

#### 4 ベクターに関する事項

##### (1) 名称及び由来に関する事項

DP-305423-1 の作出には、直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A を用いた。これら直鎖状 DNA 断片は、プラスミド PHP19340 及び PHP17752 由来であり、それぞれ *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットを含む。プラスミド PHP19340 及び PHP17752 は、プラスミド pSP72 を基本骨格として作製した (参考文献 14)。

##### (2) 性質に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP19340 A 及び PHP17752A の塩基数はそれぞれ 2,924 bp 及び 4,512 bp である。これら 2つのカセットに含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

##### (3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド PHP19340 及び PHP17752 の構築過程で、プラスミド pSP72 由来の抗生物質アンピシリン耐性マーカーである *amp* 遺伝子が削除され、抗生物質ハイグロマイシン耐性マーカーである *hyg* 遺伝子が追加された (参考文献 15)。しかしながら、本 *hyg* 遺伝子は、制限酵素 *Asc* I 処理によって作製される直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A には含まれない。このことはサザンブロット分析により確認されている (参考文献 16)。

##### (4) 伝達性に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A は、宿主植物から他の生物へ伝達を可能とする配列を含まない。

##### (5) 宿主依存性に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、植物、家畜等での増殖を可能とする配列を含まない。

##### (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A は、それぞれ *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットを含む。*gm-fad2-1* 遺伝子発現カセットは、KTi3 プロモーター、*gm-fad2-1* 遺伝子及び KTi3 ターミネーターからなり、*gm-hra* 遺伝子発現カセットは、SAMS プロモーター、SAMS イントロン、*gm-hra* 遺伝子及び *als* ターミネーターからなる。

##### (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

宿主への挿入方法は、パーティクルガン法である (参考文献 17)。挿入しようとする位置は、プラスミド PHP19340 及び PHP17752 を制限

181 酵素 *Asc I* で切断して得た、直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び  
182 PHP17752A の全領域である。

183

184 5 挿入遺伝子に関する事項

185 (1) 供与体に関する事項

186 ①名称、由来及び分類に関する事項

187 *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の供与体はダイズである。  
188 *gm-fad2-1* 遺伝子は、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子の 399 番目から 995  
189 番目までの塩基からなる DNA 断片である。また、*gm-hra* 遺伝子は、  
190 ダイズ由来のアセト乳酸合成酵素遺伝子（以下、*gm-als* 遺伝子と表記）  
191 を、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けないように改変し  
192 た遺伝子である。

193

194 ②安全性に関する事項

195 *gm-fad2-1* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子の供与体であるダイズは、飼料  
196 として広く安全に利用されている。

197

198 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

199 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A を、パーティクルガ  
200 ン法により宿主に導入した（参考文献 17）。

201

202

203 (3) 構造に関する事項

204 *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ダイズ由来 KTi3  
205 プロモーターである（参考文献 18、19）。*gm-hra* 遺伝子発現カセット  
206 のプロモーターは、ダイズ由来 SAMS プロモーターである（参考文献  
207 20）。

208 また、*gm-fad2-1* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ダイズ由  
209 来 KTi3 ターミネーターである（参考文献 18、19）。*gm-hra* 遺伝子発  
210 現カセットのターミネーターは、ダイズ由来 *als* ターミネーターである  
211 （参考文献 20）。

212 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A に含まれるすべての  
213 遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含んでいな  
214 い。

215

216 (4) 性質に関する事項

217 表 1 にまとめた。

表 1 直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A

構成要素	由来及び機能
<i>gm-fad2-1</i> 遺伝子発現カセット (PHP19340 A)	
KTi3 プロモーター	ダイズ由来 Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子のプロモーター領域 (参考文献 18、19)。胚形成時の胚における転写活性が最も高い。
<i>gm-fad2-1</i>	ダイズ由来内在性 <i>FAD2-1</i> 遺伝子の一部の領域からなる DNA 断片 (参考文献 3)。ジーンサイレンシングを誘導し、 $\omega$ 6 デサチュラーゼの発現を抑制する目的で導入した。
KTi3 ターミネーター	ダイズ由来 Kunitz トリプシンインヒビター3 遺伝子のターミネーター領域 (参考文献 18、19)。
<i>gm-hra</i> 遺伝子発現カセット (PHP17752A)	
FRT1	酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来の Flp 組換え酵素認識配列 (参考文献 21)。
SAMS プロモーター	ダイズ由来 S-アデノシル-L-メチオニンシンテターゼ (SAMS) 遺伝子のプロモーター領域 (参考文献 20)。
SAMS イントロン	ダイズ由来 SAMS 遺伝子 5'非翻訳領域のイントロン領域 (参考文献 20)。
<i>gm-hra</i>	ダイズ由来アセト乳酸合成酵素遺伝子( <i>gm-als</i> )の改変遺伝子で、アセト乳酸合成酵素阻害剤の影響を受けない GM-HRA タンパク質前駆体をコードする。
<i>als</i> ターミネーター	ダイズ由来 <i>gm-als</i> 遺伝子のターミネーター領域 (参考文献 20)。
FRT1	酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) 由来の Flp 組換え酵素認識配列 (参考文献 21)。
FRT6	FRT1 と 94%の相同性を持つ改変 FRT1 配列で、Flp 組換え酵素の認識配列。

219

220

## (5) 純度に関する事項

221

222

223

224

225

226

## (6) 安定性に関する事項

227

228

229

230

231

## (7) コピー数に関する事項

232

233

234

235

236

237

サザンブロット分析の結果から、DP-305423-1 のゲノムには、完全長の *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットからなる各 1 コピーの PHP19340A 及び PHP17752A が導入されていることが確認された他、7 つの *gm-fad2-1* 遺伝子発現カセット断片が導入されていることが示された。挿入領域をクローニングし、塩基配列を決定した結果、4 箇所に挿入されたことが示された (参考文献 16、22)。また、

238 DP-305423-1 のゲノムには、プラスミド PHP19340 及び PHP17752 の  
239 外骨格領域の一部が、4 箇所挿入領域の 1 つに存在していたが、プ  
240 ラスミドの外骨格領域に存在する抗生物質耐性マーカー *hyg* 遺伝子は、挿  
241 入領域に組み込まれていないことが確認された (参考文献 16)

242 PCR 分析の結果から、挿入領域の近傍配列はダイズゲノムに由来して  
243 いることが確認された (参考文献 22)。

244

245

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

246

① *gm-fad2-1* 遺伝子

247

*gm-fad2-1* 遺伝子の導入により、ジーンサイレンシングが誘導され、  
248 意図したとおりダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子、*FAD2-2* 遺伝子及び  
249 *gm-fad2-1* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するため、種子  
250 及び葉を用いてノーザンブロット分析を行った (参考文献 3、23)。  
251 その結果、種子では、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子については、非  
252 組換えダイズのバンドに比べ、微弱なバンドしか検出されなかった。  
253 また、*gm-fad2-1* 遺伝子についても、微弱なバンドしか検出されな  
254 かった。また、葉では、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子及び *gm-fad2-1*  
255 遺伝子については、バンドが検出されなかった。したがって、ダイ  
256 ズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子及び *gm-fad2-1* 遺伝子は、葉で発現してい  
257 ないことが確認された。したがって、ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子  
258 及び *gm-fad2-1* 遺伝子の発現が、意図したように抑制されているこ  
259 とが確認された。

260

一方、ダイズ内在性 *FAD2-2* 遺伝子の場合、種子及び葉ともに非  
261 組換えダイズの場合と同様にバンドが検出された。したがって、ダ  
262 イズ内在性 *FAD2-2* 遺伝子の発現は、導入遺伝子によって抑制され  
263 ないことが確認された。

264

② *gat4621* 遺伝子

265

DP-305423-1 中の GM-HRA タンパク質の発現量を ELISA 法によ  
266 り測定した (参考文献 24)。分析には、米国の計 4 ヶ所のほ場で 2005  
267 年に栽培したある一世代の葉、地上部植物体、根及び種子を用いた。  
268 その結果、すべての部位で GM-HRA タンパク質の発現が認められた。

269

270

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

271

DP-305423-1 に抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことは、サ  
272 ザンブロット分析によって確認されている (参考文献 16)。

273

274

(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  
275 の可能性に関する事項

276

発現ベクターとして用いた直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び

277

PHP17752A に関して、遺伝子解析ソフト Vector NTI 10.3 を用いたオー  
278 プンリーディングフレーム解析の結果、意図しないタンパク質の発現に  
279 関与すると考えられる配列は認められなかった (参考文献 25)。

280

導入遺伝子と両近傍配列の接合部に関して、遺伝子解析ソフト Vector  
281 NTI 10.3 Sequence analysis software を用いた解析の結果、オープン  
282 リーディングフレームは生じていないことが確認された (参考文献 26)。

283 また、直鎖状 DNA 断片 PHP19340A 及び PHP17752A の挿入によっ  
284 て、近傍の遺伝子が損なわれていないことを確認するため、各挿入領域  
285 の 5'及び 3'末端近傍配列の blastn 検索、blastx 検索、構成成分分析及  
286 び農業形質評価を行い総合的に考察した。その結果、DP-305423-1 中に  
287 挿入された 4 領域が、ダイズ中の機能を有する内在性遺伝子に挿入され  
288 た可能性は低いと考えた (参考文献 1、27、28、29)。  
289

## 290 6 組換え体に関する事項

### 291 (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

292 DP-305423-1 は、*gm-fad2-1* 遺伝子によりオレイン酸の含有量が高ま  
293 り、*gm-hra* 遺伝子により、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐  
294 性が付与されている。  
295

### 296 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

#### 297 ① *gm-fad2-1* 遺伝子

298 ノーザンブロット分析において *gm-fad2-1* 遺伝子由来と考えられる  
299 微弱なバンドが認められた (参考文献 23)。一般に、転写後ジーンサイ  
300 レンシングでは、mRNA は dsRNA を経て分解されることが報告され  
301 ている (参考文献 30)。したがって、本 *gm-fad2-1* 遺伝子由来の mRNA  
302 も同様に分解され、翻訳される可能性は低いと考えられた。前述のよ  
303 うに、*gm-fad2-1* 遺伝子配列中の ORF 検索を行った結果、4 個の ORF  
304 が検出されたが (参考文献 25)、これらのアミノ酸配列と既知毒性タン  
305 パク質との間に、構造相同性は認められなかった。  
306

#### 307 ② GM-HRA タンパク質

308 GM-HRA タンパク質と既知毒性タンパク質との間の構造相同性を  
309 検討するため、NCBI のタンパク質データベース及び blastp アルゴリ  
310 ズム (version 2.2.13) を用い、アミノ酸配列相同性検索を行った (参  
311 考文献 28、31) その結果、相同性が認められたアミノ酸配列は 2,000  
312 個であった。この内 922 個は、細菌、古細菌及び真核生物種由来のア  
313 セト乳酸合成酵素又はアセトヒドロキシ酸合成酵素であった。残り  
314 1,078 個は、チアミンピロリン酸結合ドメインの配列を保有しているタ  
315 ンパク質であった。これらアミノ酸配列の内、毒性タンパク質との相  
316 同性を有するものは認められなかった。  
317

### 318 (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

319 GM-HRA タンパク質に関する試験に先立ち、分子量測定 (SDS-PAGE  
320 分析)、免疫反応性評価 (ウェスタンブロット分析)、アミノ酸及び N-  
321 末端配列の解析 (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析:  
322 MALDI-MS) 及びグリコシル化の有無の評価により、大腸菌で産生させ  
323 た GM-HRA タンパク質と DP-305423-1 で産生させた GM-HRA タンパ  
324 ク質の同等性を確認した (参考文献 32)。その結果、大腸菌で産生させ  
325 た GM-HRA タンパク質の N-末端には、His-T7 tag が付加されており、  
326 精製後の GM-HRA タンパク質には、His-T7 tag 由来のグリシンが 1 残  
327 基残留していた。このアミノ酸残基の残留を除き、大腸菌由来と

328 DP-305423-1 由来の GM-HRA タンパク質の免疫反応性、決定されたア  
329 ミノ酸配列及びグリコシル化されていないといった特性に相違はなか  
330 った。したがって、大腸菌由来の GM-HRA タンパク質を以下の試験に  
331 用いても問題はないと判断した。

332

333

①人工胃液に対する感受性

334

335

336

337

338

339

340

大腸菌で産生させた GM-HRA タンパク質を、人工胃液で処理し SDS-PAGE 分析した結果、GM-HRA タンパク質は試験開始 30 秒後には検出されず、20 分後には GM-HRA タンパク質の断片もほぼ検出されなくなった。また、ウェスタンブロット分析の結果、GM-HRA タンパク質は試験開始 30 秒後には消失していることが確認された（参考文献 33）。

341

②人工腸液に対する感受性

342

343

344

345

346

347

大腸菌で産生させた GM-HRA タンパク質を、人工腸液で処理し SDS-PAGE 分析した結果、GM-HRA タンパク質は試験開始 30 秒後にはほぼ検出されなくなった。また、ウェスタンブロット分析の結果、GM-HRA タンパク質は試験開始 2 分後には消失していることが確認された（参考文献 34）。

348

③加熱処理に対する感受性

349

350

351

352

353

354

ウェスタンブロット分析の結果、GM-HRA タンパク質は、70℃、15 分間の加熱処理で高次構造の変化を起こし、凝集しやすい性質を有することが示唆された。（参考文献 35）。また、GM-HRA タンパク質の酵素活性は、40～45℃の加熱で約 50%低下し、50℃15 分で完全に失活した（参考文献 36）。

355

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

356

① *gat4621* 遺伝子

357

358

359

ダイズ内在性 *FAD2-1* 遺伝子がコードする  $\omega 6$  デサチュラーゼは、オレイン酸 (C18:1) の  $\Delta 12$  ( $\omega 6$ ) 位に二重結合を挿入し、リノール酸 (C18:2) を生合成する反応を触媒する（参考文献 3、37）

360

361

362

363

364

365

366

*gm-fad2-1* 遺伝子は、ジーンサイレンシングを誘導して  $\omega 6$  デサチュラーゼの発現を抑制することを目的に導入された。ジーンサイレンシングの結果、リノール酸の生合成が抑制され、結果としてオレイン酸含有率が高まる。実際、意図したように、総脂肪酸に占めるオレイン酸含有率は非組換えダイズの約 20%に対し 75%程度に増加し、代わりにリノール酸含有率が約 50%から 4%程度に低下した（参考文献 1）。

367

②GM-HRA タンパク質

368

369

370

371

372

GM-HRA タンパク質は、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤によって阻害される内在性 ALS の代わりに、ロイシン、バリン及びイソロイシンの分枝アミノ酸合成経路で作用する。バリン・ロイシン合成経路においては、バリンにより ALS がフィードバック制御を受ける。一方、イソロイシン合成経路においては、バリンによる ALS のフィードバック

373 ク制御に加えて、初発段階の触媒酵素であるトレオニンデヒドラター  
374 ゼがイソロイシンによってフィードバック制御されていることが知ら  
375 れている（参考文献 38）。したがって、仮に GM-HRA タンパク質に  
376 より ALS の触媒活性が高まり、分枝アミノ酸合成量が高まったとして  
377 も、フィードバック制御が働くことにより、特定のアミノ酸のみの含  
378 有量が高まるとは考え難い。実際にアミノ酸分析の結果、DP-305423-1  
379 のバリン、ロイシン及びイソロイシンの含有量は、非組換えダイズと  
380 同程度であった（参考文献 1）。

381 以上のことから、GM-HRA タンパク質の産生は、宿主の持つ代謝系  
382 に影響を及ぼさないと考えられた。

383

384 (5) 宿主との差異に関する事項

385 DP-305423-1 と非組換えダイズ (Jack) について成分分析を行った  
386 (参考文献 1)。

387

388 ①主要構成成分（タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、粗繊維分、酸性  
389 デタージェント繊維、中性デタージェント繊維）

390 DP-305423-1 と非組換えダイズとの間で、脂質及び灰分に、有意差  
391 が認められたが、いずれも自社商業品種における変動の範囲又は文献  
392 値の範囲内であった。

393

394 ②脂肪酸組成

395 DP-305423-1 は、種子中オレイン酸含有率を高めることを目的に作  
396 出した。意図したように、総脂肪酸に占めるオレイン酸含有率は非組  
397 換えダイズの約 20%に対し 75%程度に増加し、代わりにリノール酸含  
398 有率が約 50%から 4%程度に低下した。パルミチン酸、ステアリン酸の  
399 統計学的有意な低下、及び前駆体であるリノール酸の低下に伴うリノ  
400 レン酸の統計学的有意な低下が認められたが、いずれも自社商業品種  
401 における変動の範囲又は文献値の範囲内であった。

402 主要脂肪酸以外の脂肪酸の内 8 種類に、DP-305423-1 と非組換えダイ  
403 ズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、ヘプタデ  
404 カン酸 (C17:0) 及びヘプタデセン酸 (C17:1) 以外は自社商業品種に  
405 における変動の範囲又は文献値の範囲内であった。種子中のヘプタデカ  
406 ン酸及びヘプタデセン酸の総脂肪酸に占める含有率は、1%程度であっ  
407 た。

408 ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸は、元来、家畜、ダイズ等、様々  
409 な動植物の体内に含まれており、新規性はない。また、家畜の飼料に  
410 利用される搾油後のダイズ油かす中の両脂肪酸の乾物重当たり含有率  
411 は、DP-305423-1 の場合、0.015%及び 0.023%と低い。したがって、  
412 非組換えダイズに代えて、DP-305423-1 由来ダイズ油かすを飼料に使用  
413 した場合、家畜が摂取するヘプタデカン酸の増加量は、体重当たり  
414 摂取量の最も多い幼雛期ブロイラーで 4.4 mg/kg 体重/日、最も少ない  
415 育成期肉牛では、0.07 mg/kg 体重/日と算出される。また、ヘプタデセ  
416 ン酸の増加量は、それぞれ 7.2 mg/kg 体重/日及び 0.12 mg/kg 体重/日  
417 と算出され、いずれも微量であった。また、DP-305423-1 を用いたブ

418           ロイラーの飼養試験における成育状態や臓器重量等の評価結果から、  
419           DP-305423-1 は、非組換えダイズと栄養学的に同等であることが示さ  
420           れた（参考文献 39、40、41）。以上のことから、ヘプタデカン酸及び  
421           ヘプタデセン酸の増加が、家畜の健康を害するおそれはないと考えら  
422           れた。

423

424           ③アミノ酸組成の分析

425           トレオニン及びグルタミン酸に非組換えダイズとの間で有意差が認  
426           められた。しかしながら、これらの値は、自社商業品種における変動  
427           の範囲又は文献値の範囲内であった。

428

429

430           ④ミネラル類

431           カルシウム及びマグネシウムに非組換えダイズとの間で有意差が認  
432           められた。しかしながら、これらの値は自社商業品種における変動の  
433           範囲又は文献値の範囲内であった。

433

434

435           ⑤ビタミン類

436           ビタミン B1 及びγ-トコフェロールに非組換えダイズとの間で有意  
437           差が認められた。しかしながら、これらの値は自社商業品種における  
438           変動の範囲又は文献値の範囲内であった。

438

439

440           ⑥栄養阻害成分

441           抗栄養素（トリプシンインヒビター、レクチン、フィチン酸）及び2  
442           次代謝産物（スタキオースやラフィノース等のオリゴ糖類、イソフラ  
443           ボン類）の分析を行った結果、トリプシンインヒビター、スタキオー  
444           ス、ゲニスチン、マロニルゲニスチン、ダイジン及びマロニルダイジ  
445           ンに、非組換えダイズとの間で有意差が認められた。しかしながら、  
446           これらの値はいずれも自社商業品種における変動の範囲又は文献値の  
447           範囲内であった。

447

448

449           (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

450           米国及び日本で行われた栽培試験において、生存及び増殖能力に関し  
451           て非組換えダイズと同等であることが確認されている。

451

452

453           (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

454           DP-305423-1 の生存及び増殖能力は従来のダイズと同等であり、その  
455           生存及び増殖能力は従来のダイズと同様の制限を受けると考えられる。

455

456

457           (8) 不活化法に関する事項

458           上記 DP-305423-1 は従来のダイズと同様に、耕起による土壤中への  
459           鋤き込みや、除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤以外の除草剤の散布によ  
460           って、不活化することができる。

460

461

462           (9) 外国における認可等に関する事項

          米国食品医薬品局（FDA）より 2009 年 1 月に食品・飼料としての安

463 全性が確認された。  
464 カナダ食品検査庁 (CFIA) より 2009 年 5 月に飼料としての安全性が  
465 確認された。  
466 韓国農村振興庁 (RDA) へ 2008 年 7 月に飼料としての安全性審査を  
467 申請した。

468  
469 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項  
470 DP-305423-1 の栽培方法は従来のダイズと変わらない。

471  
472 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項  
473 DP-305423-1 の種子の製法及び管理方法は、従来のダイズと変わらな  
474 い。

475  
476 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  
477 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  
478 該当しない。

479  
480 IV 審議結果

481 高オレイン酸含有ダイズ (DP-305423-1) について、「組換え  
482 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  
483 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。

484  
485 V 参考文献

- 1 PHASE REPORT TITLE : Nutrient Composition Analysis of Soybean Line DP-305423-1: U.S. and Canada Locations (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2005-002/020). (社内報告書)
- 2 Kinney, A.J. 1994. Genetic modification of the storage lipids of plants. *Current Opinion in Biotechnology* 5: 144-151.
- 3 Heppard, E.P., Kinney, A.J., Stecca, K.L., and Miao, G.-H. 1996. Developmental and Growth Temperature Regulation of Two Different Microsomal omega-6 Desaturase Genes in Soybeans. *Plant Physiol* 110: 311-319.
- 4 農学大事典 第2次増訂改版 1994. 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 株式会社 養賢堂発行、p537-541.
- 5 OECD. 2000. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 15. Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). ([http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2000\)9](http://www.olis.oecd.org/olis/2000doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2000)9)).
- 6 OECD. 2001. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 2. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: Key food and feed nutrients, and anti-nutrients. *Organization for Economic Co-operation and Development, ENV/JM/MONO(2001)15*. ([http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/NT00005036/\\$FILE/JT00117705.PDF](http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/NT00005036/$FILE/JT00117705.PDF))
- 7 作物学各論 第1刷. 1999. 石井龍一、中世古公男、高崎康夫. 朝倉書店. p61.
- 8 Kuroda, Y., Kaga, A., Tomooka, N., and Vaughan, D. A. 2008. Gene flow and genetic structure of wild soybean (*Glycine soja*) in Japan. *Crop Sci* 48:1071-1079.

- 9 Nakayama, Y., and Yamaguchi, H. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management* 2: 25-30.
- 10 農環研ニュース. 2008. ほ場で遺伝子組換えダイズとツルマメが交雑する可能性は低い. 78: 3-4.
- 11 配合飼料供給安定機構. 2009. 配合・混合飼料の生産動向. (<http://mf-kikou.lin.go.jp/seisan/seisan.htm>).
- 12 農業技術体系. 2002 (最終追補年度). 作物編第6巻 ダイズ・アズキ・ラッカセイ. 社団法人 農山漁村文化協会.
- 13 Natarajan, S., Xu, C., Bae, H and Bailey, B.A., 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotype. *J Plant Physiol* 164, 756-763.
- 14 Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Meth Enzymol* 155, 397-415.
- 15 Gritz, L. and Davies, J. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *E. coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25: 179-188.
- 16 STUDY TITLE : Molecular Characterization of DP-305423-1 Soybean(SYUDY ID: PHI-2007-100). (社内報告書)
- 17 Klein T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
- 18 Jofuku, K.D. and R.B. Goldberg. 1989. Kunitz Trypsin Inhibitor Genes Are Differentially Expressed during the Soybean Life Cycle and in Transformed Tobacco Plants. *Plant Cell* 1: 1079-1093.
- 19 Jofuku, K.D., Schipper, R.D., and Goldberg, R.B. 1989. A Frameshift Mutation Prevents Kunitz Trypsin Inhibitor mRNA Accumulation in Soybean Embryos. *Plant Cell* 1: 427-435.
- 20 Falco, S.C. and Li, Z. 2003. S-adenosyl-L-methionine synthetase promoter and its use in expression of transgenic genes in plants. United States Patent Application No 2003/0226166.
- 21 Broach, J.R., Guarascio V.R., and M. Jayaram. 1982. Recombination within the yeast plasmid 2 mu circle is site-specific. *Cell* 29: 227-234.
- 22 STUDY TITLE : Sequence Characterization of Inserts and Genomic Border Regions of Soybean Event DP-305423-1 (LABORATORY STUDY ID: PHI-2006-010/041). (社内報告書)
- 23 STUDY TITLE : Gene Expression Studies on DP-305423-1 by Northern Blot Analysis on Leaf Tissue and Developing Seed (LABORATORY STUDY ID: PHI-2005-046). (社内報告書)
- 24 PHASE REPORT TITLE : Quantitative ELISA of a Soybean Progenitor Line Containing Event DP-305423-1: U.S. Locations (PHASE REPORT NUMBER: PHI-2005-001/000). (社内報告書)
- 25 TITLE : PHP19340A and PH17752A Open Reading Frame Analysis. (社内報告書)
- 26 STUDY TITLE : Reading Frame Analysis of Novel Junctions within Soybean Event DP-305423-1 using a 20 Amino Acid Length Cutoff (LABORATORY STUDY ID: PHI-2008-222/070). (社内報告書)
- 27 STUDY TITLE : BLASTn/BLASTx Analysis of the Flanking Border Sequences Comprising Soybean Event DP-305423-1 (LABORATORY STUDY ID: PHI-2008-221). (社内報告書)
- 28 NCBI. 2006, 2008. National Center for Biotechnology Information. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- 29 環境省. 2007. ([http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public\\_comment/DP\\_305423](http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/DP_305423))

- \_1ap.pdf)
- 30 Waterhouse, P.M. and Helliwell, C.A. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat Rev Genet* 4: 29-38.
- 31 STUDY TITLE : Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the GM-HRA Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets (LABORATORY STUDY ID: PHI-2006-071). (社内報告書)
- 32 STUDY TITLE : Equivalency Assessment of the GM-HRA Protein Derived from a Microbial Expression System with the GM-HRA Protein Derived from Soybeans Containing Event DP-305423-1 (STUDY NUMBER: PHI-2006-020). (社内報告書)
- 33 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of GM-HRA using Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2006-199). (社内報告書)
- 34 STUDY TITLE : Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of GM-HRA (STUDY NUMBER: PHI-2006-074). (社内報告書)
- 35 STUDY TITLE : Characterization of the Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the GM-HRA Protein using Western Blot Analysis (STUDY NUMBER: PHI-2006-211/018). (社内報告書)
- 36 STUDY TITLE : Characterization of the Thermal Stability of GM-HRA Enzyme Activity (STUDY NUMBER: 2006-135). (社内報告書)
- 37 Okuley, J., Lightner, J., Feldmann, K., Yadav, N., Lark, E., and Browse, J. 1994. Arabidopsis *FAD2* gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6: 147-158.
- 38 生化学辞典 第3版. 1998. 監修 今堀和友、山川民夫. 東京化学同人. p67.
- 39 ヘプタデカン酸 (C17:0) 及びヘプタデセン酸 (C17:1) の含有量の増加に関する考察 (社内報告書)
- 40 肉類、穀物及び魚類中のヘプタデカン酸 (C17:0) 及びヘプタデセン酸 (C17:1) 含有量 (社内報告書)
- 41 McNaughton, J., Roberts, M., Smith, B., Rice, D., Hinds, M., Sanders, C., Layton, R., Lamb, I., and Delaney, B. 2008. Comparison of Broiler Performance When Fed Diets Containing Event DP-305423-1, Nontransgenic Near-Isoleucine Control, or Commercial Reference Soybean Meal, Hulls, and Oil. *Poult Sci* 87:2549-2561