

「ラウンドアップ・レディー・テンサイ H7-1 系統」に係る安全性確認

I はじめに

ラウンドアップ・レディー・テンサイ H7-1 系統(以下「H7-1 系統」という。)について、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づき組換え 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を定める件」(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 : ラウンドアップ・レディー・テンサイ H7-1 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、KWS Saat AG

H7-1 系統は、グリホサート(商品名：ラウンドアップ)存在下でも機能する CP4 EPSPS たん白質を発現する遺伝子(*cp4 epsps* 遺伝子)を導入したものであり、グリホサートの影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

H7-1 系統と既存のテンサイとの相違は、H7-1 系統が CP4 EPSPS たん白質の発現により、グリホサートの影響を受けない点だけである。

一般に、加工副産物の乾燥ビートパルプ、乾燥糖蜜、ペレット化糖蜜及びテンサイ糖蜜並びに葉及び根部上端が家畜等の飼料として使用される。

III 審議内容

1 生産物の既存のものと同等性に関する事項

1 遺伝的素材に関する事項

宿主として用いた植物はテンサイ(*Beta vulgaris* L.)で、アカザ科(*Chenopodiaceae*)に属し、民間育成品種である 3S0057 品種が遺伝子組換えに用いられた。導入に用いた *cp4 epsps* 遺伝子は土壌微生物である *Agrobacterium* sp. CP4 株から同定・単離した(参考文献①)。

2 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるテンサイは、糖に加工する際に副産物として生産される乾燥ビートパルプ、乾燥糖蜜、ペレット化糖蜜及びテンサイ糖蜜が、乳牛、肉牛及びヒツジの飼料として使用されている(参考文献②)。また、テンサイ地上部が動物用飼料として利用されることが稀にある(参考文献③)。

3 飼料の構成成分等に関する事項

H7-1 系統、非組換えテンサイ及び一般商業品種の地上部及び根部組織を用いて、成分分析(乾物重、粗蛋白、粗繊維、粗灰分、粗脂肪及び可溶性炭水化物)を実施し、根部組

織については、品質評価のための成分分析(糖度、カリウム、ナトリウム、転化糖及びアミノ窒素)も実施した。また、テンサイ中に含まれる栄養阻害物質であるサポニンの含有量についても実施した。その結果、H7-1 系統と対照の非組換えテンサイ及び一般商業品種の分析値との間に生物学的に意味のある差はないことが示された。

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

H7-1 系統と既存のテンサイとの唯一の相違は、H7-1 系統が CP4 EPSPS たん白質の発現により、グリホサートの影響を受けずに生育する点だけである。栽培期間中にラウンドアップを使用できる点を除けば、H7-1 系統の栽培方法は既存のテンサイと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法の使用方法についても既存のテンサイと全く相違はない。

以上 1.1~1.4 により、H7-1 系統の飼料としての安全性を評価するために、既存の飼料を比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

H7-1 系統はグリホサートの存在下でも機能する CP4 EPSPS たん白質を発現する *cp4 epsps* 遺伝子が導入され、グリホサートの影響を受けずに生育することができる。結果として、グリホサートをその栽培期間中に約 3 回散布するだけでほぼ完全に雑草を防除することができるようになるため、雑草の発生に応じたより効果的で省力的な除草が行えるようになる。

3 宿主に関する事項

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

宿主はアカザ科に属する二年生草本であるテンサイ(*Beta vulgaris* L.)の多胚性の従来品種である 3S0057 品種が遺伝子組換えに用いられた。

2 遺伝的先祖に関する事項

テンサイと同種であるビート類は紀元前 6 世紀から 4 世紀には栽培化され利用されてきたと考えられている。ビート類のうち、根部のショ糖含量が高いものが 18 世紀末にテンサイとして初めて栽培化された(参考文献④)。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

テンサイはサポニンを生産することが知られている。サポニンはトリテルペン配糖体であり、多様な生理活性を示し、テンサイ以外でもマメ、ジャガイモ、アスパラガス等の多くの作物にも含まれる成分である(参考文献⑤)。

4 寄生性及び定着性に関する事項

テンサイは種子植物であり、それを食する家畜等に寄生又は定着するという報告はない。

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

テンサイにはテンサイウイルス病などの病害が発生する。これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。また、これらの病害に対して、媒介昆虫の殺虫剤による防除、殺菌剤による防除等が行われている。

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

テンサイは種子により繁殖する。わが国においてテンサイが自生したという報告はない。

7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

テンサイは 2 年生植物であり、栽培 2 年目に開花・結実する。花芽を形成する前である栽培 1 年目に根部を収穫する為、通常の栽培においては開花することはない。テンサイは風媒を主体とし、高度な自家不和合性を有する他殖性植物である。テンサイと交雑可能な植物種は *Beta* 属 *Beta* 亜属に属する植物種のみであるが、わが国には *Beta* 属植物は自生していない。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

テンサイの属する *Beta* 属植物は有史以前から飼料・食用として利用されているが、家畜等に対して有害であるとは考えられていない。

9 飼料の安全な利用に関する事項

テンサイを糖に加工する際に副産物として生産される乾燥ビートパルプ、乾燥糖蜜、ペレット化糖蜜及びテンサイ糖蜜が、乳牛、肉牛及びヒツジの飼料として使用されている(参考文献②)。また、テンサイ地上部が動物用飼料として利用されることが稀にある。テンサイは飼料として安全に利用されている(参考文献③)。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

テンサイが雑草として自生することはない。作物に前年作のテンサイが混じっていても、雑草用の広葉除草剤あるいは他の農薬、耕起により死滅する。

11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

テンサイに含まれるサポニンや、テンサイと交雑可能な *Beta vulgaris* 種の変種であるフダンソウ、食用根菜ビート、飼料用ビートが家畜等に対して有害であるとは考えられていない。

4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

H7-1 系統の作出に用いたベクターは、*E. coli* プラスミド pBR322 に由来するプラスミド PV-BVGT08 である(参考文献⑥)。

2 性質に関する事項

プラスミド PV-BVGT08 の塩基数は 8,590bp である。プラスミド PV-BVGT08 に存在する全ての遺伝子は、その由来・機能が明らかになっており、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 PV-BVGT08 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 *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aad* 遺伝子を持つ。*aad* 遺伝子は T-DNA 領域外に存在しているため、H7-1 系統中に導入されなかった。

4 伝達性に関する事項

プラスミド PV-BVGT08 は、伝達性に関与する DNA 配列を持たない。

5 宿主依存性に関する事項

プラスミド・ベクター PV-BVGT08 は、自律増殖可能な宿主が *E. coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* といった細菌に限られている。

6 発現ベクターの作成方法に関する事項

まず pUC ベクター中で CTP1-*GOX* 配列を P-FMV と NOS 3'間に挿入・結合した。次に P-FMV-CTP1-*GOX* 配列を pBR322 由来のプラスミドに移入し、その際に E9 3'と結合して *GOX* 発現ベクターを構築した。このベクターの CTP1-*GOX* 配列を CTP2-*cp4 epsps* 配列と置換し、本ベクターに含まれていた *nptII* 遺伝子発現カセットを *XhoI* 切断部位で除去してプラスミド・ベクター PV-BVGT08 を構築した(参考文献⑥)。

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

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクター PV-BVGT08 の T-DNA 領域をテンサイ細胞の染色体上に導入した。

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

cp4 epsps 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株より単離された(参考文献①)。*Agrobacterium* は、土壤中及び植物の根圏に存在する微生物の一つである。

(2) 安全性に関する事項

H7-1 系統中で発現する CP4 EPSPS たん白質は植物や微生物が有する芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つである。EPSPS たん白質の酵素機能は既知のものであり、これまでに家畜等は植物や微生物から様々な EPSPS たん白質を摂取してきている。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

4.6 及び 4.7 参照。

3 構造に関する事項

プロモーターとして Figwort Mosaic Virus (FMV)の 35S プロモーターを用いた(参考文献⑦～⑩)。ターミネーターには、エンドウの *rbcS E9* 遺伝子から得た 3'非翻訳領域を用いた(参考文献⑪、⑫)。プラスミド PV-BVGT08 に含まれる全ての遺伝子はその特性が明らかとなっており、既知の有害な塩基配列を含んでいない。

4 性質に関する事項

cp4 epsps 遺伝子は、グリホサート存在下でも酵素活性を示す EPSPS(5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素)たん白質を発現する。EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つで、その基質特異性はホスホエノールピルビン酸とシキミ酸-3-リン酸であり、その機能は既知のものである。

5 純度に関する事項

cp4 epsps 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株よりプラスミド・ベクターにクローニングされたものであり、その塩基配列は明らかにされている。

6 安定性に関する事項

H7-1 系統の F1 雑種系統及び自殖系統において、*cp4 epsps* 遺伝子の発現を指標とした分離比調査を行った結果、実測値と期待値との間に統計的に優位な差は見られなかった。また、自殖世代の R0~R3 の 4 世代について、*cp4 epsps* 遺伝子領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、挿入遺伝子の安定性が確認された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、*cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの 1 コピーが、H7-1 系統のゲノムの 1 ヶ所に挿入されていることが確認された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

H7-1 系統における CP4 EPSPS たん白質の発現量の範囲は、葉で 112~201µg / g 生組織重、根部で 145~202 µg / g 生組織重であった。また、除草剤ラウンドアップの散布による生物検定において安定した耐性を示した。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

H7-1 系統の作出に用いたプラスミド PV-BVGT08 には、プラスミドの構築・選抜及び増殖に必要な選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性を付与する *aad* 遺伝子を有しているが、*aad* 遺伝子はベクターの T-DNA 領域外にある。サザンブロット分析及び PCR 分析による導入遺伝子の解析において、H7-1 系統中に

*aad*遺伝子は導入されていないことが確認されている。

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

H7-1 系統のゲノムには、プラスミド・ベクターPV-BVGT08 の T-DNA 領域の *cp4 epsps* 遺伝子カセットが存在し、T-DNA 領域外のベクター配列を持たないことが確認されている。

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

H7-1 系統と既存のテンサイ品種との唯一の違いは、H7-1 系統が CP4 EPSPS たん白質の発現により、グリホサートの影響を受けない点である。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

データベース(GenBank/EMBL Genpept ver. 108、PIR and NRL3Dver. 56 及び Swissprot ver. 36)中に「毒素」として登録されている 4,677 の既知の毒素から成るデータベース TOXIN4 を用いて検索を行った結果、CP4 EPSPS たん白質と既知の毒性たん白質との間に相同性は認められなかった(参考文献⑬、⑭)。

また、CP4 EPSPS たん白質を用いてマウスの急性強制経口投与試験を自社内で行った結果、CP4 EPSPS たん白質の最大投与量 572mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった(参考文献⑮)。

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) 人工胃液に対する感受性

CP4 EPSPS たん白質は、15 秒後に検出限界以下に消失することがウェスタンブロット分析により確認された。

(2) 人工腸液に対する感受性

CP4 EPSPS たん白質は、10 分後に大半が消失し、100 分後に完全に消失することがウェスタンブロット分析により確認された。

(3) 加熱処理に対する感受性

約 200℃で約 25 分間の加熱条件により CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性が 99% 以上失われることが ELISA 分析により確認された。また、CP4 EPSPS たん白質の酵素活性も 99%以上消失することが確認されている。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS たん白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)に反応する。PEP と S3P 以外に EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P 類似体であるシキミ酸のみである。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であることから、シキミ酸が植物体内で EPSPS たん白質と反応することはないと考察された。

5 宿主との差異に関する事項

H7-1 系統がグリホサートに耐性を示す以外は、有害物質の産生性、生殖・繁殖様式、周期、交雑性、生殖・繁殖能力の制限要因について、対照の非組換えテンサイとの間で差異はないことがヨーロッパ及び米国で行われた圃場試験により示されている。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

ヨーロッパ及び米国で行われた H7-1 系統の圃場試験において、生存・増殖能力に関し非組換え品種と差異は認められなかった。

7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

ヨーロッパ及び米国で行われた H7-1 系統の圃場試験において、生存・増殖能力に関し非組換え品種と差異は認められなかったことから、制限要因についても同等であると考察された。

8 不活化法に関する事項

物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の散布)など、テンサイを枯死させる従来の方法によって H7-1 系統は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

H7-1 系統の認可・申請状況(2004 年 12 月現在)

日本	食品	2003年6月に認可
	環境	2004年11月に隔離ほ場試験実施の為申請、現在審査中
アメリカ	食品・飼料	2004年8月に認可
	環境	2003年11月に申請、現在審査中
カナダ	飼料・環境	2003年4月に申請、現在審査中
	食品	2003年4月に申請、現在審査中

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

H7-1 系統と既存のテンサイとの栽培方法の相違は、生育期の雑草防除にグリホサートが使用できるか否かの点のみであり、他の点では同じである。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

H7-1 系統の種子の製法及び管理方法については、既存のテンサイと同様である。

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

- 1 単回投与の毒性に関する試験
- 2 反復投与の毒性に関する試験(短期)
- 3 反復投与の毒性に関する試験(長期)

- 4 世代繁殖に関する試験
- 5 催腫瘍性に関する試験
- 6 変異原性に関する試験
- 7 催奇形性に関する試験
- 8 対象家畜等を用いた飼養試験
- 9 その他必要な試験

IV 審議結果

ラウンドアップ・レディー・テンサイ H7-1 系統について、「飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の規定に基づき組換え 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を定める件」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

- ① Padgett, S.R. *et al.*. 1993. Purification, Cloning and Characterization of a Highly Glyphosate-tolerant EPSP Synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4. Monsanto Technical Report MSL-12738, St. Louis.
- ② Sugarbeet Research and Education Board. 1998. [http : //www.sbreb.org/brochures](http://www.sbreb.org/brochures).
- ③ AgrEvo. 1997. Petition for Determination of Non-regulated Status for Sugar Beet Genetically Engineered for Glufosinate Herbicide Tolerance. USDA-APHIS Petition No. 97-336-01p.
- ④ OECD. 2001. Consensus document on the biology of Beta Vulgaris L. (sugar beet). Series on Harmonization of Regulatory oversight in Biotechnology No. 18. Environment Directorate/ Joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals. Organization for Economic Co-Operation and Development, Paris, France.
- ⑤ Oakenfull, D and G.S.Sidhu. 1989. Saponins. In *Toxicants of Plant Origin*. Vol. II Glycosides. CRC Press, Boca Raton, FL, pp.97-141.
- ⑥ Kolacz *et al.*, 1994. Glyphosate Tolerant Canola: plant transformation vectors and transformation procedure. Monsanto Technical Report MSL-13247, St. Louis.(未公表)
- ⑦ Gowda, S., F.C.Wu, and R.J.Shepard. 1989. Identification of Promoter Sequences for the Major RNA Transcripts of Figwort Mosaic and Peanut Chlorotic Streak Viruses (Caulimovirus Group). *J.Cell. Biochem.* 13D (supplement) : 301.
- 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 Sanger, M. *et al.*. 1990. Characteristics of a Strong Promoter from figwort Mosaic Virus : Comparison with the Analogous 35S Promoter from Cauliflower Mosaic Virus and the Regulated Mannopine Synthase Promoter. *Plant Mol. Biol.* **14** : 433-443.
- ⑩ Sheperd, R.J. *et al.*. 1987. Figwort Mosaic Virus : Properties of the Virus and its Adaptation to a New Host. *Phytopathology* **77** : 1668-1673.
- ⑪ Coruzzi, G. *et al.*. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *EMBO J.* **3** : 1671-1679.
- ⑫ Morelli, G. *et al.*. 1985. A Short Conserved Sequence is Involved in the Light-inducibility of a Gene Encoding Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase Small Subunit of Pea. *Nature* **315** : 200-204.
- ⑬ Hileman and Astwood, 1999. Bioinformatics Analysis of CP4 EPSPS Protein Sequence Utilizing an

Allergen Database, Monsanto Technical Report MSL-16267, St. Louis. (未公表)

- ⑭ Hileman and Astwood, 1999. Bioinformatics Analysis of CP4 EPSPS Protein Sequence Utilizing Toxin and Public Domain Genetic Databases, Monsanto Technical Report MSL-16268, St. Louis. (未公表)
- ⑮ Naylor, M.W. 1993. Acute Oral Toxicity Study of CP4 EPSPS in Albino Mice, Monsanto Technical Report MSL-13027, St. Louis. (未公表)