

「除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ  
DP-356043-5」に係る安全性確認

I はじめに

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5（以下「DP-356043-5」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：除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ  
DP-356043-5

性 質：除草剤グリホサート耐性、アセト乳酸合成酵素阻害剤耐性

申請者：デュポン株式会社

開発者：パイオニア・ハイブレット・インターナショナル社

DP-356043-5は、*Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来する *gat4601* 遺伝子（以下「*gat4601* 遺伝子」という。）及びダイズ (*Glycine max* L.) のアセト乳酸合成酵素遺伝子由来の *gm-hra* 遺伝子（以下「*gm-hra* 遺伝子」という。）が導入されており、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素を阻害する除草剤による影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

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

宿主に用いた植物は、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) である。DP-356043-5 に導入された *gat4601* 遺伝子は、グラム陽性細菌である *Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) に由来し、*gm-hra* 遺伝子はダイズのアセト乳酸合成酵素遺伝子に由来する（参考文献 1、2）。

(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、主として油かすの形態で広範囲な家畜等の飼養経験を持つ。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

宿主であるダイズ及び DP-356043-5 の主要構成成分（タンパク質、脂質、粗繊維分、酸性デタージェントファイバー、中性デタージェントファイバー、灰分、炭水化物）、毒性物質・抗栄養素（トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、ラフィノース、スタキオースフィチン酸）の量は明らかになっている。（参考文献 3、4、5、6、50）

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

DP-356043-5 と既存のダイズとの相違は、DP-356043-5 が GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の発現により、除草剤グリホサート及び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のみである。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)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相違はない。

以上 (1) ~ (4) により、DP-356043-5 の飼料としての安全性を評価するために、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

DP-356043-5 は GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の発現により除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤に耐性を示し、栽培農家は異なる特性を持つ2つの除草剤を有効に利用することが可能となる。

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

宿主はダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) で、DP-356043-5 の作出にはダイズ品種 Jack が用いられた。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

ダイズの出産地は中国で、その祖先は野生種のツルマメ (*G. soja* Sieb. & Zucc.) であると考えられている (参考文献 7、8)。

(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、トリプシンインヒビター、レクチン、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知られている (参考文献 4)。

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化を阻害する (参考文献 4)。

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、ダイズ粉にして炒ったりすると約 100 分の一に減少する (参考文献 4)。

イソフラボンは、主にダイズの胚芽に多く含まれるフラボノイドの一種で、ほとんどの場合、飼料中ではダイジン、ゲニスチン、グリシチンなどの配糖体として存在している。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ゲン、抗エストロゲン及び低コレステロール様などの生化学活性を示す。一方、健康増進成分としても報告されている (参考文献 4)。

ラフィノース及びスタキオースは低分子量の炭水化物で、摂取によってガス化し、腹部を膨張させる原因物質である (参考文献 4)。

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、これらのミネラルの吸収を阻害することが知られている（参考文献4）。

(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、寄生性及び定着性は知られていない。

(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

ダイズの病気が、家畜等に感染することは知られていない。

(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

ダイズは種子繁殖する一年生の双子葉植物であり、基本的に開花前に蕾の中で自家受粉する自殖性植物である。自家不和合性は知られておらず、また、自然交雑率は 0.5%から 3%と報告されている（参考文献7、9、10、11、12、13）。

ダイズの近縁野生種としてツルマメが存在する（参考文献7、8）。ツルマメは、ダイズの祖先と考えられており、ダイズとの交雑が可能である（参考文献13）。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

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 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いる（参考文献7、8）。ダイズ栽培の普及に伴い、油かすが飼料として利用されてきた歴史及び広範囲な家畜等に対する安全な飼養経験がある。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

上記（8）のとおり、ダイズは飼料として安全に利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

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8）。なお、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、種子は急速に発芽能力を失う（参考文献13）。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズの近縁種として、ダイズの祖先と考えられている野生種のツルマメが存在する（参考文献7、8）。ツルマメの持つ有害生理活性物質として、トリプシンインヒビター等の報告がある（参考文献14）。

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-356043-5 の作出には、*gat4601* 遺伝子及び *gm-hra* 遺伝子発現カセットを持つ直鎖状 DNA 断片 PHP20163A が用いられた。直鎖状 DNA 断片 PHP20163A は、プラスミド pSP72 を基本骨格として作製されたプラスミド PHP20163 由来である。

(2) 性質に関する事項

プラスミド pSP72 の塩基数は 2,462bp である。プラスミド pSP72 に存在する全ての遺伝子の性質は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 pSP72 には、アンピシリン耐性マーカーとして *amp* 遺伝子（参考文献 15）が含まれている。DP-356043-5 の作出に用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A には、*amp* 遺伝子発現カセット領域は含まれていない。

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pSP72 は、プラスミドの伝達を可能にする配列を持たない。

(5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pSP72 は、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

市販の pSP72（プロメガ社製）に *hyg* 遺伝子（参考文献 16）発現カセットを挿入し、続いて *amp* 遺伝子を削除してプラスミド pZSL81 が構築された。次に、pZSL81 に *gm-hra* 遺伝子発現カセット領域を挿入し、プラスミド pZSL86 が構築された。プラスミド pZSL86 に、*gat4601* 遺伝子発現カセット領域を挿入し、*gat4601* 遺伝子発現カセットと *gm-hra* 遺伝子発現カセットの配列を含むプラスミド PHP20163 が構築された。制限酵素 *Not I*(1)及び *Acs I*(5363)で処理することによって直鎖状 DNA 断片 PHP20163A を得た。

(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

直鎖状 DNA 断片 PHP20163A を Bio-Rad 社の Biolistics® PDS-1000He パーティクルガンを用いて（参考文献 17）、宿主に挿入された。

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

*gat4601* 遺伝子は、*Bacillus licheniformis* (ST401 株、B6 株、DS3 株) 由来であり、*gm-hra* 遺伝子は、ダイズ由来である。

②安全性に関する事項

*gat4601* 遺伝子の供与体である *B. licheniformis* は、土壌中に普遍的に存在するグラム陽性菌であり、植物及びヒト、その他の動物に対しての病原性は、知られていない。

*gm-hra* 遺伝子の供与体であるダイズは古くから飼料及び食品として利用されてきた経験がある。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

*gat4601* 遺伝子発現カセットと *gm-hra* 遺伝子発現カセットが組み込まれた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A が、パーティクルガン法により宿主に導入された。

(3) 構造に関する事項

*gat4601* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、CaMV 由来の 35S プロモーター領域及び Rsyn7-SynCoreII プロモーター領域から構築された SCP1 プロモーターである。*gm-hra* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、ダイズ由来の S-アデノシル-L-メチオニンシンテターゼ (SAMS) プロモーターである (参考文献 18)。

また、*gat4601* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、バレイショ由来の *pinII* ターミネーターである (参考文献 19、20)。*gm-hra* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ダイズ由来の *gm-als* ターミネーターである (参考文献 18)。プラスミド PHP20163 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、既知の有害な塩基配列を含んでいない。

(4) 性質に関する事項

表 1 にまとめた。

(5) 純度に関する事項

発現ベクターとして用いた直鎖状 DNA 断片 PHP20163A は、プラスミド PHP20163 を制限酵素 *Not I* と *Asc I* による処理後、アガロースゲル電気泳動によって単離され純化されている。

(6) 安定性に関する事項

挿入遺伝子の安定性を確認するために行われたサザンブロット分析の結果、挿入遺伝子は後代に安定して遺伝していることが確認された (参考文献 25)。

(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、DP-356043-5 のゲノムには、完全な *gat4601* 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 1 コピーの PHP20163A が導入されていること、DP-356043-5 に PHP20163 に由来する外骨格領域が導入されていないことが確認された (参考文献 25)。

また、PCR 分析の結果から決定した近傍配列はダイズゲノムに由来していることが確認された (参考文献 26)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

DP-356043-5 における GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の発現量を ELISA 法により測定したところ、表 2 のとおりであった (参考文献 27)。

表 1 直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の構成 DNA

構成要素	由来及び機能
<i>gat4601</i> 遺伝子発現カセット	
SCP1 Promoter	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター領域 (参考文献 21) の一部と Rsyn7-SynCoreII プロモーター (参考文献 22、参考文献 23) 領域から構築されたプロモーター。
TMV omega 5'UTR	タバコモザイクウイルス (TMV) オメガ 5'非翻訳領域の転写を促進するエンハンサー領域 (参考文献 24)。
<i>gat4601</i>	<i>B. licheniformis</i> 由来の GAT4601 タンパク質をコードする遺伝子。
<i>pinII</i> Terminator	バレイショ由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子のターミネーター (参考文献 19; 参考文献 20)。
<i>gm-hra</i> 遺伝子発現カセット	
SAMS Promoter	ダイズ由来の S-アデノシル-L-メチオニンシンターゼ (SAMS) 遺伝子のプロモーター (参考文献 18)。
SAMS Intron	ダイズ由来の SAMS 遺伝子の 5'非翻訳領域内に存在するイントロン領域 (参考文献 18)。
<i>gm-hra</i>	ダイズ由来の GM-HRA タンパク質をコードする遺伝子。
<i>gm-als</i> Terminator	ダイズのアセト乳酸合成酵素遺伝子のターミネーター (参考文献 18)。

表 2 DP-356043-5 の各組織における GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の発現量

調査部位	調査時期	ng/mg 乾物重	
		GAT4601 タンパク質	GM-HRA タンパク質
地上部	着莢期	1.6 ± 0.32	27 ± 8.0
根	着莢期	1.6 ± 0.39	3.2 ± 2.2
種子	収穫期	0.24 ± 0.07	0.91 ± 0.17

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

DP-356043-5 に抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことは、サザンブロット分析によって確認されている (参考文献 25)。

(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

発現ベクターとして用いた直鎖状DNA断片PHP20163Aに関して、遺伝子解析ソフト Vector NTI 9.1を用いたオー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26）。

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 NTI 10.3 Sequence analysis software を用いた解析の結果、オープン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57）。

また、直鎖状DNA断片PHP20163Aの挿入によって、近傍の遺伝子が損なわれていないことを確認するため、ダイズゲノム及びEST配列を含むデータベースを用いてblastn検索が行われた。その結果、EST配列と相同性のある2個のEST配列が検索され、その中に計8個のオープンリーディングフレームが確認されたが、いずれも既知のタンパク質と相同性のあるアミノ酸配列ではないことが確認された（参考文献58）。

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

DP-356043-5 は、GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の発現により、除草剤グリホサートと除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤に対する耐性が付与されている。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

①GAT4601 タンパク質

GAT4601 タンパク質は、*N*アセチルトランスフェラーゼの一種である。アセチルトランスフェラーゼは植物、動物及び微生物を含めた全ての生物に遍在しており（参考文献 28）、*N*アセチルトランスフェラーゼが毒性を有するという知見は報告されていない。

GAT4601 タンパク質と既知毒性タンパク質の間の構造相同性を確認するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI、参考文献 29) から入手可能なタンパク質アミノ酸配列データベースと、BLASTP アルゴリズムを用いてアミノ酸配列相同性検索が行われた。その結果、GAT4601 タンパク質と既知毒性タンパク質との相同性は認められなかった（参考文献 30）。

②GM-HRA タンパク質

GM-HRA タンパク質は、ダイズのアセト乳酸合成酵素 (ALS) タンパク質の改変型である。ALS タンパク質は細菌、糸状菌、藻類及び高等植物種に存在することが知られており（参考文献 31、32、33、34）、ALS タンパク質が毒性を有するという知見は報告されていない。

*gm-hra* 遺伝子がコードする GM-HRA タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性について、GAT4601 タンパク質と同様の手法で評価した。その結果、GM-HRA タンパク質は、既知毒性タンパク質との相同性がないことが確認された（参考文献 35）。

### (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

試験に先立ち、ウェスタンブロット分析、アミノ酸配列の測定、N-末端配列の測定、グルコシル化の有無の評価により、大腸菌で産生させた GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質と、DP-356043-5 中に産生される GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質の同等性を確認した。

その結果、大腸菌で産生させた GAT4601 タンパク質と、DP-356043-5 中に産生される GAT4601 タンパク質は同等であることを確認した（参考文献 36）。

一方、大腸菌で産生させた GM-HRA タンパク質は、DP-356043-5 中に産生される葉緑体移行配列が切断された成熟型の GM-HRA タンパク質と比べて N-末端に 1 残基のグリシンが余分に付加されていた（参考文献 37）。しかしながら、この N-末端のグリシンの付加を除き、微生物由来と DP-356043-5 由来の GM-HRA タンパク質の免疫反応性、決定されたアミノ酸配列及び非グリコシル化といった特性に相違はないことから、微生物由来の GM-HRA タンパク質を試験に供して問題ないと考えられた。

#### ①人工胃液に対する感受性

##### (i) GAT4601 タンパク質

大腸菌で産生させた GAT4601 タンパク質を、人工胃液で処理し SDS-PAGE 分析した結果、完全長の GAT4601 タンパク質は試験開始後 30 秒後には検出されず、GAT4601 タンパク質の断片は 60 分後まで認められた。また、ウェスタンブロット分析の結果、GAT4601 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 38、39）。

##### (ii) GM-HRA タンパク質

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（参考文献 38、40）。

#### ②人工腸液に対する感受性

##### (i) GAT4601 タンパク質

大腸菌で産生させた GAT4601 タンパク質を、人工腸液で処理し SDS-PAGE 分析した結果、完全長の GAT4601 タンパク質は試験開始 2 分後には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、GAT4601 タンパク質は試験開始 5 分後には消失していることが確認された（参考文献 38、41）。

##### (ii) GM-HRA タンパク質

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 38、42）。

### ③加熱処理に対する感受性

ウェスタンブロット分析の結果、GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質とも 70°C、15 分間の加熱処理で 90%以上の免疫反応性を失うことが示された（参考文献 43、44）。

## (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

### ①GAT4601 タンパク質

GAT4601 タンパク質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼの一種であり、タンパク質の *N*-末端アミノ酸や生体アミン化合物である遊離アミノ酸及びヒストンのアミノ酸側鎖並びに抗生物質等をアセチル化する（参考文献 45）。GAT4601 タンパク質の代謝経路への影響について検討するため (i) 結晶構造解析、(ii) 基質反応性、(iii) アミノ酸含有量について考察した。

#### (i) 結晶構造解析

GAT4601 タンパク質の 3 次元構造解析の結果から、GAT4601 タンパク質における除草剤グリホサートの *N*-アセチル化反応の活性中心は当該タンパク質の内部奥にあり、除草剤グリホサートは内部に取り込まれ、そこに補酵素のアセチル CoA が結合して反応することが明らかとなっている。このことは除草剤グリホサートのような低分子化合物のみが本タンパク質の基質となり、高分子化合物が本タンパク質の基質となる可能性が低いことを示唆している。

また、GAT4601 タンパク質とホモロジーの高い GAT4602 タンパク質を用いた研究では、生体内アミン類のうち、ヌクレオシド、ヌクレオチド、ヒストン、tRNA といった高分子化合物及び低分子の生体内アミンである D-グルコサミン、セロトニン、アントラニル酸、オルニチン、プリン、ピリミジン塩基に対し、*N*-アセチル化触媒活性を示さないことが報告されている（参考文献 46）。

#### (ii) 基質反応性

GAT4601 タンパク質が、基質となる可能性のある低分子化合物と触媒活性を示すか検討した。

まず、反応の感受性を高めた人工条件下において、基質となる可能性のある低分子化合物として、20 種類の農薬、11 種類の抗生物質、21 種類のアミノ酸及び 4 種類のグリホサート類似化合物を供試し、GAT4601 タンパク質が触媒活性を示すか初期スクリーニングを行った。

その結果、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸及びグルタミン酸の 5 つのアミノ酸及び 3 種類のグリホサート類似化合物に対して触媒活性が認められた。触媒活性の程度は、5 つのアミノ酸のうち最も高い触媒活性を示したアスパラギン酸でも、グリホサートを基質とした時と比較して 3%程度であり、またグリホサート類似化合物に対する触媒活性もグリホサートを基質とした時と比較して 1%以下であった。

次に、初期スクリーニングにおいて活性の認められた 5 種類のアミノ酸及び除草

剤グリホサートと構造が極めて類似する 6 種類の除草剤グリホサート類似化合物を供試し、これらを基質とした場合の GAT4601 タンパク質の  $k_{cat}/K_M$  値を測定した。本試験は、生体内に近い条件となるように、反応溶液に 100mMKCl を加えて行われた。

その結果、5 つのアミノ酸のうち、アスパラギン酸とグルタミン酸では触媒活性が認められたが、触媒活性の程度は、除草剤グリホサートに対する触媒活性の 3% 程度であった。トレオニン、セリン、グリシンでは触媒活性は認められなかった（参考文献 47）。また、除草剤グリホサート類似化合物では、D-2-Amino-3-phosphono propionate のみ触媒活性が認められたが、その程度は除草剤グリホサートに対する触媒活性の約 5% であった。また、その光学異性体である L-2-Amino-3-phosphonopropionate では触媒活性は認められなかった。

なお、アセチルトランスフェラーゼには 4 つのファミリーがあり、NH 基を修飾することや構造上の特徴から、GAT4601 タンパク質は、高い基質特異性を有する PAT タンパク質（参考文献 48）と同じく GCN5 ファミリーに属する（参考文献 49）。このことから、GAT4601 タンパク質が、PAT タンパク質と同様に、高い基質特異性を持つことが示唆される。

### (iii) アミノ酸含有量

GAT4601 タンパク質は、除草剤グリホサートに対して高い基質特異性を有していると考えられるが、上述の (ii) に記載したとおり、生体内に近い条件下において、アスパラギン酸とグルタミン酸に対して触媒活性が認められたことから、DP-356043-5 のアミノ酸含有量を非組換えダイズと比較した。

その結果、アルギニンとアラニンは、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、非組換えダイズの分析結果に基づく許容値 (商業非組換え品種の分析値の 99% を含むよう統計学的に設定された値。以下「許容値」という。) あるいは文献値の範囲内であった。その他のアミノ酸では DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) は認められなかった。

(i) ~ (iii) により、GAT4601 タンパク質の産生は、宿主の持つ代謝系に大きな影響は及ぼさないと考えられた。

## ②GM-HRA タンパク質

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れている（参考文献 45）。したがって、仮に GM-HRA タンパク質により 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有量が高まるとは考え難い。実際にアミノ酸分析の結果、前述のとおりアルギニンとアラニン以外のアミノ酸では、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) は認められず、また、アルギニンとアラニンの分析値も、許容値あるいは文献値の範囲内であった。

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

なお、GAT4601 タンパク質は、除草剤グリホサートのアセチル化に関与する酵素であり、一方、GM-HRA タンパク質は分枝アミノ酸合成に関与する酵素であることから、両酵素の産生が相互に影響する可能性は低いと考えられた。

#### (5) 宿主との差異に関する事項

DP-356043-5 と非組換えダイズ (Jack) について成分分析を行った (参考文献 50)。

##### ①主要構成成分 (タンパク質、脂質、粗繊維分、灰分及び炭水化物)

DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で、脂質及び中性デタージェントファイバーに、有意差が認められたが、いずれも許容値及び文献値の範囲内であった。

##### ②脂肪酸組成

ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0)、ヘプタデカン酸 (C17:0)、ヘプタデセン酸 (C17:1)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3) 及びエイコサジエン酸 (C20:2) において、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、ミリスチン酸、パルミチン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸及びエイコサジエン酸の分析値は、文献値の範囲内であった。ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸については、許容値の上限値及び文献の最大値を超えていた。

ヘプタデカン酸及びヘプタデセン酸の分析値が、許容値の上限値及び文献の最大値を超えてはいたものの、飼料利用されるダイズ油かすの脂質含有率は 2%未満であり (参考文献 51)、実際に DP-356043-5 の種子から調整した乾燥脱脂ミール中のヘプタデカン酸とヘプタデセン酸含有量を測定したところ、それぞれ 0.056g/100g と 0.032 g/100g と極めて微量であった。また、ヘプタデカン酸とヘプタデセン酸は、豆腐や牛肉といった一般の食品にも乾燥脱脂ミールと同程度かそれ以上の割合で含まれている (参考文献 52)。

以上のように、DP-356043-5 の乾燥脱脂ミール中のヘプタデカン酸とヘプタデセン酸含有量は極めて微量であったこと、ヘプタデカン酸とヘプタデセン酸は、非組換えダイズ中にも認められ、本組換えダイズで新たに産生されたものではないことが示された。

また、ブロイラーの 42 日飼養試験 (参考文献 54) の結果から DP-356043-5 の栄養価は、対照の非組換えダイズと同等であることが示された。

### ③アミノ酸組成の分析

アミノ酸組成の分析においては、6 (4) ① (iii) に記載したとおり、アルギニンとアラニンについて、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値 <0.05) が認められたが、許容値あるいは文献値の範囲内であった。

また、6 (4) ① (ii) に記載したとおり、GAT4601 タンパク質はアスパラギン酸とグルタミン酸に対して触媒活性が認められ、アスパラギン酸及びグルタミン酸が *N*-アセチル化される可能性が考えられたため、DP-356043-5 の種子中の *N*-アセチルアスパラギン酸 (以下「NAA」という。) 及び *N*-アセチルグルタミン酸 (以下「NAG」という。) の分析が行われた。その結果、これらが従来のダイズに比べて有意に増加していることが認められ、遊離アスパラギン酸及び遊離グルタミン酸が DP-356043-5 中で *N*-アセチル化されていると考えられた。

そのため、NAA 及び NAG の増加が家畜の健康を害する恐れがないか、(i)ダイズ種子中の遊離アミノ酸含有量及び割合、(ii)一日最大予想 NAA 摂取量 (配合飼料に含まれる全てのダイズ油かすを DP-356043-5 由来に置き換えた場合に家畜が摂取する NAA 量)、(iii)一日最大予想 NAG 摂取量 (配合飼料に含まれる全てのダイズ油かすを DP-356043-5 由来に置き換えた場合に家畜が摂取する NAG 量) について、以下のとおり考察した。

#### (i) ダイズ種子中の遊離アミノ酸含有量及び割合

DP-356043-5 及び非組換えダイズ種子中の遊離アミノ酸含有量の合計に、統計学的有意差は認められなかった。また、全アミノ酸含量 (平均) に占める遊離アミノ酸の割合は、0.5%程度で、一般に報告されている遊離アミノ酸の割合 (1%未満、参考文献 53) と一致した。

遊離アミノ酸のうち、プロリン、バリン及びヒスチジンにおいて統計学的有意差 (P 値 <0.05) が認められたが、いずれも許容値の範囲内であり、その他の遊離アミノ酸においては、DP-356043-5 と非組換えダイズの間で統計学的有意差 (P 値 <0.05) は認められなかった。

#### (ii) 一日最大予想 NAA 摂取量

一日最大予想NAA摂取量を、ブロイラーの42日飼養試験 (参考文献54) においてブロイラーが1日に摂取したNAA量 (以下「ブロイラーの42日飼養試験におけるNAA摂取量」という。)) 及びラットの90日経口毒性試験 (参考文献55) においてラットが1日に摂取したNAA量 (以下「ラットの90日経口毒性試験におけるNAA摂取量」という。)) と比較した。

なお、ブロイラーの42日飼養試験では、DP-356043-5配合飼料は非組換えダイズ配合飼料と栄養価において同等であることが示されており、ラットの90日経口毒性試験では、DP-356043-5配合飼料は、非組換えダイズ配合飼料と安全性及び栄養価において同等であることが示されている。

その結果、鶏における一日最大予想NAA摂取量の「ブロイラーの42日飼養試験におけるNAA摂取量」に対する割合は、採卵鶏：約1/6及びブロイラー：約1/4～1であった。牛及び豚における一日最大予想NAA摂取量の「ラットの90日経口毒性試験におけるNAA摂取量」に対する割合は、乳牛：約1/8、肉牛：約1/21～1/17、豚（非妊娠期）：約1/11～1/2及び妊娠豚：約1/7～1/3であった。

また、乳牛、肉牛、豚（非妊娠期）及び妊娠豚の一日最大予想 NAA 摂取量は、ラット反復経口投与毒性試験（参考文献 56）における無毒性量（1,000 mg/kg/日）を十分に下回っていた。なお、採卵鶏及びブロイラーについても、同様に、無毒性量（1,000 mg/kg/日）を十分に下回っていた。

### (iii) 一日最大予想 NAG 摂取量

(ii) と同様に、一日最大予想 NAG 摂取量を、ブロイラーの 42 日飼養試験（参考文献 54）においてブロイラーが 1 日に摂取した NAG 量（以下「ブロイラーの 42 日飼養試験における NAG 摂取量」という。）及びラットの 90 日経口毒性試験（参考文献 55）においてラットが 1 日に摂取した NAG の量（以下「ラットの 90 日経口毒性試験における NAG 摂取量」という）と比較した。

その結果、鶏における一日最大予想 NAG 摂取量の「ブロイラーの 42 日飼養試験における NAG 摂取量」に対する割合は、採卵鶏：約 1/15 及びブロイラー：約 1/11～1/2 であった。牛及び豚における一日最大予想 NAG 摂取量の「ラットの 90 日経口毒性試験における NAG 摂取量」に対する割合は、乳牛：約 1/23、肉牛：約 1/58～1/46、豚（非妊娠期）：約 1/32～1/7 及び妊娠豚：約 1/19～1/9 であった。

(i) ～ (iii) より NAA 及び NAG の増加が家畜の健康を害する可能性は低いと考えられた。

なお、参考としてヒトの NAA が蓄積する疾病として、アスパルトアシラーゼの遺伝的欠損又は活性低下によるカナバン病があるが、その病因としては NAA の蓄積又はその酵素反応生成物である酢酸レベルの低下が原因という異なる説が報告されている（参考文献 59）。念のため家畜のカナバン病について文献検索を行ったが、カナバン病の症例報告及び家畜とカナバン病の関連に言及した情報はなかった。

## ④ミネラル類

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の分析を行った。カルシウムとマグネシウムについて、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差（P 値<0.05）が認められたが、許容値あるいは文献値の範囲内であった。

## ⑤ビタミン類

ビタミン B1、ビタミン B2、葉酸、 $\alpha$ -トコフェロール、 $\beta$ -トコフェロール、 $\sigma$ -トコフェロール、 $\gamma$ -トコフェロール及び総トコフェロールの分析を行った。その結果、ビタミ

ン B1、葉酸及び  $\alpha$ -トコフェロールは、DP-356043-5 と非組換えダイズの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、許容値あるいは文献値の範囲内であった。

#### ⑥栄養阻害成分

栄養阻害物質及び 2 次代謝産物として、イソフラボン類、ラフィノースやスタキオースなどのオリゴ糖類、レクチン、フィチン酸及びトリプシンインヒビターの分析を行った。その結果、ダイジン、マロニルダイジン、グリシチン、マロニルグリシチン及びトリプシンインヒビターは、DP-356043-5 と非組換えダイズとの間で統計学的有意差 (P 値<0.05) が認められたが、許容値の範囲内であった。

#### (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国、カナダ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て非組換えダイズと同等であることが確認されている。

#### (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

DP-356043-5 の生存及び増殖能力は従来ダイズと同等であり、その生存及び増殖能力は従来ダイズと同様の制限を受けると考えられる。

#### (8) 不活化法に関する事項

上記 DP-356043-5 は従来ダイズと同様に、耕起による土壌中への鋤き込みや、除草剤グリホサート及び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って、不活化することができる。

#### (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 2007 年 9 月に食品・飼料としての安全性が確認された。カナダ食品検査庁 (CFIA) へ 2006 年 12 月に飼料としての安全性審査の申請が行われた。

#### (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

雑草防除に、除草剤グリホサート及び除草剤アセト乳酸合成酵素阻害剤が利用可能な点を除き、DP-356043-5 の栽培方法は従来ダイズと変わらない。

#### (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

DP-356043-5 の種子の製法及び管理方法は、従来ダイズと変わらない。

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

除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ (DP-356043-5) 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

1. Castle, L. A., Siehl, D. L., Gorton, R., Patten, P. A., Chen, Y. H., Bertain, S., Cho, H-J., Duck, N. B., Wong, J. Liu, D. and Lassner, M. W. 2004. Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* 304: 1151-1154.
2. GAT4601 タンパク質及び GM-HRA タンパク質前駆体のアミノ酸配列並びに直鎖状 DNA 断片 PHP20163A の塩基配列 (社内報告書)
3. ILSI. 2004. ILSI Crop Composition Database Version 3.0.
4. 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*.
5. Taylor, N., Fuchs, R., MacDonald, J., Shariff, A. and Padgett, S. 1999. Compositional Analysis of Glyphosate-Tolerant Soybeans Treated with Glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47: 4469-4473.
6. Kim, S., Jung, W., Ahn, J., Kim, J. and Chung, I., 2005. Quantitative analysis of the isoflavone content and biological growth of soybean (*Glycine max* L.) at elevated temperature, CO<sub>2</sub> level and N application. *Journal of Science of Food and Agriculture*. 85: 2557-2566.
7. 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.
8. 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)).
9. Garber. R.J. and T.E. Odland. 1926. Natural crossing in soybeans. *J. Am. Soc. Agron.*18: 967-970.
10. Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Sci.* 6: 211-212.
11. Ahrent, D.K. and C.E. Caviness. 1994. Natural cross-pollination of twelve soybean cultivars in Arkansas. *Crop Sci.* 34: 376-378.
12. Poehlman, J. M and D.A. Sleper. 1995. *In Breeding Field Crops*, 4<sup>th</sup> edition, p. 305. Iowa State University Press, Ames, Iowa 50014.
13. 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.
14. 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. *Plant Physiol.* 164, 756-763.
15. Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase.

- Meth Enzymol.* 155, 397-415.
16. 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.
  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. Falco, C. S. and Li, Z. 2003. S-adenosyl-L-methionine Synthetase Promoter and Its Use in Expression of Transgenic Genes in Plants. US Patent Application: 2003/0226166.
  19. Keil, M., Sanches-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. 1986. Primary structure of proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.* 14: 5641-5650.
  20. An, G., Mitra, A., Choi, H. K., Costa, M. A., An, K., Thornburg, R. W., and Ryan, C. A. 1989. Functional Analysis of the 3' Control Region of the Potato Wound-Inducible Proteinase Inhibitor II Gene. *Plant Cell* 1: 115-122.
  21. O'Dell, J. T., Nagy, F. and Chua, N.-H. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
  22. Bowen, B. A., Bruce, W. B., Lu, G., Sims, L. E. and Tagliani, L. A. 2000. Synthetic Promoters. US Patent: 6072050.
  23. Bowen, B. A., Bruce, W. B., Lu, G., Sims, L. E. and Tagliani, L. A. 2003. Synthetic Promoters. US Patent: 6555673 B1.
  24. Gallie, D. R. and Walbot, V. 1992. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Res.* 20: 4631-4638.
  25. Molecular Characterization of DP-356043-5 Soybean. (社内報告書)
  26. Insert and 300 Base Pair Flanking Border Sequence Characterization of Soybean Event DP-356043-5. (社内報告書)
  27. Quantitative ELISA Analysis of Soybean Line DP-356043-5: U.S. and Canada Locations. (社内報告書)
  28. Dyda, F., Klein, D. C. and Hickman, A. B. 2000. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29: 81-103.
  29. NCBI. 2006. National Center for Biotechnology Information. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
  30. Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the GAT4601 Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets. (社内報告書)
  31. Friden, P., Donegan, J., Mullen, J., Tsui, P., Eoyang, L., Weber, R. and Silverman, P. M. 1985. The *ilvB* locus of *Escherichia coli* K-12 is an operon encoding both subunits of acetohydroxyacid synthase I. *Nucleic Acids Res.* 13: 3979-93.
  32. Falco, C.S., Dumas, K.S. and Kenneth, J.L. 1985. Nucleotide sequence of the yeast *ILV2* gene which encodes acetolactate synthase. *Nucleic Acids Research.* 13: 4011-4027.
  33. Mazur, B. J., Chui, C. F., and Smith, J. K. 1987. Isolation and Characterization of Plant Genes Coding for Acetolactate Synthase, the Target Enzyme for Two Classes of Herbicides. *Plant Physiol.* 85: 1110-1117.
  34. Reith, M. and Munholland, J. 1993. Two amino-acid biosynthetic genes are encoded on

- the plastid genome of the red alga *Porphyra umbilicalis*. *Curr Genet.* 23: 59-65.
35. Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the GM-HRA Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets. (社内報告書)
  36. Equivalency Assessment of the GAT4601 Protein Derived from a Microbial Expression System with the GAT4601 Protein Derived from Soybeans Containing Event DP-356043-5. (社内報告書)
  37. Equivalency Assessment of the GM-HRA Protein Derived from a Microbial Expression System with the GM-HRA Protein Derived from Soybeans Containing Event DP-356043-5. (社内報告書)
  38. US Pharmacopoeia, The National Formulary. 2000. USP XXIV, NF XIX, US Pharmacopoeia Convention, Inc., Mack Printing Co., Easton, PA, p. 2235.
  39. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of Glyphosate N-acetyltransferase 4601 Protein (GAT4601) using Western Blot Analysis. (社内報告書)
  40. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of GM-HRA using Western Blot Analysis. (社内報告書)
  41. Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of Glyphosate N-acetyltransferase 4601 Protein (GAT4601). (社内報告書)
  42. Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of GM-HRA. (社内報告書)
  43. Characterization of the Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the Glyphosate N-acetyltransferase 4601 (GAT4601) Protein using Western Blot Analysis. (社内報告書)
  44. Characterization of the Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the GM-HRA Protein using Western Blot Analysis. (社内報告書)
  45. 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.
  46. Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H., Bertain, S., Cho, H-J., Keenan, R., Liu, D., and Lassner, M.W. 2005. Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Manag. Sci.* 61: 235-240.
  47. GAT4601 タンパク質を用いた基質特異性に関する評価結果 (社内報告書)
  48. OECD. 1999. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11. *OECD Environmental, Health and Safety Publications* (<http://www.oecd.org/ehs/>). ENV/JM/MON(99)13
  49. Kouzarides T. 1999. Histone acetylaes and deacetylases in cell proliferation. *Current Opinion in Genetics & Development.*, 9: 40-48.
  50. Nutrient Composition Analysis of the Soybean Line DP356043-5: U.S. and Canada Locations. (社内報告書)
  51. Baize, J. 1999. Global soybean meal analysis project. Conducted for the Quality Committee of the United Soybean Board. John C. Baize and Associates, 7124 Carol Lane, Falls Church, VA 22042-3714.
  52. USDA. 2006. USDA Regional Integrated Pest Management (IPM) Centers. (<http://www.ipmcenters.org/>).

53. Takahashi, M., Uematsu, Y., Kashiwaba, K., Yagasaki, K., Hajika, M., Matsunaga, R., Komatsu, K. and Ishimoto, M., 2003. Accumulation of high levels of free amino acids in soybean seeds through integration of mutations conferring seed protein deficiency. *Planta* 217: 577-586.
54. McNaughton, J., Roberts, M., Smith, B., Rice, D., Hinds, M., Schmidt, J., Locke, M., Brink, K., Bryant, A., Rood, T., Layton, R., Lamb, I., and Delaney, B. (2007) Comparison of Broiler Performance When Fed Diets Containing Event DP-356043-5 (Optimum GAT), Nontransgenic Near-Isoline Control, or Commercial Reference Soybean Meal, Hulls, and Oil. *Poultry Science* 86: 2569-2581.
55. Appenzeller, L.M., Munley, S.M., Hoban, D., Sykes, G.P., Malley, L.A., and Delaney, B. (2008) Subchronic Feeding Study of Herbicide-Tolerant Soybean DP-356043-5 in Sprague-Dawley Rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2201-2213.
56. Delaney, B., Shen, A., Z., Powley, C.R., Gannon, S., Munley S.A., Maxwell C., and Barnett, J.F. Jr. (2008) Acute and repeated dose oral toxicity of *N*-acetyl-L-aspartic acid in Sprague Dawley rats. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2023-2034.
57. DP-356043-5 Open Reading Frame Analysis – 20 amino acid threshold.
  58. BIASTn/BLASTx analysis of the Flanking Border Sequences Comprising Soybean Event DP-356043-5. (社内報告書)
59. 食品安全委員会遺伝子組換え食品等評価書、除草剤グリホサート及びアセト乳酸合成酵素阻害剤耐性ダイズ DP-356043-5  
(<http://www.fsc.go.jp/iinkai/i-dai275/dai275kai-siryou4-3.pdf>)