

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減
ジャガイモ (SPS-00E12-8)

2017年3月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>.....	3
要 約.....	5
I. 評価対象食品の概要.....	6
II. 食品健康影響評価.....	6
第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項.....	6
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	6
2. 宿主の食経験に関する事項.....	7
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	7
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項.....	7
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項.....	8
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	8
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	8
第3. 宿主に関する事項.....	8
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	8
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	9
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	9
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	9
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	9
6. 安全な摂取に関する事項.....	9
7. 近縁の植物種に関する事項.....	9
第4. ベクターに関する事項.....	9
1. 名称及び由来に関する事項.....	9
2. 性質に関する事項.....	10
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	10
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	10
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	10
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	11
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	12
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	12
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	14
第6. 組換え体に関する事項.....	15
1. 遺伝子導入に関する事項.....	15

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	16
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	17
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	17
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	17
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	18
7. 宿主との差異に関する事項.....	18
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	20
9. 栽培方法に関する事項.....	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	20
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	20
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	20
<参照>.....	21

＜審議の経緯＞

- 2014年2月20日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安0219第2号）、関係書類の接受
- 2014年2月24日 第504回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2014年3月14日 第125回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年1月22日 第134回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年9月28日 第140回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年2月26日 第146回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年2月17日 第157回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年3月14日 第642回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

2015年6月30日まで	2017年1月6日まで	2017年1月7日から
熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）	山添 康（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進	吉田 緑
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑	山本 茂貴
石井 克枝	石井 克枝	石井 克枝
上安平 浏子	堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常	村田 容常

＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

2014年3月31日まで	2015年9月30日まで
澤田 純一（座長）	澤田 純一（座長）
鎌田 博（座長代理）	小関 良宏（座長代理）
小関 良宏 手島 玲子	宇理須 厚雄 手島 玲子
宇理須 厚雄 中島 春紫	岡田 由美子 中島 春紫
橘田 和美 飯 哲夫	橘田 和美 飯 哲夫
児玉 浩明 和久井 信	児玉 浩明 和久井 信
近藤 一成	近藤 一成

2015年10月1日から

澤田 純一（座長）

小関 良宏（座長代理）

岡田 由美子 中島 春紫

橘田 和美 樋口 恭子

児玉 浩明 飯 哲夫

近藤 一成 山川 隆

柘植 郁哉 和久井 信

手島 玲子

要 約

「アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減ジャガイモ (SPS-00E12-8)」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、ジャガイモ由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片及びホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによってこれらの内在性遺伝子の発現が抑制され、高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成量が低減するとされている。また、ジャガイモ近縁野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって内在性遺伝子の発現が抑制され、打撲による黒斑形成が低減するとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入 DNA の供与体の安全性、挿入 DNA の塩基配列等の解析、後代における挿入 DNA の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較等について確認した結果、非組換えジャガイモと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。なお、挿入 DNA からタンパク質が産生されることはないと考えられる。

したがって、「アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減ジャガイモ (SPS-00E12-8)」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減ジャガイモ（SPS-00E12-8）

性質：アクリルアミド産生量の低減、打撲による黒斑形成の低減

申請者：J. R. シンプロット社（米国）

開発者：J. R. シンプロット社（米国）

「アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減ジャガイモ（SPS-00E12-8）」（以下「ジャガイモ SPS-00E12-8」という。）は、ジャガイモ由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片及びホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによってこれらの内在性遺伝子の発現が抑制され、高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成量が低減するとされている。また、ジャガイモ近縁野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって内在性遺伝子の発現が抑制され、打撲による黒斑形成が低減するとされている。

II. 食品健康影響評価

第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、ナス科ナス属に属するジャガイモ (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) 品種の Russet Burbank である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

アスパラギン合成酵素-1 遺伝子、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域及びホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域の各 DNA 断片、ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子及び顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子の各プロモーター領域の供与体は、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) である。ポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域の供与体は、ジャガイモ近縁野生種 (*Solanum verrucosum*) である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

4 種類の遺伝子断片（アスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片、ポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片及びホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片）及び 2 種類のプロモーター（ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子のプロモーター領域及び顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子のプロモーター領域）を宿主ジャガイモに挿入し、ジャガイモ SPS-00E12-8 が作出された。

アスパラギン合成酵素-1 遺伝子は、アスパラギン合成経路においてグルタミ

ンからアスパラギンへの合成を触媒する酵素をコードする。ポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子は、フェノール類の酸化反応を触媒する酵素をコードし、ジャガイモの細胞が障害を受けた際、本酵素によるフェノール類の酸化及び縮合反応により最終的に黒斑が形成される。デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子は、デンプンのリン酸化を触媒する酵素である R1 タンパク質(別名: α -グルカン、水ジキナーゼ) をコードし、本酵素はデンプンの分解を促進する。ホスホリラーゼ-L 遺伝子は、デンプンの加リン酸分解を触媒する酵素をコードする。

各 DNA 断片を逆方向に反復した配置にて挿入することにより、ジーンサイレンシングが誘導され、ジャガイモ内在性の各遺伝子の発現が抑制される。

挿入 DNA は、アグロバクテリウム法によって宿主ゲノムに導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

ジャガイモの起源は南米アンデスを中心とした地帯である。16 世紀以降、ヨーロッパを始めとする世界各地に伝わり、主食として重要な農作物となった。我が国には 16 世紀末に持ち込まれ、救荒作物として栽培されるようになった。ジャガイモは、調理用、食品加工用及びデンプン原料用として広く利用されている。Russet Burbank は米国で広く栽培されている品種で、デンプン質が豊富である。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等(タンパク質、脂質等)の種類及びその量の概要

ジャガイモの可食部分は地下塊茎である。ジャガイモ塊茎の主要栄養素組成(対新鮮重量)は、タンパク質 0.70~4.60%、脂質 0.02~0.20%、灰分 0.44~1.90%、炭水化物 13.30~30.53%、粗繊維 0.17~3.50%である(参照 1、2、3、4)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

ジャガイモには、毒性物質として、ソラニン及びチャコニン等のグリコアルカロイドが、葉、芽の周辺部、花及び茎等のあらゆる組織に分布している。ジャガイモ塊茎のグリコアルカロイドの含有量は、1.0~15.0 mg/100g(対新鮮重量)である。また、有害生理活性物質として、プロテアーゼインヒビター及びレクチンが含まれるが、加熱により不活化される(参照 5、6)。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法

ジャガイモ SPS-00E12-8 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のジャガイモと変わらない。

(2) 摂取(可食)部位

ジャガイモ SPS-00E12-8 の摂取部位は、従来のジャガイモと変わらない。

(3) 摂取量

ジャガイモ SPS-00E12-8 の摂取量は、従来のジャガイモと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ジャガイモ SPS-00E12-8 の調理及び加工方法は、従来のジャガイモと変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 は、アスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片及びホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片の導入によってジーンサイレンシングが誘導されることによって各内在性遺伝子の発現が抑制され、アスパラギン及び還元糖の含有量が減少し、高温加熱加工工程で生じるアクリルアミドの生成量が低減するとされている。また、ポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片の導入によってジーンサイレンシングが誘導され、打撲による黒斑形成が低減するとされている。

宿主との相違点は、導入された DNA 断片がジーンサイレンシングを誘導することで、各内在性遺伝子の発現が抑制されることである。

以上、1～6により、ジャガイモ SPS-00E12-8 の安全性評価においては、既存のジャガイモとの比較が可能であると判断した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

アクリルアミドは、アスパラギンが還元糖と高温で反応することにより生成される。ジャガイモ SPS-00E12-8 は、遊離アスパラギン及び還元糖の蓄積を抑制することにより、高温で加工した際のアクリルアミドの生成を低減することができる。また、ジャガイモが物理的衝撃を受けると、内部に黒色色素が形成され品質に影響を及ぼす。ジャガイモ SPS-00E12-8 は、フェノール類の酸化重合による黒褐色色素合成を抑制することで、打撲黒斑の感受性が低減し、輸送中等の品質の低下を防ぐとしている。

なお、ジャガイモ SPS-00E12-8 は、米国でフライドポテト用に加工されるとしている。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、ナス科ナス属に属するジャガイモ (*S. tuberosum*) 品種の Russet Burbank である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

ジャガイモの原産地は南米アンデス地方で、約 7,000 年前から栽培されていたとの報告がある。ジャガイモ栽培種は、通常は染色体数 12 を基本数とする四倍体である。ジャガイモ SPS-00E12-8 の宿主である Russet Burbank は北米で開発され、米国で最も栽培されている品種であり、アイダホ州が主産地である。Russet Burbank は栄養生殖により増殖され、雄性不稔性であり正常に花粉ができないことから従来手法による交配に利用されることはないとしている（参照 7）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ジャガイモ塊茎には、毒性物質であるソラニンやチャコニン等のグリコアルカロイド類が含まれている（参照 6）。

また、プロテアーゼインヒビター及びレクチンを含むが、加熱により不活化されるため、ヒトの健康に悪影響を与える可能性は低いとしている（参照 6）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ジャガイモに含まれるアレルゲンとしては、パタチンが知られている（参照 8）。パタチンは、ジャガイモ地下塊茎に含まれる貯蔵糖タンパク質で、リパーゼ活性を有する。しかしながら、一般にジャガイモに対するアレルギー反応は極稀であるとされている。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

ジャガイモには、ウイルス、細菌及び菌類による各種病害が知られている（参照 9）が、これらが人に対して病原性を示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ジャガイモは、調理用、加工用及びデンプン加工用として広く食品に用いられ、安全に摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ジャガイモは、ナス科（Solanaceae）ナス属（*Solanum*）に分類され、ナス属には 1,000 種以上の植物が含まれる。塊茎形成ジャガイモは *potatoe* 亜節に含まれ、その中の *tuberosa* 系には栽培種と野生種を含めて 39 種がある。

第 4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 の作出に使用した導入用プラスミド pSIM1278 の構築には、プラスミド pSIM108 が用いられた。

2. 性質に関する事項

- (1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項
プラスミド pSIM108 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照 10)。
- (2) 制限酵素による切断地図に関する事項
プラスミド pSIM108 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。
- (3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項
プラスミド pSIM108 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。
- (4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項
プラスミド pSIM108 にはカナマイシン耐性遺伝子である *nptIII* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が含まれている。
- (5) 伝達性に関する事項
プラスミド pSIM108 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

- (1) 名称、由来及び分類に関する事項
アスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片 (*fAsn1*)、デンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域の断片 (*pR1*)、ホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域の断片 (*pPhL*)、ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域 (*pAgp*)、顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子プロモーター領域 (*pGbss*)、Spacer-1 及び Spacer-2 の供与体は、ジャガイモ (*S. tuberosum*) である。また、ポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片 (*tPpo5*) の供与体は、ジャガイモ近縁野生種 (*S. verrucosum*) である。
- (2) 安全性に関する事項
ジャガイモ (*S. tuberosum*) は、古くから食用に供されている。ジャガイモ近縁野生種 (*S. verrucosum*) は、メキシコに自生し、育種に利用されている。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子 (抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。) 及びその遺伝子産物の性質に関する事項

- (1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項
挿入 DNA は、第 1 カセット及び第 2 カセットの 2 つのカセットから構成されている。
第 1 カセットは、Spacer-1 を挟み *fAsn 1* 及び *tPpo5* をそれぞれ逆位に反復して配置し、第 2 カセットは、Spacer-2 を挟み *pR1* 及び *pPhL* をそれぞれ逆

位に反復して配置させて、第1カセット及び第2カセットを結合させて構築した。各カセットとも、ターミネーターがなく、2種類のプロモーター（*pAgp* 及び *pGbss*）を両端に配置している。

挿入 DNA の構成要素は、表1のとおりである。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA 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なっている（参照10）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

fAsn 1 の導入によって誘導されるジーンサイレンシングにより、アミノ酸合成経路におけるグルタミンからアスパラギンの合成を触媒するアスパラギン合成酵素-1 (*Asn 1*) 遺伝子の発現が抑制され、遊離アスパラギンの蓄積量が減少する。また、*pR1* 及び *pPhL* の導入によって誘導されるジーンサイレンシングにより、デンプン関連 *R1* タンパク質 (*R1*) 遺伝子及びホスホリラーゼ-L (*PhL*) 遺伝子の発現が抑制されることで、デンプンの分解が抑制され、還元糖の生成が低減される。アクリルアミドはアスパラギン及び還元糖から生成されることから、これらの成分の生成が抑制された結果、ジャガイモの高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成を抑制することができるとしている。

また、*tPpo5* の導入によって誘導されるジーンサイレンシングにより、フェノール類の酸化反応を触媒するポリフェノール酸化-5 酵素 (*Ppo5*) 遺伝子の発現が抑制される。その結果、細胞が傷害を受けた際のフェノール類の酸化・縮合による褐色色素合成が抑制され、打撲黒斑の感受性が低減するとしている（参照11：Yan 2006）。

第1カセットは *fAsn 1* 及び *tPpo5* を含み、転写後生成される siRNA によるジーンサイレンシングが誘導されるとしている（参照：11、12、13）。第2カセットでは、*pR1* 及び *pPhL* が転写された後、プロモーター領域がメチル化されることによるジーンサイレンシングの可能性が考えられている（参照11）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド *pSIM1278* の外骨格領域には、カナマイシン耐性遺伝子 (*nptIII*) が含まれているが、ジャガイモ SPS-00E12-8 には検出されないことがサザンブロット分析によって確認されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

第1カセット及び第2カセットのプロモーターは、ジャガイモ由来の ADP グルコースピロホスホリラーゼ (*Agp*) 遺伝子及び顆粒結合型デンプン合成酵素 (*Gbss*) 遺伝子のプロモーターである。2つのカセットとも、これらの2種類のプロモーターで制御されている。

(2) ターミネーターに関する事項

ターミネーターは用いられていない。

(3) その他

上記のプロモーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる領域は含まれていない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用ベクター pSIM1278 は、プラスミド pSIM108 を基本骨格として、第 1 カセット及び第 2 カセットを構成する DNA 領域を挿入することにより、構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 の作出に用いた導入用プラスミド pSIM1278 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なっている (参照 10)。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

導入用プラスミド pSIM1278 の挿入 DNA 領域に加え近傍配列を含む約 11 kb の領域について、六つの読み枠において 20 アミノ酸残基以上で形成される ORF 検索を行い、検出された 232 個の ORF について、既知アレルゲン及び毒性タンパク質との構造相同性の有無を検討した (参照 14)。

既知アレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^aを用いて検索を行った。その結果、*Gbss* プロモーター領域の 2 個の ORF がアボカドの class1 endochitinase の連続する 8 アミノ酸残基と一致した (参照 14)。しかし、アレルギーに関与しているドメインには含まれず、エピトープデータベースに該当する配列は認められなかった。また、この 8 アミノ酸残基は class1 endochitinase のシグナルペプチド領域に含まれるため (参照 15)、タンパク質成熟過程で分解すると考えられることから、アレルゲンの可能性は低いと考えられた。なお、既知アレルゲンとのアミノ酸 80 残基以上、35%以上の相同性を有する配列は見いだされなかった。

さらに、毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベース^bを用いて検索した結果、相同性を示す毒性タンパク質は見いだされなかった。

^a ネブラスカ大学のアレルゲンデータベース

(FARRP:<http://www.allergenonline.org/databasefasta.shtml>) version 13。

^b mvirDB (<http://mvirdb.iini.gov/>) 及び自社の毒性タンパク質データベース。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、導入用プラスミド pSIM1278 の右側領域 (RB) から左側領域 (LB) までの挿入 DNA 領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド pSIM1278 は、外骨格領域に選択マーカー遺伝子である *nptIII* 遺伝子を有しており、プラスミドの選抜を通じて純化されている。また、挿入 DNA 領域の塩基配列がシーケンス解析により確認されている。

表1 ジャガイモ SPS-00E12-8 への導入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
LB	<i>Rhizobium radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の左側境界配列と類似の合成 DNA
第 1 カセット	
p <i>Agp</i>	ジャガイモ由来の ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域
f <i>Asn1</i>	ジャガイモ由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
t <i>Ppo5</i>	ジャガイモ近縁野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Spacer-1	ジャガイモゲノムの非構造領域由来のヘアピンカーブ構造形成のための配列
t <i>Ppo5</i>	ジャガイモ近縁野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
f <i>Asn1</i>	ジャガイモ由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
p <i>Gbss</i>	ジャガイモ由来の顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子のプロモーター領域
第 2 カセット	
p <i>Agp</i>	ジャガイモ由来の ADP グルコースホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域
p <i>PhL</i>	ジャガイモ由来のホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導

構成 DNA	由来及び機能
p <i>R1</i>	ジャガイモ由来のデンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Spacer-2	ジャガイモのポリユビキチン遺伝子のイントロン由来のヘアピンカーブ構造形成のための配列
p <i>R1</i>	ジャガイモ由来のデンプン関連 R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
p <i>PhL</i>	ジャガイモ由来のホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
p <i>Gbss</i>	ジャガイモ由来の顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子プロモーター領域
RB	<i>R. radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の右側境界配列と類似の合成 DNA

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

(1) マーカーフリー形質転換法

導入用ベクター pSIM1278 の外骨格に微生物由来のイソペンテニル転移酵素遺伝子 (*ipt* 遺伝子) を組み込むことにより、*ipt* 遺伝子が発現した場合、サイトカイニンの過剰産生により形態異常となり生育できないことから、宿主ゲノムに外骨格領域が導入された幼植物体を除外できる (参照 16)。このマーカーフリー形質転換法は、外骨格領域を含まず、単一の挿入 DNA を持つ植物体を作成するのに有用であるとの報告がある (参照 16、17)。

(2) ジャガイモ SPS-00E12-8 の作出

アグロバクテリウム法を用いて、導入用ベクター pSIM1278 を宿主の組織断片に導入し、再分化させた。*ipt* 遺伝子由来の表現型を示す幼植物体を除去した後、PCR 分析にて複数の優良個体を選抜した。それら個体について、カテコール試験、サザンブロット分析及び農業学的形質の評価等の解析を行い、ジャガイモ SPS-00E12-8 を選定した。

(3) ジャガイモ SPS-00E12-8 の維持及び評価試料

ジャガイモ SPS-00E12-8 は、組織培養で継続的に維持され、栄養繁殖で増殖される。組織より再生させた植物体を温室で育生して小塊茎を生産した後、圃場で栽培して塊茎を生産する。したがって、安全性評価に用いられたジャガイモ SPS-00E12-8 の植物体材料は、全て単一起源であるとしている。

第6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 のゲノムに挿入された挿入 DNA 領域のコピー数を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、1 コピーの挿入 DNA 領域が挿入されていることが確認された（参照 18）。

挿入 DNA の完全性を確認するために、サザンブロット分析及び挿入 DNA の境界領域の塩基配列解析を行った。その結果、LB の 17 bp 及び RB の 92 bp の欠失を除き、ほぼ完全長の挿入 DNA 領域が導入されていることが示された（参照 18）。

導入用プラスミド pSIM1278 の外骨格領域がジャガイモ SPS-00E12-8 のゲノムに挿入されていないかどうかを確認するため、サザンブロット分析を行った結果、当該領域はジャガイモ SPS-00E12-8 のゲノムに検出されないことが確認された（参照 19）。

サザンブロット分析結果を確認・補完するために、標的シーケンシング解析を行った。ジャガイモ SPS-00E12-8 及び宿主ゲノムに対してメイトペアーライブラリーを作製し、次世代シーケンシング技術を用いて、ゲノム及びプラスミド pSIM1278 配列にマッピングした。その結果、1 コピーの挿入 DNA が第 12 番染色体上の 1 カ所にマッピングされかつジャガイモ SPS-00E12-8 のゲノムに外骨格 DNA が含まれていないことが確認された（参照 20）。

ジャガイモ SPS-00E12-8 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、ジャガイモのデータベース^cで検索した結果、5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列とジャガイモの染色体 12 番染色体との相同性が認められた。また、12 番染色体の DNA 挿入部位の 736 bp が欠失していることが確認された（参照 14）。

ジャガイモ SPS-00E12-8 のゲノムに DNA を挿入することによって宿主の内在性遺伝子が損なわれていないかどうかを確認するために、5'末端近傍配列（1,059 bp）及び 3'末端近傍配列（1,173 bp）について、データベース^{c,d}を用いて blastn 及び blastx 検索を行った結果、既知のジャガイモ由来の遺伝子及びタンパク質は見いだされなかった。また、ジャガイモのデータベース^cで検索した結果、欠失した 736 bp の範囲に機能を持った遺伝子は存在しないことが確認された。したがって、DNA の挿入によって宿主の既知の内在性遺伝子が損なわれていないと考えられた（参照 14）。

ジャガイモ SPS-00E12-8 が全ての組織において単一の挿入 DNA から構成されているかどうかを Droplet Digital PCR (ddPCR) 法及びカテコール試験を用いて確認した。ddPCR の結果、塊茎の組織層（L1 層、L2 層、L3 層）全

^c Michigan State University (MSU) ゲノムデータベース

(http://potato.plantbiology.msu.edu/integrated_searches.shtml)

^d NCBI ジャガイモゲノム/タンパク質データベース及び MSU ゲノムデータベース

てにおいてインサートがゲノム当たり 1 コピーであった (参照 20)。カテコール試験は、カテコールを基質としたポリフェノール酸化酵素-5 活性を確認する試験で、塊茎切片の表面細胞層 (L2 層、L3 層) におけるカテコールの酸化による褐変を目視にて観察する手法である。ジャガイモ SPS-00E12-8 はポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子の発現が抑制されているため褐変は起こらない。カテコール試験の結果、ジャガイモ SPS-00E12-8 由来の塊茎のいずれの切片においても褐変は見られなかった (参照 21)。

以上の結果をふまえると、ジャガイモ SPS-00E12-8 は全ての組織において挿入 DNA が単一かつ同一箇所が存在しており、挿入 DNA 領域に関するキメラ体ではないことが示された。

(2) 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

ジャガイモ SPS-00E12-8 の挿入 DNA 領域及び 5' 及び 3' 末端近傍配 (500 bp) を含む約 11 kb の領域について、意図しない ORF が生じていないかどうかを確認するために、六つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 20 アミノ酸残基以上の ORFのうち、挿入 DNA と 5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列との接合部において 12 個の ORF が確認された。これらの ORF についてアレルゲンデータベース^a 及び毒性データベース^b を用いて検索を行った結果、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性は認められなかった (参照 14)。

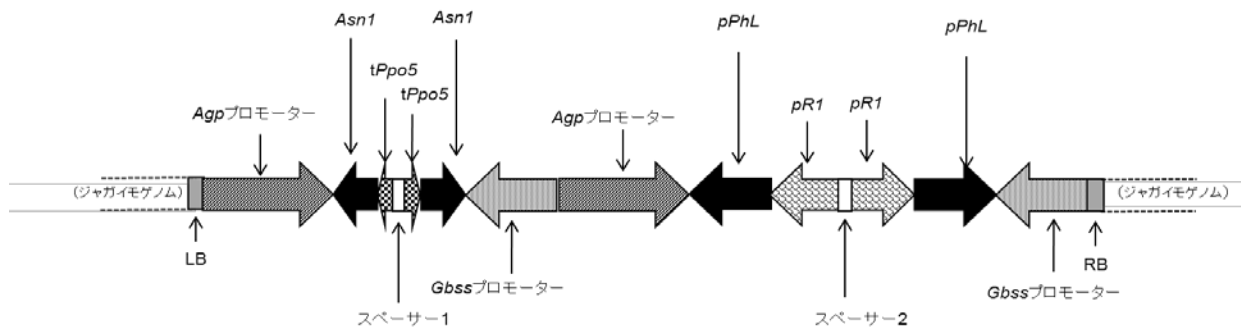


図 1 ジャガイモ SPS-00E12-8 に挿入された DNA (模式図)

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 の塊茎、ふく枝、茎、葉、花及び根において、各 DNA 断片の導入により、*Asn1* 遺伝子、*Ppo5* 遺伝子、*PhL* 遺伝子及び *R1* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するため、ノーザンブロット分析を行った。塊茎は圃場及び温室で栽培したもの、ふく枝、茎、葉、花及び根は温室で栽培したものを供した。

その結果、非組換え体と比較して、塊茎においては、*Asn1* 遺伝子、*Ppo5* 遺伝子、*PhL* 遺伝子及び *R1* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認された。また、ふく枝では *Asn1* 遺伝子、*PhL* 遺伝子及び *R1* 遺伝子、茎では *Ppo5* 遺伝子及び

PhL 遺伝子、根では *Asn1* 遺伝子及び *Ppo5* 遺伝子、花では *Asn1* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認された（参照 22）。

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 は、DNA 断片の導入によるジーンサイレンシングを意図しており、導入された DNA によりタンパク質が産生されることはないと考えられる。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 に導入された DNA により、タンパク質が産生されることはないと考えられる。導入遺伝子断片の供与体であるジャガイモのアレルゲンについては、第 3 - 4 に記載した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

・挿入 DNA の安定性（サザンブロット分析）

ジャガイモは塊茎を介してクローンとして増殖することから、種子植物とは異なり他家受粉による変異のリスクが少ないとされているが、確認のため、ジャガイモ SPS-00E12-8 に挿入された DNA の安定性について、葉 (G0、G1 及び G2^e) 及び塊茎 (G3) を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、共通のバンドが確認され、挿入 DNA が栄養繁殖の間に安定して受け継がれることが確認された（参照 23）。

・アクリルアミド生成量

高温加熱加工する際に生じるアクリルアミドの生成量の減少を確認するために、塊茎 (G1、G2 及び G3) の高温加熱加工時のアクリルアミド含有量を測定した。その結果、ジャガイモ SPS-00E12-8 の加工物中のアクリルアミド含有量は、対照の非組換えのジャガイモと比較して、複数の年度において、減少していることが確認された（参照 24）。

・カテコール試験

打撲時の黒斑形成の抑制を確認するために、カテコール試験を行った結果、4 箇所の圃場から採取した全ての塊茎 (G2) 切片で対照の非組換え体の塊茎切片に見られた褐変が認められず、ポリフェノール酸化酵素-5 活性が低いことが確認された（参照 23）。

^e G0 は組織培養から増殖させた幼植物体及びこれを生育させて得られた植物体（塊茎を含む）。G0 塊茎から G1 植物体及び G1 塊茎が生産され、G2 及び G3 の植物体及び塊茎も同様に生産される。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

アスパラギン合成酵素は、アスパラギン酸、グルタミン及びATPを基質としてアスパラギン合成を触媒する。本遺伝子の発現が抑制されることでアスパラギンの合成が抑制され、それに伴いグルタミンが増加することが予想された。実際、統計学的有意差はないが、グルタミンの増加傾向が認められた（参照 24）。ポリフェノール酸化酵素は、プラスチドに存在し、細胞が傷害を受けることで細胞質に滲出してフェノール類を重合する。本酵素の活性と病害抵抗性には関連性があるとの報告があるが（参照 25、26）、その影響は明確ではない。ジャガイモ SPS-00E12-8 を用いて、ジャガイモの重要病害である葉枯れ病及び軟腐病に対する抵抗性試験を行った結果、従来品種との間に有意な差は認められていないとしている（参照 27）。

第1カセット（*fAsn1* 及び *tPpo5*）及び第2カセット（*pR1* 及び *pPhL*）から生成される全ての siRNA が標的以外の遺伝子の発現を非特異的に抑制する可能性を検討するため、ジャガイモのトランスクリプトデータベース^fを用いて解析を行った。その結果、第2カセット（*pR1* 及び *pPhL*）より生成される siRNA の 21 nt と一致する塩基配列を有する 14 個の遺伝子が検出され、そのうち、RNAi を起こす可能性があるのは、機能不明の仮想遺伝子及び *tetraspanin10* の 2 個と推定された。*tetraspanin10* は、シロイヌナズナで報告されている 17 の *tetraspanin* 遺伝子の 1 つであるが、そのうち機能の解析がなされているのは *tetraspanin1* のみで葉や根の形態形成に関与していることが報告されている。しかしながら、ジャガイモ SPS-00E12-8 においては形態的に大きな変化は認められていない。さらに、標的以外のプロモーターの働きを非特異的に抑制する可能性を検討するため、*pR1* 及び *pPhL* 領域をクエリーとしてジャガイモゲノムデータベース^gを用いて解析を行った結果、90%以上の相同性を示す領域は検出されなかった。

したがって、挿入DNAにより意図しない遺伝子が影響を受け、ジャガイモ SPS-00E12-8 に影響を与える可能性は低いと考えられたとしている（参照 28）。

7. 宿主との差異に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 と非組換えジャガイモについて、塊茎中の主要構成成分、遊離アミノ酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類、ミネラル類、糖類、グリコアルカロイド及びアクリルアミド（フライドポテトに加工）の分析を行い、統計学的有意差について検討した（参照 24）。

(1) 主要構成成分

タンパク質、脂質、灰分、粗繊維及び炭水化物の分析を行った結果、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められなかった。

^f Michigan State University (MSU) potato transcript database (56,218 sequences)

^g Michigan State University (MSU) potato genome database

(2) ビタミン類及びミネラル類

ナイアシン、ビタミン B₆、ビタミン C、銅、マグネシウム及びカリウムの分析を行った結果、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(3) 遊離アミノ酸組成

遊離アミノ酸 10 種類の分析を行った結果、アスパラギン及びグルタミンを除き対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められなかった。アスパラギンは統計学的に有意に減少し、グルタミンは統計学的に有意に増加していたものの、両遊離アミノ酸とも、従来品種及び文献値の範囲内であった。なお、検出限界値未満のものが多かったことから統計処理ができなかった 9 種類についても、従来品種及び文献値の範囲内であった。

(4) アミノ酸組成

アミノ酸 17 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えジャガイモと比較して、アスパラギン酸及びアスパラギンの合計が統計学的に有意に減少し、グルタミン酸とグルタミンの合計が統計学的に有意に増加した。また、アルギニン及びメチオニンについても、統計学的有意に増加していた。グルタミン酸とグルタミンの合計値、アルギニン及びメチオニンは、従来品種及び文献値の範囲内であった。アスパラギン酸及びアスパラギンの合計値の平均値は、従来品種の分析結果に基づく値の範囲内であった。

その他のアミノ酸は、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(5) グリコアルカロイド

ジャガイモは、毒性物質としてグリコアルカロイドを含有するため、その含有量を測定した。その結果、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められず、かつ、含有量が多いものでも、安全のための上限値 (20 mg/100 g) (参照 29) を超えるものはなかった。

(6) 糖類

新鮮時及び 1、3、5 か月間保存の塊茎について、果糖及びブドウ糖の合算値、並びにショ糖を測定し、対照に用いた非組換えジャガイモと比較した。

その結果、いずれの保存期間においてもジャガイモ SPS-00E12-8 の果糖とブドウ糖の合計の平均値は対照の非組換えジャガイモと比較して減少しており、1 か月間保存の場合に統計学的有意差が認められたが、文献値及び従来品種の範囲内であった。ショ糖は、1 か月間保存で統計学的に有意に減少したが、文献値及び従来品種の範囲内であった (参照 30、31、32)。

(7) アクリルアミド

新鮮時及び2、3、5、6、7か月間保存の塊茎から製造したフライドポテトのアクリルアミド含量を測定し、対照に用いた非組換えジャガイモと比較した。その結果、いずれの保存期間においても、ジャガイモ SPS-00E12-8 から製造したフライドポテトのアクリルアミド含量は、対照の非組換えジャガイモから製造したものと比較して、統計学的に有意に低かった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査の申請が、米国農務省（USDA）に対して無規制栽培のための申請が行われ、それぞれ2015年3月及び2014年11月に安全性評価が終了した。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての安全性審査が、カナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料・環境のための安全性審査の申請が行われ、ともに2016年3月に安全性評価が終了した。

メキシコにおいては、2015年11月、メキシコ保健省（SSA）に対して輸入の食品・飼料のための安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 の栽培方法は、従来のジャガイモと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ジャガイモ SPS-00E12-8 の種いもの増殖法及び管理方法は、従来のジャガイモと同じである。

第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項

第2から第6までの事項により安全性の知見は得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「アクリルアミド産生低減及び打撲黒斑低減ジャガイモ（SPS-00E12-8）」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

なお、ジャガイモ SPS-00E12-8 は、宿主の代謝系が改変され、特定の成分の含量を変化させる形質が付与されていることから、ジャガイモ SPS-00E12-8 を用いた掛け合わせ品種は、安全性評価が必要である。

<参照>

1. Horton DE and Anderson JL (1992) Potato production in the context of the world and farm economy. In: The potato crop: the scientific basis for improvement (Ed. Harris PM) Chapman and Hall, London, pp. 803
2. Lisinska G, Leszczynski W (1989) Potato science and technology. Chapter 2: Potato tubers as a raw material for processing and nutrition (pp 11-128). Elsevier Applied Science, London.
3. Rogan GJ, Bookout, JT, Duncan DR, Fuchs RL, Lavrik PB, Love SL, Mueth M, Olson T, Owens ED, Raymond PJ, Zalewski J (2000) Compositional analysis of tubers from insect and virus resistant potato plants. J. Agric. Food.
4. Talburt WF, Smith O (1987) Potato processing. Van Nostrand Reinhold, New York.
5. Van Gelder WMJ (1990) Chemistry, toxicology, and occurrence of steroidal glycoalkaloids: potential contaminants of the potato (*Solanum tuberosum* L.) In: Poisonous plants and contamination of edible plants (Rizk AM, Ed.), CRC Press: 117-156.
6. OECD (2002) Consensus Document on Compositional Considerations For New Varieties of Potatoes: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxines, 22 pages.
7. Crop Watch 2015. <http://cropwatch.unl.edu/potato/russetburbank>
8. Astwood J, Alibhai M, Lee T, Fuchs R, Sampson H. (2000) Identification and characterization of IgE binding epitopes of patatin, a major food allergen of potato. Program and abstracts of the 56th annual meeting of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, March 3-8, San Diego, Calif. Abstracts 555
9. 新編農学大辞典 2004. 山崎耕宇、久保祐雄、西尾俊彦、石原邦 監修. 養賢堂
10. Construction of pSIM1278 and sequence analysis (社内報告書)
11. Yan H, Chretien R, Ye J, Rommens CM (2006) New construct approaches for efficient gene silencing in plants. Plant Physiol, 141: 1508-1518.
12. Chau, B.L., and Lee, K.A. (2007) Function and anatomy of plant siRNA pools derived from hairpin transgenes. Plant Methods. 3: 13.
13. Prescott EM, Proudfoot NJ (2002) Transcriptional collision between convergent genes in budding yeast. Proc Natl Acad Sci USA, 99: 8796-8801.
14. Bioinformatics Evaluation of the Insert Site and Flanking Sequences (社内報告書)
15. Sowka S, Hsieh LS, Krebitz M, Akasawa A, Marrin BM, Starrett D, Peterbauer CK, Scheiner O, Breiteneder H (1998) Identification and cloning of prs a 1, a 32-kDa endochitinase and major allergen of avocado, and its expression in the yeast *Pichia pastoris*. J Biol Chem, 273: 28091-28097.
16. Richael CM, Kalyaeva M, Chretien RC, Yan H, Adimulam S, Stivison A,

- Weeks JT, Rommens CM. (2008) Cytokinin vectors mediate marker-free and backbone-free plant transformation. *Transgenic Res.*, 17: 905-917.
17. de Vetten N, Wolters AM, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser R (2003) A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. *Nature Biotechnology*, 21:439-442.
 18. Characterization of Inserted DNA (社内報告書)
 19. Evidence for the Absence of Vector Backbone DNA (社内報告書)
 20. Assessment of Insert Number in E12 (社内報告書)
 21. PPO Activity Assay in E12 Tuber (社内報告書)
 22. Efficacy and Tissue-Specificity of Gene Silencing (社内報告書)
 23. Evidence for Stability of the Inserted DNA (社内報告書)
 24. Compositional Analyses (社内報告書)
 25. Li L, Steffens JC (2002) Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215: 239-247.
 26. Hakimi SM, Krohn BM, Stark DM: Monsanto Technology LLC (2006) United States Patent: Method of imparting disease resistance to plants by reducing polyphenol oxidase activities. Patent No.: US 7,122,719 B2.
 27. Disease Susceptibility (社内報告書)
 28. Analysis of pSIM1278 siRNA targets and specificity (社内報告書)
 29. Sinden SL. (1987) Potato glycoalkaloids. *Acta Hortic.*, 207: 41-48.
 30. Blenkinsop RW, Copp LJ, Yada RY, Marangoni A (2002) Changes in compositional parameters of tubers of potato (*Solanum tuberosum*) during low-temperature storage and their relationship to chip processing quality. *J Agric Food Chem*, 50: 4545-4553.
 31. Matsuura-Endo CM, Ohara-Takada A, Chuda Y, Ono H, Yada H, Yoshida M, Kobayashi A, Tsuda S, Takigawa S, Noda T, Yamauchi H, Mori M (2006) Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70: 1173-1180.
 32. Menendez CM, Ritter E, Schafer-Pregl R, Walkemeier B, Kalde A, Salamini F, Gebhardt C (2002) Cold sweetening in diploid potato: mapping quantitative loci and candidate genes. *Genetics*, 162: 1423-1434.