

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

低リグニンアルファルファ KK179 系統

2015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	4
II. 食品健康影響評価	5
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	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項	5
2. 宿主の食経験に関する事項	6
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項	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 ...	6
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	6
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	7
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	7
第3. 宿主に関する事項	7
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	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項	7
4. アレルギー誘発性に関する事項	8
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..	8
6. 安全な摂取に関する事項	8
7. 近縁の植物種に関する事項	8
第4. ベクターに関する事項	8
1. 名称及び由来に関する事項	8
2. 性質に関する事項	8
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	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
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	9
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	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項	13
第6. 組換え体に関する事項	13
1. 遺伝子導入に関する事項	13
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	15

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	15
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	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項	15
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	15
7. 宿主との差異に関する事項.....	16
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	17
9. 栽培方法に関する事項.....	17
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	17
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	18
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	18
<参照>	18

＜審議の経緯＞

- 2014年2月19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3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4月24日 第126回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2014年12月11日 第133回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年3月3日 第551回食品安全委員会(報告)

＜食品安全委員会委員名簿＞

熊谷 進(委員長)
佐藤 洋(委員長代理)
山添 康(委員長代理)
三森国敏(委員長代理)
石井克枝
上安平冽子
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＞

澤田純一(座長)
小関良宏(座長代理)
宇理須厚雄 手島玲子
岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信
近藤一成

要 約

「低リグニンアルファルファ KK179 系統」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、アルファルファ由来のカフェオイル CoA 3-O-メチルトランスフェラーゼ (CCOMT タンパク質) をコードする *CCOMT* 遺伝子の一部の領域からなる遺伝子断片を逆方向反復配列に導入することで、転写産物による RNAi が誘導され、内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、地上部におけるリグニン含量が低下するとされている。なお、本系統の作出過程において、選択マーカーとして利用するために *Escherichia coli* のトランスポゾン Tn5 に由来する *nptII* 遺伝子が導入されたが、交配による遺伝的分離を利用して本遺伝子を持たない個体が選抜されている。

「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、挿入遺伝子の安全性、遺伝子の導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分等の比較の結果等について確認した結果、非組換えアルファルファ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。

したがって、「低リグニンアルファルファ KK179 系統」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：低リグニンアルファルファ KK179 系統

性 質：リグニン含量の低減

申請者：日本モンサント株式会社

開発者：Monsanto Company（米国）、Forage Genetics International LLC（米国）

「低リグニンアルファルファ KK179 系統」（以下「アルファルファ KK179」という。）は、アルファルファ由来のカフェオイル CoA 3-O-メチルトランスフェラーゼ (CCOMT タンパク質) をコードする *CCOMT* 遺伝子の一部の領域からなる遺伝子断片を逆方向反復配列に導入することで、転写産物による RNAi が誘導され、内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、地上部におけるリグニン含量が低下するとされている。

なお、本系統の作出過程において、選択マーカーとして利用するために *Escherichia coli* のトランスポゾン Tn5 に由来する *nptII* 遺伝子が導入されたが、交配による遺伝的分離を利用して本遺伝子を持たない個体が選抜されている。

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、マメ科 *Medicago* 属に属するアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の従来品種 R2336 系統である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

CCOMT 遺伝子断片の供与体は、アルファルファ (*M. sativa* L.) であり、*nptII* 遺伝子の供与体は *Escherichia coli* のトランスポゾン Tn5 である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

CCOMT 遺伝子は、リグニン生合成経路の主要な酵素である CCOMT タンパク質をコードする。*CCOMT* 遺伝子断片を逆方向反復配列となるように導入することで、転写産物による RNAi が誘導され、内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、地上部におけるリグニン含量が減少する。

nptII 遺伝子は、形質転換体を選択するためのマーカーとして用いられ、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する NPTII タンパク質を発現する。なお、交配による遺伝的分離を利用して *nptII* 遺伝子を持たない個体を選抜したため、アルファルファ KK179 は、*nptII* 遺伝子を有していない。

CCOMT 遺伝子断片及び *nptII* 遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

アルファルファは、古くから牧草として栽培されてきたものであり、食用としては、播種後3～7日後の幼苗がスプラウトとして食される。また、アルファルファは、栄養補助食品等の原料としても利用されている。

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

アルファルファの主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 15.3～25.8%、総脂質 1.3～3.2%、灰分 8.4～15.3%である（参照1）。

また、スプラウトの主要栄養組成（対乾燥重量）は、タンパク質 45.0%、総脂質 7.8%、灰分 4.5%である（参照1）。

(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

アルファルファの有害生理活性物質（対乾燥重量）は、サポニン 1.6～2.4%（参照2）、クメステロール（フィトエストロゲン的一种） 3.0～104.4 ppm（参照1）及びカナバニン 1.3～2.4%（参照3）である。

また、スプラウトの有害生理活性物質（対乾燥重量）は、サポニン 87 mg/g 及びカナバニン 1.3～2.7%である（参照3）。

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

アルファルファ KK179 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のアルファルファと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

アルファルファ KK179 の可食部位は、従来のアルファルファと変わらない。

(3) 摂取量

アルファルファ KK179 の摂取量は、従来のアルファルファと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

アルファルファ KK179 の調理及び加工方法は、従来のアルファルファと変わらない。

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

アルファルファ KK179 は、*CCOMT* 遺伝子断片を逆方向反復配列に導入することで、転写産物による RNAi が誘導され、内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。その結果、地上部におけるリグニン含量が減少することが宿主との相違点である。

以上、1～6により、アルファルファ KK179 の安全性評価においては、既存のアルファルファ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

一般に、アルファルファは生育に従い総リグニンの蓄積量が増加する。リグニンは反芻動物の飼料の消化率に対して負の影響を及ぼすものであり、収穫時期が遅れることにより総リグニン量が増加するため、飼料としての品質が低下することが知られている。アルファルファ KK179 は、リグニンの含量を低減させることで、飼料の品質を低下させることなく収穫期間を拡大することができるとされている。

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、マメ科 *Medicago* 属に属するアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の R2336 系統である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

アルファルファの起源はイランと考えられ、飼料として生産される植物としては最も古い歴史がある。飼料としての重要性から世界中で生産されている（参照 4）。

アルファルファが属する *Medicago* 属は 80 種以上の種からなり、現在、商業栽培が行われているアルファルファは、*Medicago sativa* L. subsp. *sativa*（紫花アルファルファ）及び *Medicago sativa* L. subsp. *falcata*（黄花アルファルファ）の 2 つの亜種とこれらの交雑種である。栽培種の多くは、*M. sativa* L. subsp. *sativa* に属する。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファは、サポニン、フィトエストロゲン、カナバニンといった有害物質を産生することが報告されている（参照 1）。

サポニンのうち、毒性を示す可能性があるのは、ザンハ酸及びメジカゲン酸であると考えられており、口腔及び消化管の炎症、膜透過性の上昇及び溶血などを引き起こす可能性がある（参照 5）。また、サポニンの特性である泡立ち（参照 6）により、反芻胃の鼓脹をもたらす。

クメステロール、イソフラボノイドなどのフィトエストロゲンは、反芻動物等の生殖機能に影響を及ぼすとの報告がある（参照 7、8）。

カナバニンは、多くのマメ科植物の種子及びスプラウトに貯蔵される二次代謝産物であり、L-カナバニンとして存在する。カナバニンは、全身性紅斑性狼瘡を誘発する可能性があるとの報告がある（参照 9、10）。

縮合タンニンは、飼料に含まれるタンパク質に結合能を持つものであるが、アルファルファでの含量は一般的な牧草と比較して少ない（参照 1）。

なお、アルファルファの通常の商品としての摂取量において、これらの有害生理活性物質がヒトに対して影響を及ぼすとの報告はないとしている。

4. アレルギー誘発性に関する事項

これまでに、ヒトにおけるアルファルファに対するアレルギー誘発性の報告はない（参照 11）。

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

他の植物と同様に、アルファルファの病害は多く知られているが、それらがヒト、家畜等に対し病原性を持つとの報告はない。

6. 安全な摂取に関する事項

食用としては、スプラウトとして食されるほか、栄養補助食品等として利用されている。なお、アルファルファ消費量の 95%以上がスプラウトである。

7. 近縁の植物種に関する事項

アルファルファの近縁種において、有害生理活性物質の産生に関する報告はない。

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

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の構築には、ベクター F 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

ベクター F の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

ベクター F 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

ベクター F 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

ベクターFには、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子並びにネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

ベクターF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

CCOMT 遺伝子断片の由来はアルファルファ (*M. sativa* L.) であり、*nptII* 遺伝子の由来は *E. coli* のトランスポゾン Tn5 である。

(2) 安全性に関する事項

CCOMT 遺伝子断片の供与体であるアルファルファは、食用として利用されている。また、*nptII* 遺伝子の供与体である *E. coli* は、研究用及び商業用に広く使用されている。

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

CCOMT 遺伝子の逆位方向反復配列からなる遺伝子断片は、アルファルファの *CCOMT* 遺伝子の一部の領域の塩基配列を基にして構築された。

nptII 遺伝子は、選抜マーカーとして導入用プラスミドの T-DNAII 領域にクローニングされた。

挿入 DNA の構成要素は表 1、表 2 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *CCOMT* 遺伝子断片

CCOMT 遺伝子は、リグニンの生合成経路においてカフェオイル CoA をフェルロイル CoA にメチル化する酵素である *CCOMT* タンパク質をコードする。

CCOMT 遺伝子の逆方向反復配列からなる *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットを導入し、その転写産物である二本鎖 RNA が、RNAi 機構を介したジーンサイレンシングにより内在性 *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する（参照 12）。*CCOMT* タンパク質は、リグニン・サブユニット（主に、グアヤシルリグニン

(G リグニン)、シリギルリグニン (S リグニン) 及び *p*-ヒドロキシフェニルリグニン (H リグニン) の3種)のうち、G リグニンの生合成に関与する主要酵素であり(参照 13)、*CCOMT* 遺伝子の発現を抑制することでG リグニン含量が減少するとしている。

CCOMT 遺伝子発現抑制カセットは、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子由来の *Pal2* プロモーターにより制御されており、PAL 遺伝子は植物のリグニン沈積部位で特異的に発現する(参照 13、14)。

CCOMT 遺伝子の発現を抑制することでG リグニン含量が減少し、総リグニン含量が減少する。一方、S リグニン量は有意には増加しないことから、全サブユニットに占めるS リグニンの割合が増加し、S リグニン:G リグニン比が上昇することとなる(参照 15)。

アルファルファ KK179 のリグニン・サブユニットの分析を行った結果、対照の非組換えアルファルファと比較して、G リグニン含量は統計学的有意に減少した。また、S リグニン含量は有意には増加しておらず、S リグニン:G リグニン比の上昇が確認された(参照 16)。さらに、総リグニン含量(酸性デタージェントリグニン)を測定した結果、対照の非組換えアルファルファと比較して、統計学的有意に減少していることが確認された(参照 17)。

・ *nptII* 遺伝子

nptII 遺伝子が NPTII タンパク質を発現することで、アミノグリコシド系抗生物質であるネオマイシン、カナマイシン等に対して耐性を持ち、選抜マーカーとして機能する。EFSA (欧州食品安全機関) は、遺伝子組換え作物中の *nptII* 遺伝子が、ヒト及び家畜等の健康に影響を及ぼす可能性は極めて低いとしている(参照 18)。

(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 PV-MSPQ12633 の T-DNAII 領域にはカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子を有するが、アルファルファ KK179 には導入されていないことがサザンブロット分析により確認されている。

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

CCOMT 遺伝子発現抑制カセットのプロモーターは、インゲンマメ (*P. vulgaris*) のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子由来の *Pal2* プロモーターである(参照 13、14)。

nptII 遺伝子のプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S RNA プロモーターである(参照 19)。

(2) ターミネーターに関する事項

CCOMT 遺伝子発現抑制カセット及び *nptII* 遺伝子のターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) のノパリン合成酵素 (*nos*) 遺伝子の 3' 非翻訳領域配列である (参照 20、21)。

(3) その他

その他の挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は挿入されていない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

Segment A1、中間ベクターB~F を用いて、*CCOMT* 遺伝子発現抑制カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットを含む導入用プラスミド PV-MSPQ12633 が構築された。

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

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 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。

(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

宿主に導入される導入用プラスミド PV-MSPQ12633 内の領域には、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (ORF) は含まれていない (参照 22、23)。

(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

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の意図する挿入領域は、T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域のそれぞれの右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの領域である。

(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 PV-MSPQ12633 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化されている。

表1 アルファルファ KK179 への挿入 DNA①

構成 DNA	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(CCOMT 遺伝子発現抑制カセット)	
<i>Pal2</i> プロモーター	プロモーター領域 インゲンマメ (<i>P. vulgaris</i>) のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子由来のプロモーター
CCOMT断片	アルファルファ (<i>M. sativa</i> L.) のカフェオイル CoA 3-Oメチルトランスフェラーゼをコードする CCOMT 遺伝子のコード配列の断片 (アンチセンス)
CCOMT断片	アルファルファ (<i>M. sativa</i> L.) のカフェオイル CoA 3-Oメチルトランスフェラーゼをコードする CCOMT 遺伝子のコード配列の断片 (センス)
<i>nos</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来のノパリン合成酵素 (<i>nos</i>) の 3'非翻訳領域
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

表2 アルファルファ KK179 への挿入 DNA② (アルファルファ KK179 には存在しない)

構成 DNA	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(<i>npt II</i> 遺伝子発現カセット)	
<i>35S</i> プロモーター	プロモーター領域 カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S RNA プロモーター
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 由来のネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する。
<i>nos</i> ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来のノパリン合成酵素 (<i>nos</i>) の 3'非翻訳領域
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

6. DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法によって導入用プラスミド PV-MSPQ12633 を宿主に導入した後、カナマイシンを含む培地で選抜することによって、再生個体が得られた。得られた再生個体について、雄性不稔の系統と掛け合わせて F1 を作出した。F1 世代から、サザンブロット分析及び PCR 分析により T-DNA II 領域を有さない個体を選抜し、形態特性及び導入遺伝子解析の結果に基づき、アルファルファ KK179 を得た。

なお、アルファルファは 4 倍体であり、商業品種は、複数の遺伝的系統の多交雑により作出されるため、異なる遺伝子型を持つ多様な表現形質を示す個体群である。アルファルファ KK179 も同様で、遺伝的に均一でない個体群である。

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

アルファルファ KK179 のゲノム中に、*CCOMT* 遺伝子発現抑制カセット構成要素を含む T-DNA I 領域が 1 コピー挿入されていることがサザンブロット分析で確認された (参照 24)。

また、T-DNA II 領域及び導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の外骨格領域は、アルファルファ KK179 のゲノム中に検出されないことがサザンブロット分析で確認された (参照 24)。

アルファルファ KK179 の挿入 DNA の塩基配列を決定し、導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の T-DNA 領域と比較した結果、塩基配列は一致していた。(参照 24)。

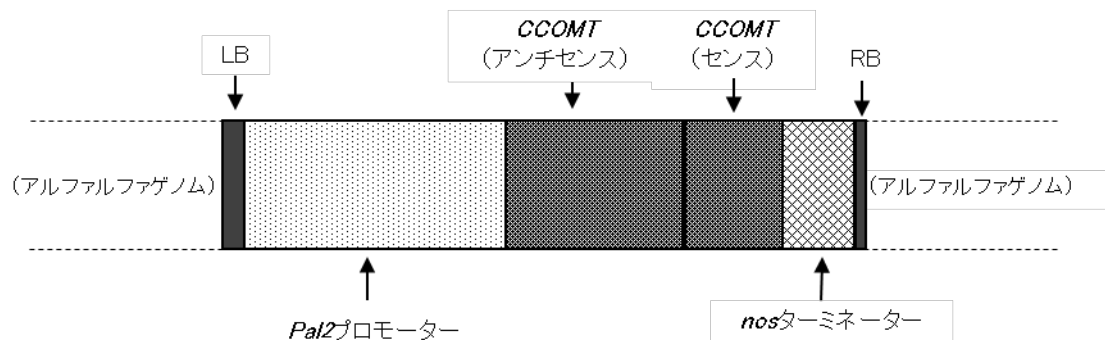
アルファルファ KK179 の挿入 DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを確認するために、近傍配列に特異的なプライマーを用いて PCR 分析を行った結果、アルファルファ KK179 及び非組換え体から、同じ長さの PCR 産物が増幅された。アルファルファは 4 倍体であり、アルファルファ KK179 の PCR 産物は導入遺伝子を持たない対立遺伝子から増幅されたものと考えられた。また、導入遺伝子の 5' 及び 3' 近傍領域において増幅された PCR 産物の塩基配列を決定し、アルファルファ KK179 の挿入 DNA 近傍配列と宿主ゲノムを比較した結果、DNA 挿入に伴う 102 bp の欠損、5' 及び 3' 近傍配列領域それぞれ一か所の一塩基多型によるヘテロ変異を除き、塩基配列は一致していた。したがって、近傍配列は宿主ゲノム由来であることが確認された (参照 24)。

アルファルファ KK179 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ことを確認するために、5' 末端近傍配列 (1,047 bp)、欠失した 102 bp 及び 3' 末端近傍配列 (1,256 bp) について、公的に利用できるデータベース (GenBank)^a を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。

^a EST_2012, NT_2012, NR_20112 : EST データベース (71,454,007 配列)、塩基配列データベース (15,512,049 配列) 及びタンパク質データベース (16,826,875 配列) を含む。

EST_2012 及び NT_2012 を用いた blastn 検索の結果、95%以上の相同性を示す配列がそれぞれ一個確認されたが、導入遺伝子挿入部位の 3' 末端側の約 1.1 kb 下流及び 5' 末端側の約 629 bp 上流の短い配列であり、遺伝子挿入部位における既知の内在性遺伝子の存在を示唆するものではないと判断された。NR_2012 を用いた blastx 検索の結果、相同性の高い配列が 876 個確認されたが、そのうちの多くは停止コドン及びフレームシフト変異を有する配列であった。11 個の停止コドンを有さない配列は、ギャップを有する短い断片であり、コットンウッド、イネ及びトウモロコシの予想タンパク質又は機能未知タンパク質であった。したがって、アルファルファの既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられた (参照 25)。

図1 アルファルファ KK179 に挿入された DNA (模式図)



(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

アルファルファ KK179 の挿入 DNA 領域と 5'末端近傍配列 (1,047 bp) 及び 3'末端近傍配列 (1,256 bp) の接合部において意図しない ORF が生じていないことを確認するために、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 8 アミノ酸以上の ORF が 10 個見いだされた。10 個の ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース (TOX_2012^b)、タンパク質データベース (PRT_2012^c) 及びアレルゲンデータベース (AD_2012^d) を用いて FASTA 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質やアレルゲンは見いだされなかった。さらに、抗原決定基の有無を確認するために、

^b TOX_2012 : GenBank (GenBank protein database, 187.0 版、2011 年 12 月 18 日)に登録されているタンパク質配列から構成されるタンパク質データベース(PROTEIN) から検索して集めた 12,866 配列のサブセット。

^c PRT_2012 : GenBank (GenBank protein database, 187.0 版、2011 年 12 月 18 日)に登録されているタンパク質配列から構成されるデータベース(24,731,719 配列)。

^d AD_2012 : Food Allergy Research and Resource Program Database (FARRP_2012)から得られた配列をもとに作成されたデータベース (1,603 配列)。

AD_2012 を用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 23）。

さらに、アルファルファ KK179 の挿入 DNA 領域において、六つのフレームから産生されるタンパク質について相同性検索を行った結果、既知のアレルゲン、毒素及び生理活性のあるタンパク質と相同性のある目的以外のタンパク質は見いだされなかった（参照 22）。

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

・ *CCOMT* 遺伝子転写産物

アルファルファ KK179 の地上部及び根における *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するためにノーザンブロット分析を行った結果、非組換えアルファルファと比較して *CCOMT* 遺伝子の RNA の蓄積が抑制されていることが確認された（参照 26）。

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

アルファルファ KK179 に導入された *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットにより、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

アルファルファ KK179 に導入された *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットにより、タンパク質が産生されることはないと考えられる。なお、挿入遺伝子の供与体であるアルファルファについては、アレルギー誘発性の報告はない。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

アルファルファ KK179 に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、4 世代のアルファルファ KK179 についてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照 27）。

また、導入遺伝子の分離様式を確認するために、3 世代のアルファルファ KK179 について挿入遺伝子の期待分離比と実測値を比較した。その結果、導入遺伝子は、メンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが示された（参照 28）。

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

CCOMT 遺伝子は、リグニンの生合成経路においてカフェオイル CoA をフェルロイル CoA にメチル化する酵素である *CCOMT* タンパク質をコードする。*CCOMT* 遺伝子断片の逆方向反復配列からなる *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットを導入し、その転写産物である二本鎖 RNA が、RNAi 機構を介してジーンサイレンシングを誘導して内在性 *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する（参照 12）。

その結果、G リグニンの生合成経路が阻害され、G リグニン含量が低下し、総リグニン含量が低下することとなる。

CCOMT 遺伝子発現抑制カセットの導入によって、標的以外の遺伝子を非特異的に抑制する可能性を検討するため、ゲノム解析が終了している *Medicago* 属のタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) のトランスクリプトームデータベースを用いてバイオインフォマティクス解析を行った。その結果、21 塩基以上の配列でアルファルファ KK179 の *CCOMT* 遺伝子断片との相同性が 100% である配列が 3 個確認され、それらはタルウマゴヤシの *CCOMT* 遺伝子の配列と一致していた。したがって、アルファルファ KK179 に導入された *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットは、標的である *CCOMT* 遺伝子の発現を特異的に抑制していると考えられた (参照 29)。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたアルファルファ KK179 と対照の非組換えアルファルファのそれぞれ地上部及びスプラウトについて、主要構成成分、アミノ酸組成、ミネラル類、二次代謝産物及び有害生理活性物質の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた。更に、スプラウトについては、ビタミンの分析が行われた。なお、商業品種も含め実測値の過半数が定量限界値未満であった項目については、統計解析を行っていない (参照 30、31、32、33)。

(1) 主要構成成分

地上部並びにスプラウトの水分、タンパク質、灰分、炭水化物、酸性デタージェントリグニン、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び地上部の総脂質について分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であってもその平均値は一般の商業品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。なお、スプラウトの総脂質については、実測値の過半数が定量限界値未満であった。

(2) アミノ酸組成

地上部及びスプラウトのアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であってもその平均値は一般の商業品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。

(3) ミネラル類

地上部及びスプラウトのカルシウム、銅等の主要なミネラル 9 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) 二次代謝産物

地上部のフェルラ酸、遊離フェニルアラニン、総ポリフェノール及び *p*-クマル酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であってもその平均値は一般の商業品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。なお、地上部のシナピン酸及びスプラウトの総ポリフェノールについては、実測値の過半数が検出限界値未満であった。

(5) 有害生理活性物質

地上部並びにスプラウトのカナバニン及びサポニン（総バヨゲニン、総ヘデラゲニン、総メジカゲン酸、総ソヤサポゲノール B、総ソヤサポゲノール E、総ザンハ酸及び総サポニン）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められないか、統計学的有意差が認められた場合であってもその平均値は一般の商業品種の分析結果に基づく許容区間の範囲内であった。なお、地上部並びにスプラウトのダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン、クメステロール、フォルモノネチン及びビオカイニン A については、実測値の過半数が検出限界値未満であった。

(6) ビタミン

スプラウトの葉酸及びビタミン C について分析を行った結果、対照に用いた非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった。

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）に対する食品・飼料としての安全性審査の申請が行われ、米国農務省（USDA）に対する無規制裁培の承認申請が行われ、それぞれ 2013 年 12 月及び 2014 年 11 月に承認を得た。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対する食品として、カナダ食品検査庁（CFIA）に対する環境・飼料としての安全性審査の申請が行われ、2014 年 10 月に承認を得た。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対する食品としての安全性審査の申請が行われ、2014 年 5 月に承認を得た。

9. 栽培方法に関する事項

アルファルファ KK179 の栽培方法については、従来のアルファルファと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

アルファルファ KK179 の種子の製法及び管理方法については、従来のアルファルファと同じである。

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な事項

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る。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「低リグニンアルファルファ KK179 系統」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、アルファルファ KK179 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、アルファルファ KK179 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. OECD. 2005. Consensus document on compositional considerations for new varieties of alfalfa and other temperate forage legumes: Key feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2005)13. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
2. Tava, A., W. Oleszek, M. Jurzysta, N. Berardo and M. Odoardi. 1993. Alfalfa saponins and sapogenins: Isolation and quantification in two different cultivars. *Phytochemical Analysis* 4: 269-274.
3. Rosenthal, G.A. and P. Nkomo. 2000. The natural abundance of L-canavanine, an active anticancer agent, in alfalfa, *Medicago sativa* (L.). *Pharmaceutical Biology* 38: 1-6.
4. Michaud, R., W.F. Lehman and M.D. Rumbaugh. 1988. World distribution and historical development. Pages 25-91 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
5. Oleszek, W. 1996. Alfalfa saponins: Structure, biological activity, and chemotaxonomy. Pages 155-170 in *Saponins Used in Food and Agriculture*. Volume 405. G.R. Waller and K. Yamasaki (eds.). Plenum Press, New York, New York
6. Marston, A., J.-L. Wolfender and K. Hostettmann. 2000. Analysis and isolation of saponins from plant material. Pages 1-12 in *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. W. Oleszek and A. Marston (eds.). Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.

7. Howarth, R.E. 1988. Antiquality factors and nonnutritive chemical components. Pages 493-514 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
8. Stob, M. 1983. Naturally occurring food toxicants: Estrogens. Pages 81-100 in *CRC Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants*. M. Rechcigl (ed.). CRC Press, Inc., Boca Roton, Florida
9. Akaogi, J., T. Barker, Y. Kuroda, D.C. Nacionales, Y. Yamasaki, B.R. Stevens, W.H. Reeves and M. Satoh. 2006. Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 5: 429-435.
10. Malinow, M.R., E.J. Bardana, B. Pirofsky, S. Craig and P. McLaughlin. 1982. Systemic lupus erythematosus-like syndrome in monkeys fed alfalfa sprouts: Role of a nonprotein amino acid. *Science* 216: 415-417.
11. EFSA. 2009. Opinion on the safety of 'Alfalfa protein concentrate' as food. *The EFSA Journal* 997:1-19.
12. Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
13. Guo, D., F. Chen, K. Inoue, J.W. Blount and R.A. Dixon. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. *Plant Cell* 13: 73-88.
14. Leyva, A., X. Liang, J.A. Pintor-Toro, R.A. Dixon and C.J. Lamb. 1992. *cis*-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4: 263-271.
15. Chen, F., M.S.S. Reddy, S. Temple, L. Jackson, G. Shadle and R.A. Dixon. 2006. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *The Plant Journal* 48: 113-124.
16. Amended Report for MSL0023982: Composition of Lignin of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024403) (社内報告書)
17. Analyses of Lignin in Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024120) (社内報告書)
18. EFSA. 2004. Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on a request from the Commission related to the Notification (Reference C/DE/02/9) for the placing on the market of insect-protected genetically modified maize MON 863 and MON 863 × MON 810, for import and processing, under Part C of Directive 2001/18/EC from Monsanto. *EFSA Journal* 49: 1-25.

19. Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
20. Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
21. Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
22. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in KK179 Utilizing the AD_2012, TOX_2012 and PRT_2012 Databases (MSL0024048) (社内報告書)
23. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in KK179: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0023975) (社内報告書)
24. Molecular Characterization of Reduced Lignin Alfalfa KK179 (MSL0023299) (社内報告書)
25. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in KK179: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0024257) (社内報告書)
26. Analysis of the Endogenous *CCOMT* RNA Level in Alfalfa KK179 (MSL0023329) (社内報告書)
27. Stability of the DNA Insert in KK179 Across Multiple Generations (MSL0023312) (社内報告書)
28. Heritability of the KK179 insert in the MBC2, MBC3, and Syn1 Populations (RPN-2010-0705) (社内報告書)
29. Bioinformatic Comparison of KK179 Alfalfa *CCOMT* to the *Medicago truncatula* Transcriptome Using STELLAR (社内報告書)
30. Composition Analyses of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0023847) (社内報告書)
31. Analyses of Saponin Levels of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0023980) (社内報告書)
32. Composition Analyses of Sprouts from KK179 Alfalfa Grown in a Greenhouse in the United States during 2011 (MSL0024078) (社内報告書)
33. Analyses of Saponin Levels of Sprouts from KK179 Alfalfa Grown in a Greenhouse in the United States during 2011 (MSL0023985) (社内報告書)