

環境局

化学品委員会と化学品に関するワーキングパーティーとの合同会合

バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和シリーズ No.11

ホスフィノスリシン除草剤に耐性をもたらす遺伝子と
その酵素に関する一般的な情報についてのコンセンサス文書

(注) 本文書は、日本の読者の便に供するため、OECD コンセンサス文書（原本は英語）を日本語に翻訳したものです。引用を行う場合は、原本から直接引用してください。原本は下記の URL から参照することができます。

http://www.oecd.org/document/51/0,3343,en_2649_34387_1889395_1_1_1_1,00.html

バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和シリーズとして、下記のものも公表されています。

- No. 1, *Commercialisation of Agricultural Products Derived through Modern Biotechnology: Survey Results* (1995)
- No. 2, *Analysis of Information Elements Used in the Assessment of Certain Products of Modern Biotechnology* (1995)
- No. 3, *Report of the OECD Workshop on the Commercialisation of Agricultural Products Derived through Modern Biotechnology* (1995)
- No. 4, *Industrial Products of Modern Biotechnology Intended for Release to the Environment: The Proceedings of the Fribourg Workshop* (1996)
- No. 5, *Consensus Document on General Information concerning the Biosafety of Crop Plants Made Virus Resistant through Coat Protein Gene-Mediated Protection* (1996)
- No. 6, *Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving Pseudomonas* (1997)
- No. 7, *Consensus Document on the Biology of Brassica Napus L. (Oilseed Rape)* (1997)
- No. 8, *Consensus Document on the Biology of Solanum tuberosum subsp. tuberosum (Potato)* (1997)
- No. 9, *Consensus Document on the Biology of Triticum aestivum (Bread Wheat)* (1999)
- No. 10, *Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes which Confer Tolerance to Glyphosate Herbicide* (1999)
- Consensus Document on the Biology of Picea abies L. (Norway Spruce)* (in preparation)
- Consensus Document on the Biology of Picea glauca (Moench) Voss (White Spruce)* (in preparation)
- Consensus Document on the Biology of Populus L. (Poplars)* (in preparation)
- Consensus Document on the Biology of Oryza sativa (Rice)* (in preparation)
- Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving Rhizobiaceae* (in preparation)
- Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Applications Involving Bacillus* (in preparation)

© OECD 1999

この資料の全ての部分の複製または翻訳には、下記への許可申請が必要です：

Head of Publications Service, OECD, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, France.

OECD の環境、保健、安全に関する出版物

バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和シリーズ

No.11

ホスフィノスリシン除草剤に耐性をもたらす遺伝子と
その酵素に関する一般的な情報についてのコンセンサス文書

環境局

経済協力開発機構

1999 年 パリ

OECD について

経済協力開発機構（OECD）は、北米、ヨーロッパ、および太平洋地域の先進工業国29カ国の代表、ならびに欧州委員会の代表が、政策を調整し調和させ、相互に関係する問題を討議するために会談し、国際的な問題に対処するために連携する政府間組織である。OECDの活動のほとんどは、加盟国の代表者で構成される200以上の専門委員会とその下部グループによって実施されている。OECDの多くのワークショップやその他の会議には、OECD内で特別な資格を有する数カ国のオブザーバー、および関連する国際組織のオブザーバーが出席する。フランスのパリにあるOECD事務局は、複数の部局と課で構成されており、各委員会とその下部グループの事務を行っている。

環境保健安全課は、テストと評価、優良試験所基準と遵守監視、農薬、リスク管理、バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和、そして化学品事故の6つの異なったシリーズについて、無料の文書を公表している。環境保健安全計画、およびその出版物に関する詳細は、OECDのウェブサイト（以下を参照）で入手可能である。

この出版物は電子的に無料で入手可能です。

本件やその他の多数の環境、保健、安全に関する出版物の完全なテキストは、
OECDのウェブサイト(<http://www.oecd.org/ehs/>)をご覧ください、

または

OECD 環境局
環境保健安全課
2 rue Andre-Pascal
75775 Paris Cedex 16
フランス

Fax : (33) 01 45 24 16 75

E-mail : ehscont@oecd.org までご連絡ください。

序 文

OECD のバイオテクノロジーにおける規制的監督の調和に関するワーキンググループ¹は、1995年6月に開催された最初の会合において、加盟国間で相互に認められるコンセンサス文書の作成に重点的に取り組むことを決定した。これらのコンセンサス文書には、特定産物の規制評価の際に用いるための情報が含まれている。植物のバイオセーフティの分野では、コンセンサス文書は、特定の植物種の生物学、植物種に導入された場合に特定の形質を発現させる特定の遺伝子とそのタンパク質、および植物にもたらされる特定の一般的な形質の改変によって生ずるバイオセーフティの問題に関して作成されている。

ホスフィノスリシン除草剤に耐性をもたらし遺伝子とその酵素に関する一般的な情報について扱う本コンセンサス文書は、ドイツおよびオランダの協力の基にリード国としての米国によって準備された。本文書は、1998年の2回目の再調査の後にOECD加盟国から受領した意見、およびその後の国家調整官からの意見に基づき、改訂された。

化学品委員会と化学品に関するワーキングパーティーとの合同会合で、本文書を公開することが提言された。本文書は、OECDの事務総長の権限のもとに公開されるものである。

¹ 1998年8月、OECDの委員会およびワーキンググループの名称を合理化することがOECDの議会で決定されたことを受けて、「バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和に関する専門家グループ」は、「バイオテクノロジーに関する規制的監督の調和に関するワーキンググループ」に改称された。

目 次

前書き	7
概要	9
第1節 除草剤耐性	10
第2節 除草剤としてのホスフィノスリシン.....	11
第3節 L-PPT 耐性植物の開発.....	13
第4節 L-PPT 耐性をもたらす遺伝子と酵素	16
第5節 植物における導入遺伝子発現の影響	28
第6節 参考文献	21
OECDへの返信アンケート	25

前 書 き

OECD 加盟国は、現在、現代のバイオテクノロジーによる農産物、および工業製品を商業化し、市販している。不必要な貿易障壁を避けるために、これらの生産物を評価する規制的な取り組みについての調和の必要性が確認された。

1993年に、OECD の環境政策委員会と農業委員会の共同プロジェクトとして、**現代のバイオテクノロジーを利用した農産物の商業化**が開始された。本プロジェクトの目的は、現代のバイオテクノロジーを利用した農産物の規制的監督、特に安全性を確実にする取組において各国を支援すること、監督方針をより透明で効果的なものにする、そして貿易を促進することである。本プロジェクトは、これらの農産物の市場参入に影響を与える規制的監督に関して、各国の施策をレビューすることに重要性が置かれている。

本プロジェクトの第一段階として、これらの産物の規制的監督に関する各国の政策についての調査が実施された。さらに、現代のバイオテクノロジーを利用した農産物に必要なとされるデータ、およびデータの評価のためのメカニズムが調査された。これらの結果は、「現代のバイオテクノロジーを利用した農産物の商業化：調査結果（OECD、1995年）」に公開された。

続いて、1994年6月にワシントンDC において、OECD ワークショップが開催された。その目的は、バイオテクノロジーによる農産物に関して策定された規制的監督のさまざまなシステムについて認識を向上させ理解を深め、さまざまな取り組みにおける類似点と相違点を確認し、これらの取り組みの調和に向けたOECD の最も適切な任務を確認するものであった。このワークショップには、16の OECD 加盟国、8の非加盟国、欧州委員会、およびいくつかの国際機関を代表する、環境バイオセーフティ、新規食品の安全性、および種子の品種証明分野の専門家約80名が参加した。また、「現代のバイオテクノロジーを利用した農作物の商業化に関する OECD ワークショップ報告」が、1995年にOECD により公開された。

調和に向けての次の段階として、バイオテクノロジーにおける規制的監督の調和に関するワーキンググループが、加盟国間で**相互に認められるコンセンサス文書**の作成に着手した。これらの文書の目的は、各国間での情報の共有化を促進し、取り組みの重複を防ぐために、現代のバイオテクノロジーを利用して開発された新植物品種の安全性評価における共通要素を記述することである。これらの共通要素は、次の3つの一般的なカテゴリーに分類される。すなわち、宿主となる植物種または作物の生物学、新たな形質をもたらす導入遺伝子と遺伝子産物、そして植物にもたらされる特定の遺伝的な形質の導入によって生ずるバイオセーフティの問題である。

本コンセンサス文書は、規制的なリスク評価に関連する可能性のある最新情報の「スナップショット」である。これは、規制当局のみならず、産業界、研究や製品開発を実施する人々にとって、一般的な指針および参考文献として役立つものと思われる。

新たな形質をもたらす遺伝子および産物に係る本コンセンサス文書および本シリーズのその他の文書は、植物の種の生物学に関するコンセンサス文書、および一般的な形質を植物中で利用することから生ずるバイオセーフティの問題に関しての情報を提供するその他の文書とともに、遺伝子組換え植物のバイオセーフティの評価に役立てられていくものと期待される。

近年出版された OECD の他の2つの出版物もまた、参考になるであろう。「伝統的な作物育種：現代のバイオテクノロジーの役割を評価するベースラインとしての歴史的再考」には、17種の作物に関する情報が掲載されており、遺伝資質の移動にあたっての植物防疫に関する考慮事項、および作物の最新の最終用途に関する項が含まれている。さらに、最新の育種手法についての詳細な項も含まれている。「バイオテクノロジーに関する安全性の考慮：作物のスケールアップ」には、植物育種に関する背景が記載され、スケールに依存する効果について論じられ、「新たな形質」を有する植物の放出に関連するさまざまな安全性の問題が指摘されている²。

科学的発展、および技術的発展が考慮されることを確実にするため、OECD 加盟国は、コンセンサス文書が定期的に更新されることに合意しています。各コンセンサス文書の主題に関連する追加の分野は、更新の際に考慮されます。

このため、本文書の利用者に OECD への新たな科学的情報および技術的情報の提供、ならびに今後考慮すべき追加の分野に関する提言をお願いします。

返送先を記した簡単なアンケートが本文書の最後に添付されていますので、依頼情報を、記載された住所のひとつに OECD 宛てご送付ください。

² これらに関する詳細な情報および他の OECD の出版物については、OECD 出版物サービス, 2 rue André-Pascal, 75775 Paris Cedex 16, フランス . Fax: (33) 01.49.10.42.76; E-mail: Pubsinq@oecd.org までご連絡頂くか、<http://www.oecd.org> をご参照ください。

さらに、<http://www.oecd.org/ehs/service.htm> のバイオトラックオンラインウェブページをご覧ください。

概 要

本文書は、ホスフィノスリシン耐性遺伝子組換え植物を構築するために利用されてきた遺伝子の起源、それらがコードする酵素の性質、およびその酵素が植物の代謝におよぼす影響について、利用可能な情報を要約する。

本文書の範囲：OECD 加盟国は、本文書の内容を導入遺伝子およびその結果としてホスフィノスリシン耐性を植物にもたらす酵素についての考察に限定することに合意した。本文書は、グルホシネート耐性植物を用いた科学実験すべての辞書的な解説を目的とするものではない。さらに、本文書は除草剤ホスフィノスリシンそのもの、あるいは農業やその他に本除草剤を活用する際に利用可能な情報の価値について考察するものでもない。グルホシネートアンモニウム耐性植物へのグルホシネートアンモニウム使用に関する食品の安全面については、本文書では考察されていない。関連情報は、この除草剤の使用を規制する個別の政府機関を含め、他の情報源から入手が可能である。

本文書は、ホスフィノスリシン耐性の付与に関係する遺伝子および酵素に重点を置いているが、ホスフィノスリシン耐性の導入が想定される特定の植物種について言及するものではない。ホスフィノスリシン耐性植物の栽培に関連するあらゆる問題、またはホスフィノスリシン耐性植物から他の作物、または野生近縁種への遺伝子の伝播に関する潜在性、または潜在的な影響に関連する問題は、本文書の同意の範囲を越えるものである。しかしながら、新たにホスフィノスリシン除草剤耐性を有する植物に対してバイオセーフティに関する評価を行う場合、特定の植物種の生物学に関するコンセンサス文書（本文書の最初にある出版物のリストを参照のこと）とあわせて、本文書が用いられるべきである。

第1節 除草剤耐性

多くの除草剤は、植物中での酵素作用を阻害することによって植物を枯死させる。酵素は、植物の代謝を構成するさまざまな反応を触媒するタンパク質である。除草剤には、植物中で鍵となる代謝反応を触媒する単独の酵素に影響を及ぼすものがある。一般的に、植物は農業に利用される除草剤に対してさまざまな感受性を示し、ある除草剤に対して相当な耐性を示す種も存在する。除草剤の暴露に対し、植物が耐性を示しうるいくつかの機構が存在する。すなわち、(1) その植物が、除草剤を解毒する酵素を産生する、(2) その植物が、除草剤の作用を受けない改変された標的酵素を産生する、または(3) その植物が除草剤の植物組織および細胞内への取り込みを妨げる物理的な、または生理的な障壁物を産生することである (Devine 他、1993年)。

植物が酵素 (ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ、PAT) の産生を可能とするために、細菌由来の2種の遺伝子 (*pat* または *bar*) のひとつを導入する遺伝子組換え技術によって、さまざまな植物種 (第5節参照) にホスフィノスリシン耐性がもたらされてきた。植物細胞内でのPATの発現により、除草剤 (ホスフィノスリシンの L 型異性体) である L-PPT が解毒され、それによって、植物が L-PPT に対して耐性を示すこととなる。本文書は、これらの遺伝子の源、それらがコードする酵素の性質、および導入遺伝子の植物中での発現による影響について利用可能な情報を要約する。最後に、読者がOECD バイオトラックオンラインウェブサイトを訪れ、小規模の野外試験中に公開されたホスフィノスリシン耐性植物の最新の状況 (<http://www.olis.oecd.org/biotrack.nsf>)、および、市販が認められている組換え植物の最新の状況 (<http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>) を知ることが推奨される。

第 2 節 除草剤としてのホスフィノスリシン

除草剤ホスフィノスリシン

ホスフィノスリシンは、アミノ酸の 4-[ヒドロキシ-(メチル)ホスフィノイル]-D、L-ホモアラニンである。ホスフィノスリシンの L 型異性体 (L-PPT) は、広域な雑草防除剤として広く利用されており、多くの国において除草剤として登録されている。D 型異性体である D-PPT は、除草剤としての活性を示さない。L-PPT は、除草剤グルホシネートアンモニウムの活性成分である。グルホシネートアンモニウムは、PPT の D 型、L 型異性体の等モル・ラセミ混合物である。D-PPT には除草活性がないが、L-PPT は感受性のある植物のグルタミン合成を阻害し、致死量のアンモニアが蓄積される。L-PPT は、広範囲の植物種に除草活性があるため、非選択性除草剤とみなされている。他の植物と比べ、より強い感受性を示す植物種もある。除草剤ホスフィノスリシンの特性、およびその利用に関する追加的な情報は、ホスフィノスリシンの利用を管理する政府当局から入手が可能である。例えば、米国環境保護庁は、除草剤使用を管理しており、インターネット上で利用可能なホスフィノスリシン (グルホシネートアンモニウム) に関する衛生評価情報を整備している (<http://www.epa.gov/ngispgm3/subst/irisbak/0247.htm>)。

微生物による L-PPT の産生

Streptomyces 属、および *Kitasatosporia* 属の種は、アミノ酸 L-PPT を合成することが報告されている唯一の生物である。これらの属の種は、グラム陽性で孢子形成をする土壌微生物であり、一般的に放線菌類と呼ばれている (Cross, 1989年, Locci, 1989年)。

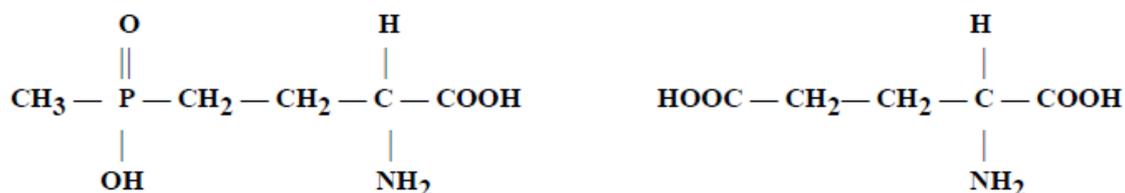
L-PPT は、ビアラフォスおよびホスアラシン2種のトリペプチドのみの成分であることが報告されている (Wild および Ziegler, 1989年, Omura 他, 1984年)。ビアラフォスは、*Streptomyces hygroscopicus* および *S. viridochromogenes* によって天然に産生されるトリペプチド (ホスフィノスリシル-L-アラニル-L-アラニン) である。ビアラフォス分子は、L-PPT および 2個のアラニンから成る。ホスアラシンは、*Kitasatosporia phosalacinea* によって産生されるトリペプチド (ホスフィノスリシル-L-アラニル-L-ロイシン) である (Takahashi 他, 1984年)。ペプチダーゼ活性により、容易にペプチド結合が分解され、ビアラフォスまたはホスアラシンいずれからも L-PPT が遊離される (Thompson 他, 1987年, Wild および Ziegler, 1989年, Omura 他, 1984年)。

L-PPT は、いくつかの市販除草剤の活性成分である。L-PPT は、ビアラフォスを産生する発酵培養、あるいはグルホシネートアンモニウムの化学合成によって得ることが可能である。グルホシネートアンモニウムは、L-PPT および D-PPT の等モルラセミ混合物である。現在、ホスアラシンを利用した市販除草剤は存在しない。

L-PPT 除草剤の作用機序

L-PPT を主成分とする除草剤は、広域の植物種に対して活性がある。L-PPT は、グルタミン合成酵素の基質であるグルタミン酸塩の構造類似体である（図1 にL-PPT およびグルタミン酸塩の構造図を並べて表示している）。L-PPT は、グルタミン合成酵素を阻害することによりその除草効果を発揮する（Bayer 他、1972年）。L-PPTは、ATPの存在下でグルタミン合成酵素を不可逆的に阻害する（Devine 他、1993年）。L-PPT がグルタミン合成酵素を阻害すると、植物毒性を示すレベルのアンモニアが植物中に蓄積される（Mifflin および Lea、1976年、Tachibana 他、1986年）。

図1 グルタミン酸塩（右）と比較されるホスフィノスリシンのL型異性体（左）



グルタミン合成酵素は、真核生物、原核生物のいずれにおいても、グルタミン酸およびアンモニアからのアミノ酸グルタミンの合成に関与する酵素である。これは、無機窒素を有機化合物に同化する経路の最初の反応である。植物において、グルタミン合成酵素は、細胞内の細胞質およびプラスチド内に局在し得る多型のアイソザイム型として存在する。さらに、さまざまなアイソザイム型が、特定の植物組織、または植物器官において優勢に認められる（McNally 他、1983年）。植物の根におけるグルタミン合成酵素の主要な役割は、アンモニアを同化することである。しかしながら、葉のグルタミン合成酵素は、主にアンモニアの再同化および解毒作用に関与する（Shah 他、1986年、Kishore および Shah、1988年）。グルタミン合成酵素は、光呼吸、硝酸塩還元、およびアミノ酸分解によって放出されるアンモニアの解毒が可能な、植物中での唯一の酵素である。

L-PPT の作用機序に関する科学者の理解が深まるにつれ、除草剤への暴露に対し耐性である植物を開発するためのいくつかの方策が考え出されてきた。最も卓越したふたつの方策は、（1）L-PPT による阻害に対して非感受性であるグルタミン合成酵素の改良型を特定すること、そして（2）L-PPT の除草活性の不活化を目的とした酵素をコードする遺伝子を導入すること、である。1番目の方策も試みられたが（AgrEvo、1994年）、現在までにL-PPT に対する耐性をもたらすことに成功しているのは、2番目の方策によってのみである。

第3節 L-PPT 耐性植物の開発

「従来の」植物育種技術

今日まで、植物育種家は、いわゆる「従来の」植物技術を利用して L-PPT 耐性作物を開発することには成功していない。歴史的に、植物育種家はその作物自身、または近縁種の遺伝資源のコレクションから望ましい特性の同定を試みてきた。その望ましい特性が交配を経て作物にもたらされる。それらの内には、成功を収めるために、人の介入を必要とする場合もある。

もうひとつの方法として、遺伝資源のコレクション中に望ましい特性が見い出されない場合、植物育種家は、変異株を作り出すために化学物質、または放射線で誘発させた突然変異を利用してきた。それらの変異株は有効性と農業形質により評価される。この技術は、除草剤の「標的」となるその植物の酵素（すなわち、除草剤が阻害する酵素）をわずかに改変することに依存している。従って、その突然変異によって、依然として機能を有するが、除草剤に対する感受性を失っている標的酵素が作り出されることになる。この方法は、イミダゾリノン系除草剤およびスルフォニル尿素系除草剤に対し、感受性を持たないアセト乳酸シンターゼを作り出すトウモロコシ、およびダイズ品種の開発において成功した（Saari および Mauvais、1996年、Shaner 他、1996年）。除草剤耐性植物の作成技術に関する概説に関心のある読者は、Dyer（1996年）を参照するとよいだろう。

このような突然変異誘発、および選抜技術を利用する試みもまた、作物種での実用的なレベルの L-PPT 耐性を生み出すことには失敗した。これらには、L-PPT に阻害されないグルタミン合成酵素を有するトウモロコシを獲得するという長年の試みの失敗が含まれている（AgrEvo、1994年）。

遺伝子組換え技術

過去10年間、遺伝子組換え技術は、L-PPT 耐性をさまざまな作物種にもたすために、成功裡に利用されてきた（以下参照）。この方法を利用し、L-PPT を解毒する酵素であるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（PAT）をコードする2種の細菌遺伝子（pat または bar）のうちの1種を用いて植物の遺伝子組換えが行われた。遺伝子組換え植物中での PAT 発現は、次の3つの異なった方法に利用されてきた。すなわち、（1）作物生産のために、農業的に有用なレベルの L-PPT 耐性をもたすこと、（2）実験室内および野外において使用できる選択可能な遺伝特性（マーカー）を供給すること、または（3）遺伝的な雄性不稔システムと連動する選択可能な遺伝的特性を供給することである。

【農学的利用のための L-PPT 耐性】 PAT を発現するように改変されたいくつかの植物においては、L-PPT に対する耐性は、栽培者による作物の栽培に農学

的に利用されるであろう。このような遺伝子組換え L-PPT 耐性植物の例としては、政府当局によって最初に認可された L-PPT 耐性植物であるセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) HCN92 系統がある。HCN92 系統は、1995年、カナダにおいて、非限定放出、および食物と家畜飼料の利用に関して、カナダの機関によって認可された(カナダ農務農産食品省、1995年a、1995年b、1996年a、1996年b)。それ以降、他の遺伝子組換え L-PPT 耐性作物の系統が、関係する政府の規制当局を通じて認可されてきた。

OECD の「バイオトラックオンライン」データベース

(<http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>) が このような承認についての最新のリストを整備している。

[選抜マーカーとしての L-PPT 耐性] *pat* または *bar* 遺伝子を用いて操作した植物には、その遺伝子が選抜マーカー遺伝子としての機能を果すものもある。そのような植物では、農学的に有用なレベルの L-PPT 耐性を発現することは必須ではない。実験室において、マーカー遺伝子は目的とする組換え体の選抜を可能とするため、それらはしばしば、遺伝子組換え植物の開発に利用される。さらに、L-PPT に対する耐性は、野外においても選抜マーカーとしての利用が可能である。Vasil (1996年) は、植物の種によっては、植物の組換えDNA研究の当初から利用されてきたカナマイシン耐性の選抜マーカーよりも、L-PPT 耐性の発現のほうが有益であったと述べている。選抜マーカー形質としての (*bar* 遺伝子によってもたらされた) L-PPT耐性を利用した最初の遺伝子組換え植物に対し、1995年 (USDA、1995年)、米国において最終的な承認が成された。

[雄性不稔システムの一部として選択に用いられる L-PPT 耐性]

L-PPT による遺伝子組換えは、単独もしくは他の遺伝子と併に用いることが可能である。この例には、PAT 発現が、Fハイブリッド植物品種の開発に利用可能な、遺伝子操作による雄性不稔システムの一部でもある場合をあげることができる (Mariani 他、1990年)。このシステムでは、花粉の生成を妨げる遺伝子とPAT 発現をもたらす選抜マーカー遺伝子を連結させた遺伝的構築物を用いて、植物の遺伝子組換えが行われる。従って、組換え植物でのPAT 発現により、植物育種家はハイブリッド種子を生成するための実用システムの一部として、L-PPT を使用することが可能となる。1996年、この雄性不稔システムによって作出された組換えトウモロコシの系統が、米国において市販に先立ち、認可された (<http://www.aphis.usda.gov/biotech> に米国農務省の情報が掲載されている)。このような遺伝子組換え雄性不稔システムは、現在、セイヨウナタネ、チコリ、およびトウモロコシにおいて、品種の開発および種子生成のために利用されている。

さまざまな植物品種が *pat* 遺伝子、または *bar* 遺伝子のいずれかを用いて作出され、それらの多くの植物が野外条件下での生産力を評価するために、小規模の野外試験において栽培されてきた。1997年現在、それらには以下のものが含まれる。すなわち、*Agrostis palustris* (クリーピングベントグラス)、*Avena sativa* (エンバク)、*Arachis hypogaea* (ラッカセイ)、*Beta vulgaris* (テンサイ)、*Brassica oleracea* (ワイルドキャベツ)、*Chichorium intybus* (チコリ)、*Daucus carota* (ニンジン)、*Festuca arundinacea* (トールフェスク)、*Gossypium hirsutum* (ワタ)、*Hordeum vulgare* (オオムギ)、*Lycopersicon esculentum* (トマト)、*Medicago sativa* (アルファルファ)、*Gladiolus* sp. (グラジオラス)、*Cucumis melo* (メロン)、*Populus* spp. (ポプラ)、*Solanum tuberosum* (ジャガイモ)、*Brassica napus* (セイヨウナタネ)、*Oryza sativa* (イネ)、*Glycine max* (ダイズ)、*Sorghum bicolor* (ソルガム)、*Saccharum officinarum* (サトウキビ)、*Nicotiana tabacum* (タバコ)、*Triticum aestivum* (コムギ) および *Zea mays* (トウモロコシ) である。

いくつかの国々は遺伝子組換え植物の野外試験、および非限定放出を規制する政府機関を有している。OECD 加盟国におけるこのような植物についての情報は、関心のあつるすべての人に利用可能である。インターネットで利用可能なデータベースは、最新かつ正確な情報を提供するために、定期的に更新されている

(<http://www.oecd.org/ehs/service.htm>)。

第4節 L-PPT 耐性をもたらす遺伝子と酵素

遺伝子の供与生物

放線菌類のふたつの種である、*Streptomyces viridochromogenes* および *S. hygroscopicus* は、L-PPT に対する耐性をもたらすために植物の形質を変化させる遺伝子の源である (Thompson 他、1987年, Kumada 他、1988年, Hara 他、1991年)。*Streptomyces* のこれらの種は、腐生性の土壤微生物であり、植物、ヒト、または他の動物に対する病原菌とは考えられていない (Locci、1989年, Cross、1989年)。

PAT 酵素をコードする遺伝子 (PATs) は、*S. viridochromogenes* および *S. hygroscopicus* から単離された。*S. hygroscopicus* では、PAT は *bar* (ピアラフオス耐性) 遺伝子によってコードされており、一方、*S. viridochromogenes* では、PAT は *pat* 遺伝子によってコードされている (*bar* によってコードされる PAT を BAR と呼ぶ研究者もある)。*pat* および *bar* 遺伝子は非常に類似しており、ヌクレオチド配列のレベルで 87% の相同性がある (Wohlleben 他、1988年, 1992年)。*pat* および *bar* によってコードされるそれぞれの PAT 酵素も非常に類似しており、アミノ酸のレベルで 85% の相同性がある (Wohlleben 他、1988年, 1992年)。最近、Wehrmann および共同研究者 (1996年) は、*pat* および *bar* によってコードされる PATs の詳しい特性に関する結果を報告した。彼らは、*bar* および *pat* によってコードされる PATs が L-PPT 耐性をもたらすという用途において機能的に同等であるとの判断を下している。

植物中での発現を可能とするための天然遺伝子の改変

植物中での *pat* および *bar* の効率的な発現を達成するため、植物中への遺伝子導入に先立って微生物を起源とする遺伝子のコドン使用パターンを改変することが研究者によって一般的に行われている。*Streptomyces* spp. から単離された *bar* および *pat* 遺伝子は、植物遺伝子と比較して相対的に G-C 含量が高く、結果として、植物中ではこの天然の微生物遺伝子は効率的に発現されない。この場合において、天然の *Streptomyces* 遺伝子のコドン使用パターンが植物への導入に先立って改変され、このことにより、発現レベルが増加した。得られる PAT のアミノ酸配列には変化がない (Eckes 他、1989年, USDA 1995年)。

細菌由来の遺伝子には、植物での発現が可能となる適切なプロモーター、エンハンサー、イントロン、およびターミネーターといった調節塩基配列の改変が必要である。これらの調節塩基配列は、アミノ酸をコードしておらず、従って PAT 酵素のコーディング領域には影響しない。植物中での導入遺伝子の発現を達成させる調節塩基配列の利用に関する詳細な考察は本文書では割愛する。

PAT 酵素活性の特異性

bar および *pat* によってコードされるPAT 酵素はいずれも、以下の通りである。すなわち、(1) L-PPT 耐性をもたらすという用途において、機能的に同等であり、(2) それらの基質に対して非常に特異的である (Wehrmann 他、1996年)。補助基質であるアセチル-CoA 存在下において、PAT は、L-PPT の遊離アミノ基のアセチル化を触媒し、N-アセチル-L-PPT を生成する。N-アセチル-L-PPT は、グルタミン合成酵素を不活性化しない。PAT 酵素は両者とも、L-PPT に対し非常に特異的であり、他の L 型アミノ酸や、D-PPT をアセチル化することがない (Wehrmann 他、1996年, AgrEvo、1994年)。L 型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PATs は両者とも、L-PPT をアセチル化するそれ自身の活性に影響を受けることはない (Wehrmann 他、1996年)。

比較的高いレベルの PAT 発現を行う L-PPT 耐性植物での L-PPT 異化作用による主要な代謝残留物は、N-アセチル-ホスフィノスリシンである (Droege-Laser 他、1994年)。PAT 発現が低い場合、L-PPT の分解経路は、L-PPT 感受性植物中に認められる代謝残留物、すなわち 4-メチル-ホスフィニコ-2-ヒドロキシ-ブタン酸、および 3-メチルホスフィニコ-プロピオン酸を生成する可能性がある (Droege-Laser 他、1994年)。

第 5 節 植物における導入遺伝子発現の影響

いずれの除草剤耐性植物もその生活環において、除草剤に暴露されることは極めて稀である。活性のある除草剤 L-PPT が除草剤耐性植物に散布される場合、その植物はPAT 活性により、L-PPT を自身に対して無毒化することが可能である。PAT 酵素は、ホスフィノスリシン (L-PPT) をアセチル化して不活性化化合物にし、解毒する。遺伝子組換えセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の代謝に関する研究により、L-PPT が無毒性の代謝物である N-アセチルグルホシネートに迅速に変換されることが示された (欧州委員会 1998年)。また、PAT は、L-PPT およびデメチルホスフィノスリシン (DMPT) に対して極めて高い基質特異性を有することが報告されている (Thompson 他、1987年) が、L-PPT の類似物である L-グルタミン酸、D-PPT、あらゆるタンパク質、またはアミノ酸のアセチル化は不可能であることを実験データが示している (Wehrmann 他、1996年、カナダ農務・農産食品省、1995年a、1995年b)。

このような作物は、*pat* または *bar* 遺伝子のいずれによって作出した場合にも、農業生産力はその親の植物と類似していたため、PAT の発現は植物の生長に対して有害ではない。これらの結論は、L-PPT 耐性の *Chichorium intybus* (チコリ)、*Brassica napus* (セイヨウナタネ) および *Zea mays* (トウモロコシ) の商業化に先立ち、カナダ、欧州連合、および米国の規制当局によって公開された決定文書に記述されている。ホスフィノスリシン耐性植物に関係する決議についての情報は、以下のサイトで参照できる。

<http://www.olis.oecd.org/bioprod.nsf>

http://www.cfia-acia.agr.ca/english/plant/pbo/home_e.html (カナダ)

<http://ss.s.affrc.go.jp/docs/sentan/eguide/commerc.htm> (日本)

<http://www.aphis.usda.gov/biotech/petday.html> (米国)

http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/outcome_en.html (欧州委員会)

近年、植物の多くのアレルギー誘発性成分が特徴付けられてきた。アレルゲンは通常、次のような多くの特性を共有している。すなわち、(1) それらはタンパク質であり、(2) それらは分子量が、10-70キロダルトンの範囲にあり、(3) すべてではないが、それらは一般的にグリコシル化されており、(4) それらは消化 (哺乳動物における消化器官のペプシン消化およびトリプシン消化条件) に対して安定であり、(5) それらは加工に対して安定であり、(6) それらは特定の食物中の主要なタンパク質成分として存在する (Metcalf 他、1996年、FAO/WHO、1996年、Fuchs および Atwood、1996年)。PAT タンパク質は、既知のアレルゲンではない。*pat* および *bar* 遺伝子産物は、SDS-PAGE では 22-23 kD の分子量を示しており、計算分子量である 20.6 kD より多少大きい。ゲルろ過クロマトグラフィーでは、43 kD (ホモ二量体) のピークに活性が示される (Wehrmann 他、1996年)。同著者は、*pat* および *bar* 遺伝子それぞれの産物である PAT および BAR タンパク質がペプシンを用いた胃の模擬条件に曝された場

合、両タンパク質ともに数秒以内に分解され、酵素活性が 5-15 秒の時間枠内でゼロにまで低下することを報告した。

報告されている他の研究では、典型的な哺乳類の胃の条件に曝された場合、本酵素が1分以内に不活性化され、(PAT 酵素を発現する遺伝子組換え *Brassica napus* の) セイヨウナタネ種子が飼料原料に加工される過程で不活性化されることが示された(欧州委員会、1998年)。米国EPA (1997年) は、PAT タンパク質が胃の環境において迅速に分解されること、熱または低 pH によって容易に変性することを示す実験データを報告した。多くの食物アレルギーが生化学的に特徴付けされており、データベースによって、データベース中のアレルギー反応を誘発することが知られているそれらのタンパク質とアミノ酸配列の比較が可能である。対応する遺伝子のヌクレオチド配列が提供されている。GENEBANK DNA データベース(カナダ農務農産食品省、1995年a) およびポリペプチド配列の3つのデータベースを有するインテリジェネティクスの FASTDB アルゴリズム(カナダ農務農産食品省、1995年b) を用いた比較分析によると、PAT 酵素のアミノ酸配列は、異なる生物由来の別のホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼを除き、データベース中にある他のタンパク質との有意な相同性を示さなかった。毒素である可能性のあるもの、またはアレルギーとの類似性は観察されなかった。米国EPA (1997年a) は、「PAT タンパク質が食物アレルギーとなる可能性はごくわずかである」との判断を下した。

タンパク質が毒性を有する場合、それらが非常に低用量レベルで急性の機構を介して作用することが知られている(Sjobald 他、1992年)。ヒトまたは動物のいずれにおいて、PAT 酵素が毒性を持つことを示唆する証拠はない。細菌から生産され、精製された PAT 酵素を使用した14日間の給餌試験において、高レベルのタンパク質(5,050 mg/kg 体重)を強制投与されたマウスは、その処置に関連した有意な毒性効果を示さなかった(米国EPA、1995年)。また、種子食のカナリア(*Serinus canaria domestica*)を用いた鳥の食餌試験、家畜化されたウサギ(*Oryctolagus cuniculus*)を用いた食餌試験が実施された。これらの試験では、PATを生産する遺伝子組換え*Brassica napus* L. (セイヨウナタネ)、または非遺伝子組換えの対照物を与えられた鳥またはウサギの間に、飼料消費量、行動、および体重において違いを示さないことが報告された(カナダ農務・農産食品省、1995年b)。

PAT の毒性に関して、米国EPA は、「PAT タンパク質がヒトに対して無毒であろうという予測を、提出された急性経口投与毒性データが支持している」、と結論づけている。米国において、EPAは、提出された毒性学的データに基づき、すべての植物において、植物農薬成分であるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ(PAT) およびその生産に必要な一般物質の残留許容限界量要求の免除を制定した(米国EPA、1997年b)。

米国、カナダ、日本、および欧州連合における政府の規制当局は、植物中の PAT タ

ンパク質の存在によって、食物、または飼料の消費に関し、それらが安全性を失うことはないとの判断を下している（上記参照のこと）。食品の安全性基準に関する詳細なデータは、公開されているさまざまな政府機関の規制、ガイドライン、および政策綱領から見るることができる。

第 6 節 参考文献

AgrEvo USA. 1994. Petition for a determination of non-regulated status for glufosinate resistant corn(submitted to United States Department of Agriculture, Petition No. 94-357-01P).

[Available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, MD 20737]

Agriculture and Agri-Food Canada, Food Production and Inspection Branch (as of April 1, 1997 the Canadian Food Inspection Agency):

1995a. Decision Document DD95-01: Determination of Environmental Safety of Agrevo Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Canola.

1995b. Decision Document DD95-04: Determination of Environmental Safety of Plant Genetic Systems Inc.'s (PGS) Novel Hybridization System for Canola (*Brassica napus* L.).

1996a. Decision Document DD96-11: Determination of Environmental Safety of Agrevo Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Canola Line HCN28.

1996b. Decision Document DD96-15: Determination of Environmental Safety of Dekalb Canada Inc.'s Glufosinate Ammonium-Tolerant Corn Line DLL25.

Bayer, E., Gugel, K.H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W.A. and Zähler, H. 1972. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-alanyl-alanin. *Helvetica Chimica Acta* 55:224-239.

Cross, T. 1989. Other genera. Pages 2586-2615 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. S.T. Williams, ed. Williams and Wilkins, Baltimore.

Devine, M., Duke, S.O. and Fedtke, C. 1993. *Physiology of Herbicide Action*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 251-294.

Droege, W., Broer, I. and Pühler, A. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187:142-151.

Droege-Laser, W., Siemeling, U., Pühler, A. and Broer, I. 1994. The metabolites of the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate). *Plant Physiology* 105:159-166.

Dyer, W.E. 1996. Techniques for producing herbicide-resistant crops. Pages 37-52 in:

Herbicide-Resistant Crops. S.O. Duke, ed. CRC Press, New York.

European Commission, Directorate General XXIV, Policy and Consumer Health Protection: Scientific Committee on Plants. 1998b. Opinion of the Scientific Committee on Plants Regarding Genetically Modified, Glufosinate-Tolerant Rape Notified by the Agrevo Company (NOTIFICATION C/UK/95/M5/1) (Opinion expressed by the SCP on 14 July 1998).

[Available electronically at http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out03_en.html]

FAO/WHO. 1996. Biotechnology and Food Safety. Rome, Italy, 30 September to 4 October 1996.

[Available electronically at

<http://www.fao.org/waicent/faoinfo/economic/esn/biotech/tabconts.htm>]

Fuchs, R.L. and Astwood, J.D. 1996. Allergenicity assessment of foods derived from genetically modified plants. *Food Technology* 50:83.

Hara, O., Murakami, T., Imai, S., Anzai, H., Itoh, R., Kumada, Y., Takano, E., Satoh, E., Satoh, A., Nagaoka, K. and Thompson, C. (1991) The bialaphos biosynthetic genes of *Streptomyces viridochromogenes*: cloning, heterospecific expression, and comparison with the genes of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of General Microbiology* 137:351-359.

Kishore, G.M. and Shah, D.M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual Review of Biochemistry* 57:627-663.

Kumada, Y., Anzai, H., Takano, E., Murakami, T., Hara, O., Itoh, R., Imai, S., Satoh, A. and Nagaoka, K. (1988) The bialaphos resistance gene (*bar*) plays a role in both self-defence and bialaphos biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Antibiotics* 41:1838-1845.

Locci, R. 1989. Streptomycetes and Related Genera. Pages 2451-2508 in: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.

Mariani, C., De Beuckeler, M., Truettner, J., Leemans, J. and Goldberg, R.B. 1990. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347:737-741.

Mariani, C., Gossele, V., De Beuckeler, M., De Block, M., Goldberg, R.B., De Greef, W. and Leemans, J. 1992. A chimeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384.

McNally, S.F., Hirel, B., Gadal, P., Mann, A.F. and Stewart, G.R. (1983) Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiology* 72:22-25.

Metcalf, D.D., Astwood, J.D., Townsend, R., Sampson, H.A., Taylor, S.L. and Fuchs, R.L. 1996. Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Pages S165-S186 in: Critical Reviews in Food Science and Nutrition (special supplement), F.M. Clydesdale, ed., vol. 36.

Mifflin, B.J. and Lea, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15:873- 885.

Shah, D., Horsch, R., Klee, H., Kishore, G., Winter, J., Tumer, N., Hironaka, C., Sanders, P., Gasser, C., Aykent, S., Siegel, N., Rogers, S. and Fraley, R. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233:478-481.

Shaner, D.L., Bascomb, N.F. and Smith, W. 1996. Pages 143-158 in: *Herbicide-Resistant Crops*. S.O. Duke, ed. CRC Press, New York.

Sjoblad, Roy D., et al. 1992. Toxicological Considerations for Protein Components of Biological Pesticide Products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 15, 3-9.

Tachibana, K., Watanabe, T., Sekizawa, Y. and Takematsu, T. (1986) Accumulation of ammonia in plants treated with bialaphos. *Journal of Pesticide Science* 11:33-37.

Takahashi, Y., Iwai, Y. and Omura, S. 1984. Two new species of the genus *Kitasatosporia*, *Kitasatosporia phosalacinea*, sp. nov. and *Kitasatosporia griseola*, sp. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 30:377-387.

Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M. and Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6:2519-2523.

United States Department of Agriculture. 1995. Environmental Assessment and Determination of Nonregulated Status - Petition Number 94-357-01P (for glufosinate resistant corn).

[Available from USDA-APHIS, Unit 147, 4700 River Road, Riverdale, Maryland 20737, or electronically at <http://www.aphis.usda.gov/bbep/bp/>]

United States Environmental Protection Agency. 1997a. Phosphinothricin Acetyltransferase and the Genetic Material Necessary for Its Production in All Plants - Exemption From the Requirement of a Tolerance on All Raw Agricultural Commodities. *Federal Register*: April 11, 1997, Volume 62, No. 70, pp. 17717-17720.

[Available electronically at <http://www.wais.access.gpo.gov>]

United States Environmental Protection Agency. 1997b. Glufosinate Ammonium - Tolerances for Residues. Federal Register: February 5, 1997, Volume 62, No. 24, pp. 5333-5338.

[Available electronically at <http://www.wais.access.gpo.gov> (DOCID:fr05fe97-10)]

Vasil, I.K. 1996. Phosphinothricin-resistant crops. Pages 85-92 in: Herbicide-Resistant Crops. S.O. Duke, ed. CRC Press, New York.

Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J. and Schulz, A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14:1274-1278.

Wohlleben, W., Arnold, W., Broer, I., Hillermann, D., Strauch, E. and Pühler, A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin N-acetyltransferase gene from *Streptomyces* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.

Wohlleben, W., Alijah, R., Dorendorf, J., Hillerman, D., Nussbaumer, B. and Pelzer, S. 1992. Identification and characterization of phosphinothricin-tripeptide biosynthetic genes in *Streptomyces viridochromogenes*. Gene 115: 127-132.

QUESTIONNAIRE TO RETURN TO THE OECD

This is one of a series of OECD Consensus Documents that provide information for use during regulatory assessment of particular micro-organisms, or plants, developed through modern biotechnology. The Consensus Documents have been produced with the intention that they will be updated regularly to reflect scientific and technical developments.

Users of Consensus Documents are invited to submit relevant new scientific and technical information, and to suggest additional related areas that might be considered in the future.

The questionnaire is already addressed (see reverse). **Please mail or fax this page (or a copy) to the OECD, or send the requested information by E-mail:**

**OECD Environment Directorate
Environmental Health and Safety Division
2, rue André-Pascal
75775 Paris Cedex 16, France
Fax: (33) 01 45 24 16 75
E-mail: ehscont@oecd.org**

For more information about the Environmental Health and Safety Division and its publications (most of which are available electronically at no charge), consult <http://www.oecd.org/ehs/>

- =====
1. Did you find the information in this document useful to your work?
 Yes No
 2. What type of work do you do?
 Regulatory Academic Industry Other (please specify)
 3. Should changes or additions be considered when this document is updated?

 4. Should other areas related to this subject be considered when the document is updated?

Name:
Institution or company:
Address:
City:Postal code: Country:
Telephone:Fax: E-mail:
Which Consensus Document are you commenting on?

FOLD ALONG DOTTED LINES AND SEAL

PLACE STAMP HERE

**OECD Environment Directorate
Environmental Health and Safety Division
2, rue André Pascal
75775 Paris Cedex 16
France**

原本は OECD により下記のタイトルにより、英語で出版されたものである：

Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11
CONSENSUS DOCUMENT ON GENERAL INFORMATION CONCERNING
THE GENES AND THEIR ENZYMES THAT CONFER TOLERANCE TO
PHOSPHINOTHRICIN HERBICIDE

©1999 全ての権利は OECD に保持されている。

© 2009 日本語編は日本の環境省が OECD（パリ）の了解を得て作成した。
日本語訳の質及び原文との整合性についての責任は、環境省にある。