資料5－5

「除草剤グリホサート耐性ワタGHB614系統」に係る安全性確認（案）

Ⅰ　はじめに

除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 系統（以下「GHB614」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耐性ワタGHB614系統
性　質：除草剤グリホサート耐性
申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社
開発者：Bayer CropScience

GHB614系統は、ワタ（*Gossypium hirsutum* L.)にトウモロコシ（*Zea mays* L.）由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（*epsps* 遺伝子）を２アミノ酸改変した*2mepsps*遺伝子を導入したワタである。

2mepsps 遺伝子により、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS たん白質）が発現し、除草剤グリホサートに耐性をもつとされている。

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

宿主に用いられた植物は、アオイ科（Malvaceae）、ワタ連（*Gossypieae*）、ワタ属（*Gossypium*）に属するワタ(*Gossypium hirsutum* L.)である。GHB614 に導入された*2mepsps*遺伝子は、トウモロコシに由来する。

（2）家畜等の安全な飼養経験に関する事項

綿実及び綿実油粕は、家畜等の飼料として広く使用されており、家畜等の優良なたん白質源となっている（参考文献1）。

（3）飼料の構成成分等に関する事項

宿主植物であるワタ及び GHB614 における、主要構成成分（たん白質、脂質、食物繊維、灰分、炭水化物）及び毒性物質・抗栄養素（ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸）の量は明らかになっている（参考文献2）。

（4）既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

GHB614 と既存のワタとの相違は、GHB614 が 2mEPSPS たん白質の発現により、除草剤グリホサートの影響を受けずに生息できる点のみである。これらの点を除けば、GHB614は既存のワタと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、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既存のワタと相違はない。

以上（1）～（4）により、GHB614 の飼料としての安全性を評価するために、既存のワタ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

GHB614 系統は、2mEPSPS たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートを散布されても影響を受けず生育することができる。そのため、雑草のみを効率的に防除することが可能となる。また、広い殺草スペクトラムを有するグリホサートを利用することにより、散布する除草剤の量が抑えられるため、環境負荷を軽減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、アオイ科（Malvaceae）、ワタ連（*Gossypieae*）、ワタ属（*Gossypium*）に属するワタ（*Gossypium hirsutum* L.）の商業品種 Coker312 である（参考文献 3）。

（2）遺伝的先祖に関する事項

栽培ワタの起源について完全に明らかにされていないが、新・旧大陸の各地で別々に作物化されたと考えられている。ワタ属は 46 種からなり（参考文献 4）、そのうち 4 種が一般的に栽培されている（参考文献 5）。栽培種としては、旧大陸の 2 倍体種（2n=2x=26）の *G.herbaceum* 及び *G.arboreum*、新大陸の 4 倍体種（2n=4x=52）の *G.hirsutum* 及び *G.barbadense* が挙げられるが、現在、最も重要な商業用ワタとされているのは新大陸の 2 種である（参考文献 6）。

（3）有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタは、ゴシポールやシクロプロペン脂肪酸を生産することが知られている。

ゴシポールは多くのワタ属で認められるテルペン類化合物であり（参考文献 7）、結合型と遊離型がある。結合型は有害性を示さないが、遊離型のゴシポールは単胃動物に対する毒性が強い。従って、綿実由来の食品及び飼料では、ゴシポール濃度を最小限に抑える必要がある。（参考文献 8、9、10）。

シクロプロペン脂肪酸は、ワタ特有の脂肪酸であり、ステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害する。鶏卵の卵黄膜の脆弱化や変色を引き起こすことから、産卵鶏に不給与とされる等、家畜により給餌量が制限されている（参考文献 10、11、12）。これらの脂肪酸は、製油工程を経た後では著しく減少する（参考文献 11、13）。

（4）寄生性及び定着性に関する事項

ワタが家畜等に寄生又は定着するという報告はされていない。

（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

ワタに感染する病原体は知られているが（参考文献 14）、家畜等に対する病原性は報告されていない。

（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

栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできず、雑草化しないことが報告されている。また、我が国においてもワタの自生は報告されていない（参考文献15、16、17）

（7）有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ワタは一年生の短日植物で、自家受粉により繁殖する（参考文献 18）。ワタの花粉は、重く粘性があるので、普通の環境下では風媒ではなく虫媒により繁殖する（参考文献 5）。また、栽培ワタと交雑するワタ以外の植物は確認されていない。

（8）飼料に利用された歴史に関する事項

ワタ属（*Gossypium*）は繊維を得るために数千年間栽培されている。綿実はかつて大部分が廃棄された農産物であるが、現在では、綿実油は食用として、搾油後の綿実油粕は家畜、家禽及び魚の飼料として利用されている。

綿実は収穫された後、綿繰り機で綿毛（長繊維綿毛：リント）を取り除いて脱綿毛綿実となり、洗浄後、短い繊維（リンター）を除去する籾摺機により綿実殻と種子に分離される。種子は粉砕・搾油され、油粕粉末及び綿実殻が得られる。油粕粉末は、成牛や成羊等に対してたん白質濃厚飼料の原料として利用されている。また、豚及び鶏の飼料には、適切な量で配合される。また、綿実殻は栄養価が少なくかさの多い成分であるが、良質の干し牧草に匹敵する価値があり、牧草の補充供給物として利用されている（参考文献1）。

（9）飼料の安全な利用に関する事項

上記（3）のとおり、ワタにはゴシポール等の有害生理活性物質が存在することが知られているが、上記（8）のとおり、ワタは利用形態ごとに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

栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできず、雑草化しないことが報告されている。また、我が国においてもワタの自生は報告されていない（参考文献15、16、17）。

（11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタ連（*Gossypieae*）にはゴシポール腺があり、有害物質であるゴシポールが含まれる（参考文献 19）。ワタ連に分類されるワタ属（*Gossypium*）の近縁種には、8 つの属がある。

4　ベクターに関する事項

（1）名称及び由来に関する事項

GHB614 系統の作出には、発現ベクターpTEM2 が用いられた。本ベクターは、pGSC1700 由来の pTYG50 を用いて作成された（参考文献 20）。

（2）性質に関する事項

発現ベクターpTEM2 の塩基数は、11,953bp であり、その塩基配列及び制限酵素による

切断地図は明らかとなっている。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

pTEM2 は、大腸菌（*E.coli*）及び *R.radiobacter*（*A.tumefaciens*）において、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子(*aadA* 遺伝子)を有する。本遺伝子は pTYG50 で形質転換された大腸菌を選抜するマーカーとして用いたものである。また、完全な遺伝子ではないが、カナマイシンやネオマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質に対して耐性を付与する *npt*Ⅰ遺伝子の断片を有する。

（4）伝達性に関する事項

pTEM2 には伝達性因子は含まれていない。

（5）宿主依存性に関する事項

他の植物あるいは家畜等が pTEM2 の宿主となることはない。

（6）発現ベクターの作成方法に関する事項

GHB614 ワタを作出するための発現ベクターpTEM2 は、植物形質転換用ベクターpGSC1700 由来の pTYG50 の T-DNA 反復配列（LB と RB）の間に、*2mepsps* 遺伝子発現カセット（3861 bp）を挿入して作出された（参考文献 20、21、22）。

（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

pTEM2 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により導入した。

5　挿入遺伝子に関する事項

（1）供与体に関する事項

①名称、由来及び分類に関する事項

2mepsps 遺伝子は、トウモロコシから単離された野生型 *epsps* 遺伝子に部位特異的に突然変異を起こし、アミノ酸配列の 102 番目のトレオニンをイソロイシンに、また、106 番目のプロリンをセリンに変化させたものである（参考文献 23、24）。

②安全性に関する事項

トウモロコシは、病原性や毒素産生性に関する報告はなく、長期にわたり食料や飼料として安全に摂取されてきた。また、*2mepsps* 遺伝子が産生する 2mEPSPS たん白質は、由来となるトウモロコシの EPSPS たん白質とのアミノ酸配列上の高い相同性（> 99.5%）を示し、さらに、他の食用作物に含まれる EPSPS たん白質（イネ：相同性 86%、ブドウ：79%、レタス：77%、トマト：75%、セイヨウナタネ：75%）とも同様に高い相同性を有している（参考文献 25）。これらの野生型 EPSPS たん白質は、食料や飼料に含まれる成分としてヒトや動物に安全に摂取されてきた長い歴史があるが、ヒトや動物に対するアレルギー性もしくは毒性に関与していることを示す報告はなされていない。

（２）遺伝子の挿入方法に関する事項

pTEM2 は、pTYG50 の T-DNA 反復配列（LB と RB）の間に、*2mepsps* 遺伝子発現カセット（3861 bp）を挿入して作出された。pTEM2 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によりワタに導入した。グリホサート耐性株から、最優良系統の GHB614 株を選抜した。

（３）構造に関する事項

プロモーターは、*A.thaliana* のヒストン H4 遺伝子に由来する Ph4a748At が用られた（参考文献 26）。

ターミネーターは、*A.thaliana* 由来のヒストン H4 遺伝子の 3’非翻訳領域の塩基配列 3’histonAt を用いた（参考文献 26）。

導入された組換え DNA 断片中の構成遺伝子は、いずれもその由来、性質等が明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない（参考文献 27）。

（４）性質に関する事項

表１にまとめた。

表 1　　挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
2mepsps 遺伝子発現カセット	
Ph4a748At プロモーター	*A.thaliana* 由来のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域（参考文献 26）。
intron1 h3At	*A.thaliana* 由来のヒストン H3.3 遺伝子の第Ⅱ遺伝子の第一イントロン（参考文献 28）。
TPotp C	ヒマワリ（*H.annuus*）及びトウモロコシ（*Z.mays*）の RuBisCo 小サブユニット遺伝子の N-末端にある色素体輸送ペプチド配列を基に作製された配列（参考文献 29）。
2mepsps	トウモロコシ（*Z.mays*）由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（*epsps* 遺伝子）に点突然変異を起こした、改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS たん白質）をコードする遺伝子（参考文献 23、24）。
3'histonAt ターミネーター	*A.thaliana* 由来のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻訳領域（参考文献 26）。

（５）純度に関する事項

挿入された DNA 断片はすべてクローニングされ、その塩基配列が解明されており、目的外の遺伝子の混入はなく純化されている（参考文献 27）。

（６）安定性に関する事項

GHB614 の挿入遺伝子の安定性を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、挿

入遺伝子が後代世代に安定して遺伝していることが示された（参考文献 30、31）。

（7）コピー数に関する事項

サザンブロット分析を行った結果、プロモーターとターミネーターを含む完全長の 1 コピーの *2mepsps* 遺伝子発現カセットが GHB614 系統に挿入されていることが確認された（参考文献 32）。また、シークエンス解析の結果、GHB614 系統に挿入された DNA は、LB と pTEM2 の 4 塩基及び RB は消失していたが、pTEM2 上の T-DNA 領域の *2mepsps* 遺伝子発現カセット（3978 bp）と完全に一致することが確認された（参考文献 27）。

GHB614 における pTEM2 の T-DNA 領域外配列の有無をサザンブロット分析により確認した結果、T-DNA 領域外配列の挿入はなかった（参考文献 33）。また、遺伝子の組込みが内在性遺伝子の機能に及ぼす影響の有無について、挿入遺伝子の近傍配列のシーケンスを解析し、データベースの相同性検索により確認した結果、既知の機能を有する内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられた（参考文献 34、35、36）。

（8）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

GHB614 における導入遺伝子の発現をノーザンブロット分析により確認した結果、第 2 生育期（4-6 葉期）では葉・茎・根で、第 4 生育期（開花期）では葉・茎・根・生長点・未開花蕾・花粉で発現していることが確認された（参考文献 36）。

GHB614 における 2mEPSPS たん白質の発現量を ELISA 分析により確認した結果、葉においては 11.16 μg/g（2-3 葉期）から 0.45 μg/g（開花期）と経時的に減少した。茎においては 1.94 μg/g（4-6 葉期）から 1.58 μg/g（開花期）と経時的に減少した。根においては 0.99 μg/g（4-6 葉期）から 4.04 μg/g（開花期）と経時的に増加した。未開花蕾、生長点及び花粉における発現量は、それぞれ 5.35、5.47 及び 0.16 μg/g であった（参考文献 37）。未加工農産物（有毛種子）における発現量は、21.2 μg/g（グリホサート処理区）及び 19.2 μg/g（グリホサート未処理区）であった（参考文献 38）。加工農産物における発現量は、長繊維綿毛、短繊維綿毛、加熱処理綿実油粕、粗綿実油及び精製･脱色･脱臭綿実油には検出されなかったが、有毛種子、脱地毛綿実、種子外皮及び綿実油粕において検出され、それぞれ 6.63、102、6.93 及び 0.26 μg/g であった（参考文献 39）。

（9）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクターpTEM2 の T-DNA 領域外には、ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子（*aadA* 遺伝子）及びネオマイシンリン酸基転移酵素 I （*nptI*）遺伝子の断片が存在する。しかし、これらの遺伝子が GHB614 系統に挿入されていないことは、サザンブロット分析により確認されている（参考文献 33）。

（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

遺伝子導入により生じた 2 つの境界領域において、新たに作られたオープンリーディングフレームを検索した。オープンリーディングフレームは、終止コドン（TAA、TAG 又は TGA）に挟まれ、3 アミノ酸以上の長さを持つ領域と定義し、6 つの読み枠（センス鎖 3 つ及びアンチセンス鎖 3 つの読み枠）で、GetORF（EMBOSS: European Molecular

Biology Open Software Site）により検索した。

その結果、5’側境界領域において 8 つ（センス鎖 4 つ、アンチセンス鎖 4 つ）、また、3’側境界領域において 6 つ（センス鎖 3 つ、アンチセンス鎖 3 つ）、計 14 個のオープンリーディングフレームが検出された（参考文献 40）。

GHB614 の葉、茎、根、生長点、未開花蕾及び花粉について、5’側境界領域及び 3’側境界領域のノーザンブロット分析を行った結果、いずれの組織においても転写産物は認められなかった（参考文献 36）。よって、両側の境界領域において検出されたオープンリーディングフレームからたん白質が生ずる可能性は低いと考えられた。

また、検出されたオープンリーディングフレームのアミノ酸配列について、既知の毒素たん白質との相同性について検索した結果、いずれの既知の毒素たん白質との相同性も認められなかった（参考文献 41）。

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

GHB614 系統は、2mEPSPS たん白質の発現により、除草剤グリホサートに耐性を示す。

（2）遺伝子産物の毒性に関する事項

2mEPSPS たん白質の毒性に関して、2mEPSPS たん白質のアミノ酸配列に基づき、BLASTP アルゴリズムを用い、種々のデータベース（Uniprot-Swissprot、Uniprot-TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept）に登録されているたん白質との相同性検索を行った。その結果、種々の種由来の EPSPS たん白質及び他の芳香族アミノ酸合成酵素たん白質、また、種々の種由来の enolypyruvate transferase (EPT)(EC=2.5.1.7, uridine diphosphate (UDP)-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase)のアミノ酸配列との類似性が認められた。しかし、これらのたん白質に関連する毒性は報告されておらず、2mEPSPS たん白質と既知の毒素たん白質との相同性は認められなかった（参考文献 42）。

（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

遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する各試験には、大腸菌で生産した 2mEPSPS たん白質を用いた。大腸菌由来の 2mEPSPS たん白質と実際に GHB614 系統で発現している 2mEPSPS たん白質の同一性に関して、a. Edman 分解による N-末端アミノ酸配列の決定、b. SDS-PAGE による分析、c. ウェスタンブロット分析、d. LC/MS 分析、e. 糖たん白質染色分析、f. 酵素活性の確認により比較し、確認した（参考文献 43）

①人工胃液に対する感受性

2mEPSPS たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析で確認した結果、反応開始 0.5 分間後には 2mEPSPS たん白質は検出されなくなった（参考文献 44）。

②人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

2mEPSPS たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、ウエスタンブロット分析で確認した結果、反応開始 0.5 分間後には 2mEPSPS たん白質は検出されなくなった（参考文献

45）。

③加熱処理

2mEPSPS たん白質の酵素活性を 20℃から 75℃の間で測定したところ 20℃から 60℃までほぼ直線的に増加が認められたが、60℃以上では急激に減少し、75℃で EPSPS たん白質ともに完全に失活した。2mEPSPS たん白質は 60℃、10 分間の加熱処理で完全に失活した（参考文献 46）。加熱処理による影響（60℃から 90℃下で 10 分間から 60 分間処理）を SDS-PAGE 分析により確認した結果、90℃、60 分間処理区においても 2mEPSPS たん白質が検出され、加熱処理による凝集が生じる可能性が示唆された（参考文献 47）。

（4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS たん白質は、芳香族アミノ酸及び他の芳香族化合物の合成経路となるシキミ酸経路において、ホスホエノールピルビン酸（PEP）とシキミ酸-3-リン酸（S3P）を結合し、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸（EPSP）を生成する反応を触媒する。除草剤の有効成分であるグリホサートは PEP 結合部位に競合的に結合して酵素-基質複合体中間体の生成を阻害することにより、この反応を阻害する（参考文献 48）。一方、2mEPSPS たん白質は、グリホサートによる阻害作用を受けることなく EPSP 生成反応を触媒することができる。

EPSPS たん白質及び 2mEPSPS たん白質の、PEP 及び S3P との親和性を分析した結果、*K*m 値はほぼ同等であった。グリホサートの PEP に対する 50%阻害濃度を測定した結果、2mEPSPS たん白質は EPSPS たん白質と比べ、約 190 倍高くなった。このことから、PEP 及び S3P の結合部位に変化はなく、EPSPS たん白質及び 2mEPSPS たん白質は同じ基質特異性を保有しながら、それ以外の部位に変異が生じて、グリホサートに対する高い耐性が 2mEPSPS に誘導されたと考えられた。2mEPSPS たん白質の産生により EPSPS 活性が従来よりも増大しても、シキミ酸合成経路の律速酵素ではないことから、本経路の最終生成物である芳香族化合物の生成量に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。したがって、2mepsps 遺伝子産物が宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。（参考文献 46）。

（5）宿主との差異に関する事項

2005 年に 9 箇所、2006 年に 8 箇所の米国の圃場で栽培されたワタ GHB614 と非組換えワタの綿実について、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ミネラル類、ビタミン E 及び有害生理活性物質の分析を行い、GHB614 と非組換えワタとの間の同等性について検討を行った（参考文献 49、50）。その結果、問題となる差異は認められなかった。

（6）外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国の 40 箇所の圃場において圃場試験を行ったが、その生存及び増殖能力について、GHB614 系統と非組換え品種との間に差異は認められなかった。

（7）生存及び増殖能力の制限に関する事項

上記（6）に記したとおり、生存及び増殖能力の制限要因について、両者の間に相違はないと考えられる。

（8）不活化法に関する事項

物理学的防除（耕耘）や化学的防除（グリホサート以外の除草剤散布）など、ワタを枯死させる従来の方法によってGHB614系統は不活化される。

（9）外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品庁（FDA）より2008年9月に食品及び飼料としての安全性が確認された。

カナダ食品検査庁（CFIA）より2008年4月に飼料としての安全性が確認された。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）より2009年9月に食品としての安全性が確認された。

欧州食品安全機関（EFSA）へ2008年1月に食品及び飼料の安全性に係る承認申請を提出した。

（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項

GHB614系統と従来のワタとの栽培方法の違いは、除草剤グリホサートを使用する際、GHB614系統では生育時期を問わず使用することができ、農作物への付着を避けるための措置を講ずる必要がないという点である。それ以外は、従来の栽培方法と相違はない。

（11）種子の製法及び管理方法に関する事項

GHB614における種子の製法及び管理方法については、既存のワタと相違はない。

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耐性ワタGHB614系統について、「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」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　提出資料で引用された参考文献

1 NCPA (1999) National Cottonseed Products Association Cottonseed and its Products. CSIP 10th Edition 1999 Digital Edition www.cottonseed.com. National Cottonseed Products Association, Inc. P.O. Box 172267. Memphis, TN 38187.

2 OECD (2004) Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/FOOD(2004)16.

3 Metzer R.B. and Supak J.R. (1990) Characteristics of cotton varieties grown in

Texas 3rd edition, pp34. Texas agricultural extension service.
4 Fryxell P.A., Craven L.A. and Stewart J.McD. (1992) A revision of *Gossypium* Sect. *Grandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species. *Systematic Botany* 17: 91-114.
5 OECD (2003) Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* Spp). Working group on harmonization of regulatory oversight in biotechnology. ENV/JM/BIO(2002)4/REV3.
6 Endrizzi J.E., Turcotte E.I. and Kohel R.J. (1984) Cotton, Agronomy No. 24, p.28-129, Soil Science Society of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds.) Wisconsin, USA.
7 Abou-Donia M.B. (1989) Toxicants of Plant Origin. Volume IV Phenolics (P.R. Cheeke, ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp1-22 (Gossypol)
8 Calhoun M.C., Kuhlmann S.W. and Baldwin B.C. (1995) Cottonseed products association, Inc. Survey 1993-94. From Calhoun M.C. 1995. Cotton Feed product composition and gossypol availability and toxcicity. Wooster, OH: September 24-26, 1995. pp125-145. Proceedings of the 2nd National Altermative Feeds Symposium.
9 Berardi L.C. and Goldblatt L.A. (1980) Toxic constituents of plant foodstuffs 2nd Ed., I.I.Liener, ed., Academic Press, New York pp183-237. (Gossypol)
10 唐澤　豊 (2004) 動物の飼料、文永堂出版.
11 Gunstone F.D., Harwood J.L. and Padley F.B. (1994) *In* The Lipid Handbook, 2nd Edition (Chapman & al., eds.) London. University Press, Cambridge. pp13-14, 47-146.
12 田先　威和夫 (1996) 新編　畜産大事典、養賢堂.
13 新谷　勛　(1989) 食品油脂の科学、幸書房.
14 Munro J. M. (1987) Cotton, Chapter 13: Disease. Jhon Wiley and Sons Inc., eds. pp211-230.
15 Crockett L. (1977) Wildly successful plants: North American weeds University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii
16 Holm L., Pancho J.V., Herbarger J.P. and Plucknett D.L. (1979) A geographical atlas of world weeds. John Wiley and Sons, NY. 391pp.
17 Muenscher W.C. (1980) Weeds 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca and London.
18 Niles G.A. and Feaster C.V. (1984) Cotton, Agronomy No.24, p.205, Soil Science Society of America, Inc., (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds) Wisconsin, USA.
19 Fryxell P.A. (1968) A redefinition of the tribe Gossyipeae. Bot.Gaz. 129: 296-308.
20 Origin of vector pTEM2 and map of the paremt vector （ベクターpTEM2 の起源及びその親となるベクターのマップ）（社内報告書）
21 Description of vector pTEM2 (ベクターpTEM2 の解説) （社内報告書）
22 Cornelissen M. and Vandewiele M. (1989) Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid *psb*A promoter. Nucleic Acids Res. 17: 19-29.
23 Mutated 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene encoding for said protein and transformed plants containing said gene (改変型 5-エノールピルビルシキ

ミ酸 3-リン酸合成酵素遺伝子と当該たん白質をコードする遺伝子及び当該遺伝子を含む遺伝子組換え植物) Patent No. US6566587B1 (社内報告書)
24 Description of the base pair sequence of the double mutated maize 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) {改変型 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素遺伝子(*2mEPSPS*)の塩基配列} (社内報告書)
25 D.Rouquie, 2006：Overall amino acid sequence homology search with known toxins and allergens (既知の毒素及びアレルゲンとの全体的な配列相同性検索) (社内報告書)
26 Chaboute M., Chaubet N., Philipps G., Ehling M. and Gigot C. (1987) Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana* Plant Mol.Biol. 8: 179-191.
27 Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614 (遺伝子組換えワタ GHB614 において挿入された全 DNA 塩基配列及び組み込み部位) (社内報告書)
28 Chaubet N., Clement B. and Gigot C. (1992) Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. J.Mol. Biol. 225: 569-574.
29 Lebrun M., Leroux B. and Sailland A. (1996) Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471.
30 Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614 (遺伝子組換えワタの構造的安定性の解析) (社内報告書)
31 Demonstration of the structural stability of cotton event GHB614 (additional generations) {GHB614 系統の構造的安定性の解析 (追加世代) } (社内報告書)
32 Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614 (遺伝子組換えワタ GHB614 の詳細な挿入部位の解析) (社内報告書)
33 Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequences in Gossypium hirsutum transformation event GHB614 (遺伝子組換えワタ GHB614 においてベクター由来の配列が存在するかどうかの確認)
34 Determination of the flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB614 ut to 1 kb (GHB614 系統における 1 kb までの近傍配列の決定) (社内報告書)
35 Bioinformatics analysis of the pre-insertion lucus of GlyTol cotton transformation event GHB614 (遺伝子組換えワタ GHB614 系統の挿入前配列のバイオインフォマティクス解析) (社内報告書)
36 Expression of the *2mepsps* RNA and of potential cryptic RNAs in the glyphosate tolerant cotton event GHB614 (グリホサート耐性ワタ GHB614 における *2mepsps* RNA の発現及び可能性のある潜在的 RNA 種) (社内報告書)
37 2mEPSPS protein contents in leaf, stem, root, square, apex and pollen tissues during the life cycle of the glyphosate tolerant cotton event GHB614 (グリホサート耐性ワタ GHB614 の生活環における葉、茎、根、蕾、生長点及び花粉の組織における 2mEPSPS たん白質の含量) (社内報告書)
38 Analysises of raw agricultural commodity (fuzzy seed) of cotton GHB614 for 2mEPSPS protein, USA, 2005 {USA、2005 年におけるワタ GHB614 未加工農産物 (有毛種子) の 2mEPSPS たん白質に関する分析} (社内報告書)

39 Content of 2mEPSPS protein in processed fractions of transgenic cotton event GHB614 (組換えワタ GHB614 の加工処理画分中の 2mEPSPS たん白質含量) (社内報告書)
40 Bioinformatics analysis of newly created ORFs between stop codons from GlyTol cotton transformation event GHB614 (GlyTol ワタ GHB614 系統における新たに作られた終止コドンに挟まれた ORF のバイオインフォマティクス解析) (社内報告書)
41 GlyTol Cotton transformation event GHB614; *In silico* analysis of additional putative Open Reading Frame (ORF) sequences for identifying potential homologies to know toxins and allergens (GlyTol ワタ GHB614 系統；追加の推定オープンリーディングフレームの *In silico* 解析による既知の毒素及びアレルゲンとの相同性の確認) (社内報告書)
42 2mEPSPS Protein, Amino acid sequence homology search with known toxin (2mEPSPS たん白質のアミノ酸配列に基づく既知の毒素との相同性検索) (社内報告書)
43 Structural and functional equivalence of 2mEPSPS protein produced in *Escherichia coli* and GHB614 cotton, *Gossypium hirsutum* (大腸菌及び GHB614 ワタで生産された 2mEPSPS たん白質の構造的及び機能的同等性) (社内報告書)
44 2mEPSPS protein, *In vitro* digestibility study in simulated gastric fluid (2mEPSPS たん白質、人工胃液における消化性) (社内報告書)
45 2mEPSPS protein, *In vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid (2mEPSPS たん白質、人工腸液における消化性) (社内報告書)
46 The double mutant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene product : 2mEPSPS, Description and Characterization (改変型 5-エノールピルビルシキミ酸 3-リン酸合成酵素遺伝子産物：2mEPSPS, 解説及び特性) (社内報告書)
47 2mEPSPS protein, Heat stability study (2mEPSPS たん白質、熱安定性試験) (社内報告書)
48 Boocock MR. and Coggins JR. (1983) Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate-3- phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS Letters. 154: 127-133.
49 Nutritional Impact Assessment Report on Glyphosate Tolerant Cotton Transformation Event GHB614 (グリホサート耐性組換えワタ GHB614 の栄養影響評価報告書)
50 Composition of processed commodities (FRAC) of transgenic Glytol cotton and the non-transgenic counterpart, USA, 2006 {USA、2006 年における組換え体 GlyTol ワタならびにそれに対応する元の非組換えワタの加工済み農産物(FRAC)の組成}