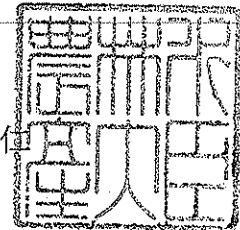


21消安第9898号
平成21年12月1日

農業資材審議会長
土肥一史 殿

農林水産大臣臨時代理
国務大臣 小沢 鋭俊



組換えDNA技術応用飼料の安全性に関する確認に係る諮問について

下記の飼料について、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）第3条第2項の規定に基づき、貴審議会の意見を求める。

記

チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統

組換えDNA技術応用飼料の安全性確認

平成21年12月1日付け21消安第9898号をもって諮問された組換えDNA技術応用飼料の安全性確認について「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を定める件」（平成14年11月26日付け農林水産省告示第1780号。以下「確認手続」という。）に基づき確認を行った。その結果は次のとおりである。

1 チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統

(1) 申請品目

飼料名 : チョウ目害虫抵抗性ワタCOT102系統

性質 : チョウ目害虫抵抗性

申請者 : シンジェンタジャパン株式会社

開発者 : Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates

(2) 経過

平成21年12月 1日 諮問

平成22年 3月23日 第36回組換え体委員会

平成22年11月 5日 第39回組換え体委員会

(3) 結果

確認手続第3条第1項に基づく確認を行って差し支えないと判断される。

参考：飼料に係る食品健康影響評価（畜産物の安全性）

平成21年12月 1日 農林水産省より、食品安全委員会に諮問

平成22年 9月 6日 食品安全委員会において食品としての健康影響評価を実施、継続審議中

1 「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統」に係る安全性確認(案)

2

3 I はじめに

4 チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統 (以下「COT102 ワタ」という。)について、
5 「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
6 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

7

8 II 確認対象飼料の概要

9 飼料名：チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統

10 性 質：チョウ目害虫抵抗性

11 申請者：シンジェンタジャパン株式会社

12 開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its
13 affiliates

14

15 COT102 ワタは、グラム陽性土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* AB88 株に由来する
16 *vip3Aa1* 遺伝子の塩基配列を一部改変した改変 *vip3A* 遺伝子(以下「*mvip3A* 遺伝子」
17 という。)を導入したワタである。*mvip3A* 遺伝子により、チョウ目害虫に対し高い殺
18 虫活性を示す改変 Vip3A たん白質(以下「mVip3A たん白質」という。)を発現する。
19 mVip3A たん白質を発現しているワタの植物体を、米国のワタ栽培で重要な防除対象害
20 虫とされているタバコガ類の幼虫が摂食すると、幼虫体内で mVip3A たん白質は特定
21 の大きさの活性ポリペプチドとなる。活性ポリペプチドは、中腸上皮に存在する受容体
22 と特異的に結合し、生体膜にイオン透過性小孔を形成する。その結果、タバコガ類の幼
23 虫は消化器官が損傷を受けて摂食障害を起こし、死に至る。チョウ目以外の昆虫や動物
24 は、摂食しても影響はない。

25 COT102 ワタの作製過程で、形質転換した植物細胞の選抜マーカーとして利用するた
26 めに、プラスミド pKC203 由来のハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子(*aph4*
27 遺伝子)が導入されている。

28 なお、COT102 ワタと既存のワタとの相違は、COT102 ワタが mVip3A たん白質の
29 発現によりチョウ目害虫に対する抵抗性を有する点のみであり、主要構成成分、ミネラ
30 ル組成、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質といった成分の
31 種類や量は変化しておらず、対照の非組換えワタと同程度で相違のないことが示された。

32 一般に、ワタは綿実及び綿実油かすが家畜等の飼料として使用されている。

33

34 III 審議内容

35 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

36 (1) 遺伝的素材に関する事項

37 COT102 ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の
38 Coker312 である。

39 mVip3A たん白質をコードする *mvip3A* 遺伝子の供与体は、グラム陽性土壌細
40 菌である *Bacillus thuringiensis* AB88 株である(参考文献 1)。

41 選抜マーカー遺伝子である *aph4* 遺伝子の供与体は、プラスミド pKC203 であ

42 る。 *aph4* 遺伝子によって発現されるハイグロマイシン B リン酸基転移酵素(以下
43 「APH4 たん白質」という)は、ハイグロマイシンとその類縁アミノグリコシド系
44 抗生物質をリン酸化して不活化する酵素たん白質である(参考文献 2,3,4)。

45
46 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

47 宿主であるワタは、種子(綿実)に着生した綿毛を繊維原料として利用するこ
48 とを主な目的に栽培される工芸作物であるが、綿毛を採取した後の綿実や綿実を
49 搾油した後の油粕が飼料に利用されている(参考文献 5)。

50
51 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

52 飼料として利用される部分は、1 (2) に記載したとおり綿実であり、その主
53 要栄養素はたん白質、総脂質、灰分、炭水化物、食物繊維である。また、ワタに
54 は毒性物質・抗栄養素として、テルペノイド物質であるゴシポール、シクロプロ
55 ペノイド脂肪酸と総称されるステルクリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステル
56 クリン酸が含まれることが知られている(参考文献 5)。COT102 ワタにおけるこ
57 これらの量は、宿主である従来のワタと同程度であることが示している(参考文献
58 6,7)。

59
60 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

61 COT102 ワタと既存のワタとの相違は、COT102 が mVip3A たん白質の発現によ
62 りチョウ目害虫に対して抵抗性を示す点のみである。これらの点を除けば、COT102
63 ワタ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
64 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
65 ない。

66
67 以上(1)～(4)により、COT102 の飼料としての安全性を評価するために、既
68 存のワタを比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

69
70 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

71 COT102 ワタは、mVip3A たん白質を発現することにより、チョウ目害虫に対して
72 抵抗性を示し、中でも米国において重要防除対象害虫とされている cotton bollworm
73 (*Helicoverpa zea*)及び tobacco budworm(*Heliothis virescens*)に対し効果的な防除
74 を行うことが可能となる(参考文献 8,9,10)。COT102 ワタは、cotton bollworm や
75 tobacco budworm に対して抵抗性を示すことが、米国のほ場試験で確認されている
76 (参考文献 11)。なお、COT102 ワタが従来のワタと異なる点は、上記チョウ目昆虫
77 に対する防除方法のみであり、その飼料としての利用目的や利用方法に関して従来の
78 ワタとの相違はない。

79
80 3 宿主に関する事項

81 (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

82 COT102 ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の

83 Coker312 である。

84

85 (2) 遺伝的先祖に関する事項

86 現在、ワタ属植物種は 2 倍体種と 4 倍体種から成り、およそ 50 種が知られているが、栽培種は 2 倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、並びに、4 倍体種 ($2n=52$) の *G. hirsutum* と *G. barbadense* の 4 種のみである。栽培されているワタの約 91%かそれ以上は *G. hirsutum* と考えられている(参考文献 12)。

90 *G. hirsutum* を含めた 4 倍体種は、いずれも AD ゲノムというカテゴリーに分類される異質倍数体で、*G. herbaceum* と *G. arboreum* の 2 種が分類されている旧大陸由来の A ゲノム 2 倍体種と、13 種が分類されている新大陸由来の D ゲノム 2 倍体種を祖先として生じたと考えられている(参考文献 13,14)。その原産地は中央アメリカであり、紀元前 3500 ~ 2300 年にはメキシコで既に栽培が行われていたと考えられている(参考文献 13,15)。

96

97 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

98 ワタには毒性物質・抗栄養素として、テルペノイド物質であるゴシポール、シクロプロペノイド脂肪酸と総称されるステルクリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステルクリン酸が含まれていることが知られている(参考文献 5)。

101 ゴシポールには結合型と遊離型が存在し、たん白質と結合している結合ゴシポールは無害である。遊離ゴシポールには毒性があり、哺乳動物において心臓、肝臓及び腎臓の機能不全を引き起こして死亡させる他、雄の生殖能力を低下させることが知られている(参考文献 5,16)。

105 シクロプロペノイド脂肪酸は飽和脂肪酸の不飽和化を阻害し、シクロプロペノイド脂肪酸を摂取した動物において脂質の融点を上昇させると考えられている生理活性物質で、ニワトリでは卵黄の退色と孵化率の減少という 2 つの有害作用が認められている(参考文献 5)。

109 なお、ワタの綿実や油粕を飼料として利用する場合、比較的毒性影響を受けにくいウシやヒツジのような反すう動物で主に利用されるが、その場合でも過剰量を摂取することがないように注意を払う必要がある(参考文献 5,16)。

112

113 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

114 ワタは種子植物であり、ワタが家畜等に寄生又は定着することはない。

115

116 (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

117 ワタには Bacterial blight、Seedling disease complex、Boll rot、Leaf spot、Cotton stem canker、Leaf crumple 等の細菌、糸状菌及びウイルスによる各種病害が発生する(参考文献 17)。米国ではこれらの病害防除は、統合的病害虫管理プログラム (Integrated Pest Management=IPM) に基づいて、主に農薬散布によって行われている(参考文献 18)。なお、これらの植物病原菌(ウイルス等を含む)が、家畜等に対して病原性を持つことは知られていない。植物病原菌は多数存在しており、家畜等は植物性飼料の摂取を通じてそれら病原菌にさらされている。

123

124 しかし、日常的に色々な植物性飼料を摂取しているにもかかわらず、その植物性
125 飼料を介した植物病原菌の摂取によって、家畜等の健康が害されることは一般に
126 ない(参考文献 19)。

127

128 (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

129 一般にワタは熱帯性の種子繁殖する多年生植物であるが、作物としては一年生
130 作物として栽培されている。種子の発芽最低温度は 12 °C、最適温度は 27 ~
131 36 °Cであり、また、生育初期の温度は 24 ~ 30 °Cが望ましく、生育後期ではさら
132 に高温が良いとされる。日本では、一般に平均気温が 15 ~ 16 °Cに達する 5 月上
133 中旬に播種され、発芽後の生育に伴い、7 月上旬頃から主幹及び分枝に徐々に結
134 果枝を生じて着蕾し、8 月初め頃に開花の盛んな時期に達する。9 月から 11 月上
135 旬にかけてさく(果実に相当する種子が稔実した子房部分)が裂けて、繊維が見え
136 る状態(開じょ)になり、さくの収穫が適時行われる。そして、晩秋になって気温
137 が零下に下がり強霜に合うようになるとワタは枯死する(参考文献 20)。

138

139 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

140 ワタは栄養成長と生殖成長を同時に行う種子繁殖植物であり、基本的に自家受
141 粉植物であるが、マルハナバチやミツバチ等の花粉媒介昆虫によって他家受粉も
142 行う(参考文献 21)。 *G. hirsutum* は、 *G. barbadense*、 *G. tomentosum*、 *G.*
143 *mustelinum* 及び *G. darwinii* と交雑可能で、稔性を有する F1 雑種の形成が比較
144 的容易である(参考文献 14)。

145

146 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

147 *G. hirsutum* は他の栽培種に比べて比較的収量特性と栽培適性に優れていたた
148 め、繊維料作物として導入した米国において品種改良が進み(参考文献 22)、その
149 後、他の主要ワタ栽培国にも導入され、世界的に栽培が普及した(参考文献
150 12,13)。2007 年におけるワタの世界総栽培面積は約 3,310 万 ha で、インドが約
151 940 万 ha(28%)、中国が約 540 万 ha(16%)、米国が約 420 万 ha(13%)、パキス
152 タンが約 310 万 ha(9%)であった(参考文献 23)。なお、綿毛を採取した後に残る
153 綿実の副次的な用途として、綿実や搾油後の油粕が飼料に利用されるようになった
154 のは、ワタの栽培が世界的に普及した近代以降のことと考えられる。

155 我が国へは 8 世紀に *G. arboreum* が伝来したがすぐに消滅したと考えられ、そ
156 の後、16 世紀に再伝来して関東以南に普及し、明治 15 ~ 20 年頃には 10 万 ha
157 ほど栽培された。しかし、安価で良質な外国綿の輸入によって栽培は減少した。
158 現在ではワタの商業栽培は行われておらず、園芸的な栽培が行われている程度に
159 すぎない(参考文献 20,24)。

160

161 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

162 ワタの綿実や搾油後の油粕が飼料に利用されている。なお、綿実や油粕はゴシ
163 ポールやシクロプロペノイド脂肪酸の問題から主に乳牛用飼料として利用されて
164 いる(参考文献 5)。

165 2007年における綿実の世界総生産量は約7,360万トンであり、米国での生産量
166 は約1,040万トン(14%)であった(参考文献23)。また、日本は2008年に約13万
167 トンの綿実を輸入しており、その多く(約75%)は米国からの輸入であった(参考文
168 献25)。

169 我が国において2008年に製造された綿実油粕は約1万4,000トンであった(参
170 考文献26)。また、2008年度に5,520トンの綿実油粕を配合・混合飼料の原料と
171 して使用しているが、その約99%は乳牛用配合飼料であった(参考文献27)。

173 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

174 ワタの種子の発芽は、1日の平均土壌温度が15℃に達すると可能となるが、こ
175 のような温度条件での生育は極めて遅い。10℃以下では根の細胞分裂が完全に阻
176 害されるほか、種子品質の不良、土壌病害、湿害や干ばつ、塩害、除草剤の残留
177 及び低温は種子発芽の阻害要因となる(参考文献21)。加えて、生育初期の日照不
178 足や低温は開花・結実の遅れを、開花期での日照不足は落さくを生じる原因とな
179 る(参考文献20)。また、物理的防除法(耕耘)や化学的防除法(感受性を示す除草
180 剤の使用)によって、ワタは容易に枯死・不活化される。

182 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

183 ワタ属植物種は2倍体種と4倍体種から成り、およそ50種が存在する。このう
184 ち、栽培種は2倍体種の*G. herbaceum*と*G. arboreum*、並びに、4倍体種の*G.*
185 *hirsutum*と*G. barbadense*の4種のみである。残りはすべて野生種であり(参考
186 文献13)、栽培種と同様にゴシポールとシクロプロペノイド脂肪酸を産生してい
187 ると考えられる。

189 4 ベクターに関する事項

190 (1) 名称及び由来に関する事項

191 COT102 ワタの作出に用いた導入用ベクター pCOT1 の構築には、Danisco
192 Biotechnology 社のバイナリーベクター pVictor 由来のベクター pHiNK078 を用
193 いた(参考文献28)。

195 (2) 性質に関する事項

196 *mvip3A* 遺伝子を含む導入用ベクター pCOT1 の全塩基数は11,801bpである。
197 これらの塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかにされている。既知の有
198 害塩基配列は含まない(参考文献29)。

200 (3) 薬剤耐性に関する事項

201 導入用ベクター pCOT1 には、その T-DNA 領域の外骨格領域に構築ベクターの
202 細菌中での選抜・維持のため、*E. coli* Tn7 由来の *spec* (以下「*aadA* 遺伝子」と
203 いう。)が含まれている。*aadA* 遺伝子にコードされるスペクチノマイシンアデニ
204 リルトランスフェラーゼによって、エリスロマイシン、ストレプトマイシン及び
205 スペクチノマイシン耐性が付与される(参考文献30)。

206 なお、T-DNA 領域の外骨格領域に含まれている *aadA* 遺伝子は、作出された
207 COT102 ワタに存在し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(参
208 考文献 29)。

209

210 (4) 伝達性に関する事項

211 導入用ベクター pCOT1 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

212

213 (5) 宿主依存性に関する事項

214 4 (4) の記載から、家畜等が導入用ベクター pCOT1 の宿主となることはな
215 い。

216

217 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

218 COT102 ワタの作出に用いた導入用ベクター pCOT1 はベクター pVictor を基
219 に以下の手順で作成した(参考文献 28)。

220 ① pVictor 由来のベクター pVictorHiNK に含まれる [35S プロモーター]-[*pmi* 遺
221 伝子]と M13 複製起点を削除し、pHiNK078 を作成した。導入用ベクター
222 pCOT1 の T-DNA 外骨格領域はこの pHiNK078 に由来する。

223 ② pHiNK078 の T-DNA 領域に、pNOV1417 由来の *mvip3A* 遺伝子発現カセット
224 断片([Act2 プロモーター]-[*mvip3A* 遺伝子]-[NOS ターミネーター])を挿入
225 し、pNOV1420 を作成した。

226 ③ pNOV1420 に pNOV101 由来の *aph4* 遺伝子発現カセット断片([Ubq3 プロモ
227 ーター]-[*aph4* 遺伝子]-[NOS ターミネーター])を挿入し、pCOT1 を作成した。

228

229 (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

230 導入用ベクター pCOT1 の宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられ
231 た(参考文献 28)。

232

233 5 挿入遺伝子に関する事項

234 (1) 供与体に関する事項

235 ① 名称、由来及び分類に関する事項

236 *mvip3A* 遺伝子は、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* AB88
237 株の *vip3Aa1* 遺伝子由来で、宿主植物での発現を高めるためにシンジェンタシ
238 ード社が人工合成した改変遺伝子である(参考文献 1)。

239 *aph4* 遺伝子は、抗生物質耐性マーカー遺伝子として、プラスミド pKC203
240 からクローニングされたハイグロマイシン B リン酸基転移酵素遺伝子である(参
241 考文献 2,3,4)。

242

243 ② 安全性に関する事項

244 *mvip3A* 遺伝子の供与体である *Bacillus thuringiensis* AB88 株が属する *B.*
245 *thuringiensis* は、家畜等の食経験はないが、微生物農薬の基材として長期に利
246 用されており、家畜等に対する病原性は報告されていない。

247 *aph4* 遺伝子の供与体はプラスミド pKC203 である。*aph4* 遺伝子は、既に土
248 壌細菌や腸内細菌が幅広く有していることが明らかとなっている。

249

250 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

251 4 (6) に記載した方法で作成した導入用ベクター pCOT1 をアグロバクテリ
252 ウムに組み込んだ後、そのアグロバクテリウムをワタの胚軸に接種し、共存培養
253 した。その後、ハイグロマイシンを添加した細胞培養培地で形質転換細胞を選抜
254 して再分化個体(T0 世代)を得た。選抜した T0 個体に対して PCR 分析を行い、
255 導入遺伝子の存在を確認した。その後、優良ワタ品種との戻し交配あるいは自殖
256 を行うことで後代世代を維持しながら、農業形質、挿入遺伝子、発現たん白質及
257 び構成成分の評価・分析等を行った(参考文献 6,7,29)。

258

259 (3) 構造に関する事項

260 ① プロモーターに関する事項

261 Act2 プロモーター(1,408 bp) : シロイヌナズナのアクチン 2 遺伝子由来のイ
262 ントロン(453 bp)を含むプロモーター配列(参考文献 31)。導入用ベクター
263 pCOT1 の *mvip3A* 遺伝子発現カセットに用いられた。

264 Ubq3 プロモーター(1,721 bp) : シロイヌナズナのユビキチン 3 遺伝子由来の
265 第 1 イントロン(375 bp)を含むプロモーター配列(参考文献 32)。導入用ベク
266 ター p COT1 の *aph4* 遺伝子発現カセットに用いられた。

267 ② ターミネーターに関する事項

268 NOS ターミネーター(253 bp) : *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium*
269 *tumefaciens*) の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む
270 配列(参考文献 33)。 *mvip3A* 遺伝子発現カセットと *aph4* 遺伝子発現カセッ
271 トの両方に用いられた。

272 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

273 Act2 プロモーター、Ubq3 プロモーター及び NOS ターミネーターの塩基配
274 列は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない(参考文献 29)。

275

276 (4) 性質に関する事項

277 導入用ベクター pCOT1 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1
278 に示した。*mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の機能の詳細を表外に記載した。

279

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成 DNA	由来及び機能
<i>mvip3A</i> 遺伝子発現カセット	
Act2 プロモーター	シロイヌナズナのアクチン 2 遺伝子のイントロン(453 bp)を含むプロモーター配列(参考文献 31)。
<i>mvip3A</i>	<i>B. thuringiensis</i> AB88 株から見いだされた <i>vip3Aa1</i> 遺伝子を改変した遺伝子(参考文献 1)。 <i>mvip3A</i> 遺伝子は植物での発現に最適なコドンに変更・置換されている(参考文献 34)。 <i>mvip3A</i> 遺伝子にコードされる mVip3A たん白質は、 <i>vip3Aa1</i> 遺伝子にコードされる Vip3Aa1 たん白質とは 1 箇所のアミノ酸が異なる。Vip3A たん白質はいくつかのチョウ目昆虫に殺虫活性を示す。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む配列(参考文献 33)。
<i>aph4</i> 遺伝子発現カセット	
Ubq3 プロモーター	シロイヌナズナのユビキチン 3 遺伝子の第 1 イントロンを含むプロモーター配列(参考文献 32)。
<i>aph4</i>	ハイグロマイシンといくつかの類縁アミノグリコシド系抗生物質のリン酸化を触媒するリン酸基転移酵素をコードする、プラスミド pKC203 由来のアミノシクリトールリン酸基転移酵素遺伝子(参考文献 2,3,4)で、形質転換細胞の選抜マーカーとして用いた。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む配列(参考文献 33)。

① *mvip3A* 遺伝子の機能

mvip3A 遺伝子が属する Vip3A たん白質ファミリーは、*B. thuringiensis* AB88 株において見いだされた殺虫活性たん白質である。*B. thuringiensis* が産生する殺虫活性たん白質としてよく知られている Cry たん白質が、芽胞形成期に産生され、細胞内に存在する結晶たん白質であるのに対し、Vip3A たん白質は *B. thuringiensis* の芽胞形成期及び栄養生長期に産生され、細胞外に分泌される可溶性たん白質である(参考文献 1)。

この Vip3A たん白質が標的チョウ目昆虫の幼虫に摂取されて消化されると、特定の大きさのコアたん白質を生じる。そして、このコアたん白質が腸管上皮細胞の特異的受容体に結合し、イオンチャネルが形成され、その結果、消化器官が損傷を受け殺虫活性を発揮することが示されている。このように、Vip3A たん白質の作用機作は Cry たん白質と類似しているが、同様にチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry1Ab たん白質とは、結合する受容体が異なるため、殺虫活性スペクトラムも異なることが明らかにされている(参考文献 35)。

なお、mVip3A たん白質は、米国のワタの栽培で発生する主なチョウ目害虫である cotton bollworm (*Helicoverpa zea*)、tobacco budworm (*Heliothis*

301 *virescens*)、pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*) 等に対して殺虫活性を示
302 し、mVip3A たん白質を発現する COT102 ワタもこれらのチョウ目害虫に対し
303 て抵抗性を示すことが、米国において確認されている(参考文献 11)。

304

305 ② *aph4* 遺伝子の機能

306 *aph4* 遺伝子は、APH4 たん白質をコードしている。APH4 たん白質は、ハイ
307 グロマイシン B をリン酸化することによって不活化する(参考文献 36)。導入用
308 ベクター pCOT1 が導入されて APH4 たん白質を発現する植物細胞は、ハイグロ
309 マイシン B を含む選抜培地中でも生育することができ、その結果、形質転換細胞
310 の選抜が可能となる。

311

312 (5) 純度に関する事項

313 導入用ベクター pCOT1 は *aadA* 遺伝子を細菌選抜マーカー遺伝子としてベクタ
314 ーの外骨格領域に有しており、細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化
315 されている(参考文献 28)。

316

317 (6) 安定性に関する事項

318 COT102 ワタの 3 つの世代を用いて、COT102 ワタにおける挿入遺伝子の分離
319 様式を、*mvip3A* 遺伝子を増幅する PCR 分析により検定した。その結果、COT102
320 ワタの挿入遺伝子はメンデルの分離法則に基づいて遺伝することが確認された(参
321 考文献 29)。

322 また、COT102 ワタの 4 つの世代を用いてサザンブロット分析を行った結果、
323 挿入遺伝子が後代世代に安定していることが確認された(参考文献 29)。

324

325 (7) コピー数に関する事項

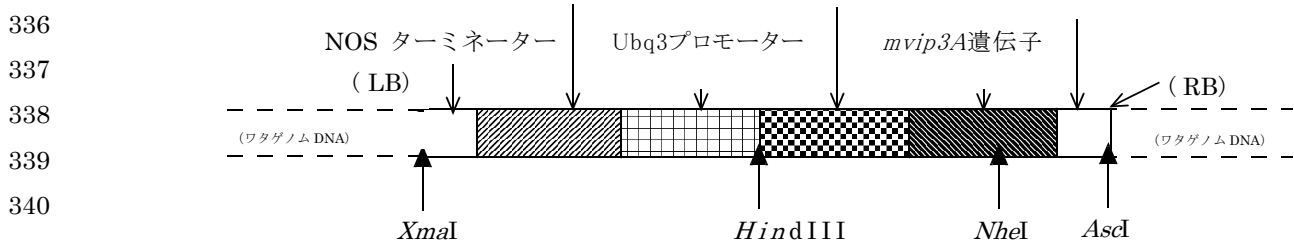
326 COT102 ワタの 1 つの世代及び非組換え体を対照として用いてサザンブロット
327 分析を行ない、COT102 ワタにおける挿入遺伝子のコピー数、完全性及び導入用
328 ベクター pCOT1 の外骨格領域の存在の有無を確認した。その結果、COT102 ワ
329 タのゲノムには、1 コピーの完全な *mvip3A* 遺伝子発現カセットが組み込まれて
330 おり、導入用ベクター pCOT1 の外骨格領域は存在しないことが確認された(参考
331 文献 29)。COT102 ワタにおける挿入遺伝子の模式図を図に示した。

332

333 図 COT102 ワタにおける挿入遺伝子の模式図

334

335 *aph4* 遺伝子 Act2 プロモーター NOS ターミネーター



342 また、COT102 ワタの挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端近傍配列(各 1,000 bp)を
343 クローニングし、塩基配列を決定した。非組換えワタの塩基配列と比較した結果、
344 5' 末端の近傍配列は、遺伝子の挿入に伴いワタゲノムの 82 bp の欠損が見られた
345 もの、非組換えワタのゲノム配列と一致していた(参考文献 29)。3' 末端の近
346 傍配列においては、挿入遺伝子との隣接部位に、非組換えワタの挿入該当箇所の
347 ゲノム配列とは一致しない 690bp の挿入が見られた。この配列をワタのゲノム配
348 列と相同性検索を行った結果、ワタのゲノム配列と高い相同性を示した。

349 次に、決定された塩基配列を基に、挿入遺伝子のワタゲノムへの組み込みによ
350 り、挿入部位の近傍配列における既知のたん白質と相同性を持つ配列の存在の有
351 無、ワタの既知の遺伝子の欠損の有無を確認した。両近傍配列(各 1,000 bp)及び
352 隣接する T-DNA 領域(90bp)の配列(各 1,090bp)について、NCBI Non-redundant
353 protein sequences (nr)に対し、blastx による検索を行った(E value 10 以下)。
354 その結果、E value 10 以下の既知たん白質が 5' 末端側で 3 個の、3' 末端側で 740
355 個のたん白質が見いだされたものの、その中に毒性たん白質及びワタの既知のた
356 ん白質の配列は見いだされなかった。このことから、この領域から万が一たん白
357 質が発現した場合であっても飼料の安全性の観点から問題が起こる可能性は非常
358 に低いワタの既知遺伝子が損なわれていないことが示唆された(参考文献 29)。

359

360 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

361 米国の 3 箇所の試験ほ場において栽培した COT102 ワタの 1 世代から、生育ス
362 テージに合わせて葉、さく(果実に相当)、種子等のサンプルを採取し、ELISA 法
363 によって mVip3A たん白質及び APH4 たん白質の発現量を分析した。その結果、
364 COT102 ワタの各組織及び生育ステージで mVip3A たん白質の発現が確認され、3
365 ヶ所のほ場における種子での発現量の平均分析値の範囲は、2.72 ~ 3.23 µg/g 乾燥
366 重であった。一方、APH4 たん白質の各組織及び生育ステージにおける発現量は、
367 花粉で 2.25 µg/g 乾燥重であったものの、それ以外の組織では種子を含めていずれ
368 も定量限界値以下(<150 ng/g 乾燥重)であった(参考文献 38)。

369 なお、平成 22 年に既に安全性評価済みの MIR162 トウモロコシの安全性評価の
370 際に、マウスを用いた経口毒性試験(最大投与量 : mVip3A たん白質 1,250 mg/kg、
371 15 日間)を実施したが、mVip3A たん白質による毒性影響は、認められなかった
372 (参考文献 38)。当該投与量を綿実量に換算すると、家畜の体重 1kg あたり 387kg
373 の種子を摂取することに相当することから、実際に COT102 ワタを飼料に用いた
374 際に家畜が摂取すると想定される量の mVip3A たん白質が、家畜に影響を及ぼす
375 とは考えられない。

376

377 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

378 導入用ベクター pCOT1 の外骨格領域にはエリスロマイシン、ストレプトマイ
379 シン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれ、細菌におけ
380 るベクターの選抜に利用されているが、作出された COT102 ワタには *aadA* 遺伝
381 子を含む外骨格領域は存在しないことがサザンブロット分析により確認されてい
382 る(参考文献 29)。

383 また、構築された発現ベクター pCOT1 の T-DNA 領域には、形質転換細胞の選
384 抜のため、ハイグロマイシン耐性マーカー遺伝子である *aph4* 遺伝子が組み込ま
385 れており、作出された COT102 ワタのゲノムにも *aph4* 遺伝子が導入されている。
386 COT102 ワタを家畜が摂取し、腸内細菌へ *aph4* 遺伝子の水平移行及び COT102
387 ワタで発現される APH4 タンパク質により家畜へ利用されている抗生物質が効か
388 なくなる可能性について、以下のように検討した。

389 欧州食品安全機関(EFSA)の遺伝子組換え生物専門委員会は、抗生物質の臨床医
390 薬や動物医薬としての利用状況、抗生物質耐性マーカー遺伝子の遺伝子組換え作
391 物から微生物への水平移行の可能性及び水平移行による潜在的影響を考慮に入れ
392 て、遺伝子組換え作物に関する抗生物質耐性マーカー遺伝子の利用におけるリス
393 ク評価を行った。その結果、遺伝子組換え作物から微生物への抗生物質耐性マ
394 ーカー遺伝子の水平移行は、可能性は極めて低いものの起こり得ると結論された。
395 しかし、*aph4* 遺伝子に関しては、既に土壤細菌や腸内細菌に幅広く存在している
396 こと、また APH4 タンパク質が不活化する抗生物質は医薬品としての利用が無い
397 あるいは非常に限られていることから、その利用を規制あるいは制限する理由は
398 ないとしている(参考文献 39)。また、オーストラリア政府 保健・高齢化省 遺伝
399 子技術規制局(OGTR)は、COT102 ワタに導入された *aph4* 遺伝子の水平移行の
400 可能性に関し、上記のような判断に加え、*aph4* 遺伝子やハイグロマイシン抵抗性
401 を付与する他の遺伝子を有する細菌は、既にヒトや家畜等の消化器官を含め、自
402 然環境に広く存在していることから、仮に水平移行が生じたとしても何らかのリ
403 スクが生じる可能性は考えにくいと結論している(参考文献 40)。

404 なお、*aph4* 遺伝子によって発現する APH4 タンパク質は、ハイグロマイシン B
405 をリン酸化することによって不活化する(参考文献 36)。APH4 タンパク質の基質
406 特異性は高く、ハイグロマイシン B 以外では、その類似抗生物質であるハイグロ
407 マイシン B₂、デストマイシン A とデストマイシン B を不活化する(参考文献 3)。
408 これらのうち、現在我が国において動物用医薬品として利用されているものはない
409 (参考文献 41,42,43)。

410 また5 (8) のとおり、COT102 ワタにおける APH4 タンパク質の収穫種子に
411 おける発現量は定量限界値以下(<150 ng/g 乾燥重)であり、さらに、6 (3) のと
412 おり APH4 タンパク質は消化に対して安定的でないことが示されている(参考文
413 献 11,13,37)。

414 さらに、6 (2) のとおり APH4 タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造
415 相同性を評価した結果、APH4 タンパク質と有意な構造相同性を持つ既知の毒性
416 タンパク質が存在する可能性は極めて低いことが示された(参考文献 46)。加えて、
417 *E. coli* 過剰発現系によって産生・純化した APH4 タンパク質標品をマウスに
418 1,828 mg/kg (APH4 タンパク質の正味投与量 : 779 mg/kg) 投与して 14 日間観察
419 した結果、APH4 タンパク質の投与に起因した毒性影響は認められなかった(参考
420 文献 47)。

421 以上のことから、COT102 ワタから家畜等の腸内細菌への *aph4* 遺伝子の水平
422 移行及び APH4 タンパク質による家畜へ投与された抗生物質の不活化が家畜等の
423 健康に影響を及ぼすことはないと考えられた。

424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464

(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

COT102 ワタの挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端近傍配列(各 1,000 bp)及び隣接する T-DNA 領域(90 bp)の配列において、意図しないオープンリーディングフレーム(ORF)が形成されているかどうかについて分析した。データベース(National Center for Biotechnology Information (NCBI) Non-redundant protein sequence)を用いて相同性検索(blastp 及び blastx)を行った結果、挿入遺伝子と 5' 及び 3' 末端近傍配列の接合部において毒性たん白質を発現するような、新規の意図しない ORF が形成される可能性は、いずれも極めて低いと判断された(参考文献 29)。

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

COT102 ワタでは、挿入された *mvip3A* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子によって mVip3A たん白質及び APH4 たん白質を発現している。mVip3A たん白質の発現によって、米国のワタ栽培で問題となっているチョウ目害虫に対する抵抗性が獲得された。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① mVip3A たん白質

mVip3A たん白質と既知毒性たん白質との構造相同性を確認するため、NCBI Entrez Protein Database (参考文献 48)及び blastp(参考文献 49)を用いて検索を行った。その結果、*B.thuringiensis* 由来の栄養生長期に産生される殺虫活性たん白質の他に、mVip3A たん白質と有意な相同性を持つ既知の毒性たん白質が存在する可能性は極めて低いと考えられた(参考文献 50)。

また、mVip3A たん白質を発現するチョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MIR162 の安全性評価時に、マウスを用いた単回投与毒性試験(正味投与量: 1,250 mg/kg)及びほ乳動物細胞を用いた細胞毒性試験(最高暴露濃度 50,000 ng/ml)も行われているが、mVip3A たん白質に起因する毒性影響は認められなかった(参考文献 38,51,52)

② APH4 たん白質

mVip3A たん白質と同様に、既知毒性たん白質との構造相同性を確認するため、NCBI Entrez Protein Databas 及び blastp を用いて検索を行った。その結果、毒性たん白質と定義されるものは検出されず、APH4 たん白質と有意な構造相同性を持つ既知の毒性たん白質が存在する可能性は極めて低いことが示された(参考文献 46)。

(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

COT102 ワタにおける mVip3A たん白質及び APH4 たん白質の産生量は極めて

465 微量で、以下の物理化学的処理に対する感受性評価試験等に必要な量を COT102
466 ワタから抽出することが極めて困難であったため、*E. coli* 過剰発現系で産生・純
467 化したものを用いた。*E. coli* 過剰発現系由来の mVip3A たん白質と COT102 ワ
468 タで発現する mVip3A たん白質との同等性は殺虫活性、免疫学的反応、見かけの
469 分子量、グリコシル化反応、部分アミノ酸配列及び N 末端アミノ酸配列を評価す
470 ることにより確認した(参考文献 53)。また、試験に用いた *E. coli* 過剰発現系由
471 来の APH4 タンパク質と COT102 ワタ由来の APH4 タンパク質との同等性は、
472 見かけの分子量と免疫学的反応、プログラムを用いた糖鎖付加部位分析を評価す
473 ることで確認した(参考文献 54)。

474

475 ①人工胃液に対する感受性

476 ア mVip3A たん白質

477 mVip3A たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウ
478 エスタンプロット分析で評価した。その結果、反応開始 1 分後には完全な
479 mVip3A たん白質のバンドは検出されなくなった(参考文献 55,56)。

480 イ APH4 たん白質

481 APH4 たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウエ
482 スタンプロット分析で評価した。その結果、反応開始 1 分後には APH4 たん
483 白質のバンドは検出されなくなった(参考文献 44,57)。

484 以上の結果から、mVip3A たん白質及び APH4 たん白質はともに人工胃液中で
485 容易に分解することが示された。

486

487 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

488 ア mVip3A たん白質

489 mVip3A たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウ
490 エスタンプロット分析で評価した。その結果、約 89 kDa の完全長 mVip3A
491 たん白質は反応開始後 5 分で検出されなくなり、約 62 kDa のポリペプチド
492 断片に速やかに分解した。約 62 kDa のポリペプチド断片も約 55 kDa の分
493 解物を生じながら徐々に分解し、SDS-PAGE 分析では 24 時間後ではほぼ検出
494 されなくなったものの、ウエスタンプロット分析では 48 時間後でも検出され
495 た。したがって、人工腸液中ではそれ以上の消化が進まないことが確認され
496 た(参考文献 56,58)。

497 イ APH4 たん白質

498 *E. coli* 過剰発現系由来の APH4 たん白質を用いて、人工腸液(SIF)中での
499 消化性を SDS-PAGE 分析とウエスタンプロット分析で評価した。その結果、
500 反応開始 5 分後で、完全長 APH4 たん白質は検出されず、ポリペプチド断片
501 のバンドも検出されなくなっていた。したがって、APH4 たん白質は人工腸
502 液中で容易に分解することが確認された(参考文献 44,57)。

503

504 ③加熱処理

505 ア mVip3A たん白質

506 加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、mVip3A たん白質の免
507 疫反応活性は高温になるに従って徐々に低下した。120 °C、30 分間の静置で
508 mVip3A たん白質の免疫反応活性は定量限界値以下になり、150 及び 170 °C、
509 30 分間の静置では免疫反応活性は検出されず、mVip3A たん白質は加熱処理
510 に対して安定でないことが示された(参考文献 59)。

511 イ APH4 たん白質

512 加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、APH4 たん白質の免疫
513 反応活性は 120 °C で 30 分の静置で 30% にまで低下し、170 °C では免疫反応
514 活性は検出されなかった(参考文献 60)。

515 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

516 ① mVip3A たん白質

517 mVip3A たん白質が酵素活性を持つとは考えられておらず、宿主の代謝系とは
518 独立して機能しており、代謝経路へ影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられ
519 た。

520 ② APH4 たん白質

521 APH4 たん白質は、アミノシクリトール系抗生物質であるハイグロマイシン B
522 の 4-ヒドロキシル基のリン酸化を特異的に触媒するが、宿主中には基質となり得
523 る物質が存在しないため、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと
524 考えられた。

525 (5) 宿主との差異に関する事項

526 COT102 ワタと従来ワタとの差異を評価するため、2001 年、2002 年及び 2007
527 年に COT102 ワタと対照の非組換えワタ品種 Coker312 の栽培試験を行い、両者
528 から収穫された種子を用いて、主要構成成分、ミネラル組成、ビタミン類、アミ
529 ノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質(ゴシポール及びシクロプロペノイド
530 脂肪酸)の分析を行った(参考文献 6,7)。

531 米国において、2001 年に 3 ヶ所、2002 年に 2 箇所のは場で栽培し、それぞれ
532 種子を収穫し、ビタミン E を除く各種成分の分析を行った。ビタミン E の分析に
533 は 2007 年に 6 箇所のは場で栽培し、収穫した種子を用いて分析を行った。各分
534 析結果については、COT102 ワタと対照の非組換えワタ間で分散分析による統計
535 処理を行った。各成分分析結果における供試材料間の統計学的有意性は、標準的
536 な F 検定により決定した。F 検定における確率が 5%未満 ($p < 0.05$) の場合を統
537 計学的に有意とした。

538 ① 種子における主要構成成分及びミネラル成分の分析結果

539 主要構成成分(水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、粗繊維、酸性デター
540 ジェント繊維、中性デタージェント繊維及び総食物繊維)の分析結果において、
541 COT102 ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) は認
542 められなかった。ミネラル成分(リン、カルシウム、ナトリウム、鉄、マグネシ
543 ウム、マンガン、カリウム、亜鉛、銅)について分析した結果、2002 年のカリ
544

547 ウム、亜鉛及び銅について統計学的有意差が認められたが、2001年の結果では
 548 有意差は認められなかったこと、表2のとおり、一般のワタ品種で報告されて
 549 いる文献値(参考文献 5,61)の範囲内であったことから、宿主と比較して差異は
 550 ないと考えられた。

551
 552

表2 有意差の認められたミネラルの分析結果

2002年	カリウム(mg/100g)	亜鉛(mg/100g)	銅(mg/100g)
COT102ワタ	1083	3.23	0.565
非組換えワタ	1094	3.68	0.659
F検定確率	<i>0.036^{ns}</i>	<i>0.014[*]</i>	<i>0.010[*]</i>
文献値の範囲	959-1417	1.78-6.3	0.4-5.4

553 1: 太字・斜体・アスタリスク(*)の数值は統計学的有意差があったことを示す(p<5%)

554

555 ② 種子におけるアミノ酸組成、ビタミン類及び脂肪酸組成の分析結果

556 アミノ酸について分析した結果、2002年のセリン(Ser)及びヒスチジン(His)
 557 について統計学的有意差が認められたが、2001年の結果では有意差は認められ
 558 ず栽培年度間で一貫した整合性は見られなかったことから、宿主と比較して差
 559 異はないと考えられた。また、セリンについては一般のワタ品種で報告されて
 560 いる文献値(503 - 1630 mg/100g)の範囲内であった。なお、2002年における
 561 セリンの分析値は、COT102ワタが1105 mg/100 g、非組換えワタが1180
 562 mg/100 g、ヒスチジンの分析値は、COT102ワタが1214 mg/100 g、非組換え
 563 ワタが1260 mg/100 gであった(参考文献 5,61)。

564

565 ビタミン類について、ビタミンEの分析を実施した結果、COT102ワタと対
 566 照の非組換えワタとの間で統計学的有意差(p<5%)は認められなかった。

567 脂肪酸組成の分析結果において、COT102ワタと対照の非組換えワタとの間
 568 で統計学的有意差(p<5%)は認められなかった。

569

570 ③ 種子における有害生理活性物質の分析結果

571 ワタの有害生理活性物質として知られているテルペノイド物質であるゴシポ
 572 ール(総ゴシポール及び遊離ゴシポール)及びシクロプロペノイド脂肪酸(ステル
 573 クリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステルクリン酸)について分析した。その
 574 結果、COT102ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差(p<5%)は認
 575 められなかった。

576

577 以上の結果から、COT102ワタの構成成分(主要構成成分、ミネラル組成、アミ
 578 ノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質)は、対照の非組換えワタと同程度で
 579 相違のないことが示された。

580

581 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

582 これまでに米国で行われた温室試験及び野外ほ場試験を通じて、COT102 ワタ
583 の生存・増殖能力(種子発芽率、生育初期の低温耐性、成体の越冬性及び種子の生
584 産量・脱粒性)は、対照の非組換えワタと同程度であることが観察されている。

585

586 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

587 6 (6) のとおり、COT102 ワタの生殖・増殖能力に対照の非組換えワタとの
588 間で差異は観察されておらず、したがって、生殖・増殖能力の制限要因は従来の
589 非組換えワタと同様であると考えられる。

590

591 (8) 不活化法に関する事項

592 COT102 ワタも従来の非組換えワタと同様に、物理的防除(耕耘)や化学的防除
593 (感受性を示す除草剤の使用)等、ワタを枯死させる従来の方法で不活化される。

594

595 (9) 外国における認可等に関する事項

596 米国食品医薬品庁 (FDA) より 2005 年 7 月に食品・飼料としての安全性が確
597 認された。

598 また、2005 年 7 月に米国農務省(USDA)へ無規制裁培の承認を得た。また、2008
599 年 6 月に米国環境保護庁(EPA)から COT102 ワタで発現している mVip3A たん
600 白質の許容値設定免除の承認を得ている。

601 カナダにおいては、2006 年 1 月にカナダ食品検査庁(CFIA)に飼料・環境の安
602 全性審査の申請を行った。

603 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)においては 2005 年
604 2 月に食品としての安全性の承認を受けた。

605

606 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

607 COT102 ワタと既存のワタとの相違は、COT102 ワタにチョウ目害虫に対する
608 抵抗性が付与されている点のみであり、栽培方法に関して既存のワタとの相違は
609 ない。

610

611 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

612 COT102 ワタ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
613 はない。なお、米国における開発段階のほ場試験に用いた COT102 ワタの種子は、
614 保存庫(4℃、40%相対湿度)で保管されている。

615

616 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
617 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
618 該当しない。

619

620 IV 審議結果

621 チョウ目害虫抵抗性ワタ COT102 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼

622 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
623 確認を行って差し支えないと判断された。

624 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A. and Koziel, M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy Of Sciences USA*, 93: 5389-5394.
- 2 Kaster, K.R., Burgett, S.G., Rao, R.N. and Ingolia, T.D. (1983) Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 11: 6895-6911.
- 3 Rao, R.N., Allen, N.E., Hobbs, Jr., J.N., Alborn, Jr., W.E., Kirst, H.A. and Paschal, J.W. (1983) Genetic and enzymatic basis of Hygromycin B Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 24: 689-695.
- 4 Waldron, C. (1997) Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants. United States Patent No. 5,668,298.
- 5 OECD (2009) Consensus Document on Compositional Consideration for New Varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. OECD Environment, Health and Safety Publications. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 11.
- 6 Syngenta Seeds Biotechnology Report #RA-COT102-1.
Study Title: Compositional Analysis of Cottonseed from Event COT102 Cotton Plants. (社外秘)
- 7 Syngenta Seeds Biotechnology Report #RA-COT102-2
Study Title: Determination of Vitamin E levels in Acid Delinted Cottonseed from Event COT102 Cotton Grown During 2007 in the USA (社外秘)
- 8 BUGWOOD (2007) Cotton Insects. GEORGIA IPM
(<http://gaipm.org/cotton/index.html>)
- 9 MSUcares (2009) Insect: Cotton, Overview of Cotton Insect Management in Mississippi. Mississippi State University Extension Service, Coordinated Access to the Research and Extension System
(<http://msucares.com/insects/cotton/overview.html>).
- 10 NCC (2007) National Cotton Council of America
(<http://www.cotton.org/tech/index.cfm>).
- 11 COT102 Insect Efficacy Evaluations (社外秘)
- 12 Niles, G.A. and Feaster, C. V. (1984) Breeding. In R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.) Cotton, Agronomy Monograph No. 24. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of

- America, Inc. Wisconsin, USA. pp.201-231.
- 13 Brubaker, C.L., Bourland, F.M. and Wendel, J.E. (1999) The Origin and Domestication of Cotton. *In* C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.) Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp3-31.
 - 14 Percival, A.E., Wendel, J.E. and Stewart, J.M. (1999) Taxonomy and Germplasm Resources. *In* C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.) Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp33-63.
 - 15 Smith, C.E. and Stephens, S.G. (1971) Critical identification of Mexican archaeological cotton remains. *Econ. Bot.*, 25: 160-168.
 - 16 Morgan, S.E (1989) Gossypol as a toxicant in livestock. *In* Burrows, G.E (ed) The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Philadelphia. W.B. Saunders. pp.251-262.
 - 17 APS (2007) Diseases of Cotton (*Gossypium* spp.). Common Names of Plant Diseases. American Phytopathological Society (<http://www.apsnet.org/online/common/names/cotton.asp>)
 - 18 IPM Center (2007) National Site for the USDA Regional IPM Centers Information System (<http://www.ipmcenters.org/cropprofiles/GetCropProfiles.cfm>)
 - 19 Martelli, G.P. (2001) Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J. Plant Pathol.*, 83: 37-46.
 - 20 原田重雄 (1990) 工芸作物学 II 繊維料 ワタ. 栗原浩 編. 農山漁村文化協会. pp26-42.
 - 21 Oosterhuis, D.M. and Jernstedt, J. (1999) Morphology and Anatomy of the Cotton Plant. *In* C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.) Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp175-206.
 - 22 Smith, C.W., Moser, H.S., Cantrell, R.G. and Oakley, S.R. (1999) History of Cultivar Development in the United States. *In* C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.) Cotton: Origin, History, Technology, and Production. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp99-171.
 - 23 FAOSTAT (2009) Food and Agriculture Organization (of the United Nations) (<http://faostat.fao.org/default.aspx?alias=faostatclassic>).
 - 24 農学大辞典 (1991) 第二次増改訂版. 野口弥吉, 川田信一郎 監修. 養賢堂. pp709-711.
 - 25 財務省貿易統計 (2009) <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>.
 - 26 農林水産省 (2009a) 油糧生産実績調査 (平成 20 年確報版). 農林水産省 : 農林水産施策について(統計) 加工食品 (<http://www.maff.go.jp/www/info/bunrui/mono09.html>).
 - 27 農林水産省 (2009b) 飼料月報 (概要) 平成 20 年度 4 月～ 3 月. 農林水産省 畜産部ホームページ 飼料

- (http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/index.html).
- 28 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-149-07 A2.
Study Title: Description of the Plasmid Lineage Culminating in pCOT1, a Plasmid Used in the Transformation Resulting in Event COT102 Cotton.
(社外秘)
 - 29 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-176-09 A1.
Study Title: Molecular Characterization of Transgenic DNA in Event COT102 Cotton for Japan. (社外秘)
 - 30 Fling, M.E., Kopf, J. and Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, 13: 7095-7106.
 - 31 An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S. and Meagher, R.B. (1996) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, 10:107-121.
 - 32 Norris, S.R, Meyer, S.E. and Callis, J. (1993) The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*, 21: 895-906.
 - 33 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. and Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular Applied Genetics*, 1: 561-573.
 - 34 Murray, E. E., Lotzer, J. and Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, 17: 477-498.
 - 35 Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N. and Chen, J.-S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4648-4657.
 - 36 Pardo, J.M., Malpartida, F., Rico, M. and Jimenez, A. (1985) Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus* – the producing organism. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1289-1298.
 - 37 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-001-02.
Study Title: QUANTIFICATION OF VIP3A AND APH4 PROTEINS IN COTTON TISSUES AND WHOLE PLANTS DERIVED FROM TRANSFORMATION EVENT “COT102” . (社外秘)
 - 38 MIR162VIP3A-0106 Single Dose Oral Toxicity Study In Mice. AM7543/Regulatory/Report. (社外秘)
 - 39 EFSA(2004) Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants (Question N EFSA-Q-2003-109). *The EFSA*

Journal, 48: 1-18

- 40 OGTR(2003) Risk Assessment and Risk Management Plan: Application for license for dealings involving intentional release of a genetically modified organism into the environment
([http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/dir034-3/\\$FILE/dir034finalrarm.pdf](http://www.health.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/Content/dir034-3/$FILE/dir034finalrarm.pdf)). DIR034/2003. Title: Field Trial of Genetically Modified Cotton (*Gossypium hirsutum*) Expressing an Insecticidal Gene (vip3A).
- 41 農林水産省 (2004) 抗菌性飼料添加物等の食品健康影響評価について. 農林水産省 消費・安全局 15 消安第 3980 号.
- 42 農林水産省 (2007) 農林水産省 第 18 回農業資材審議会飼料分科会配布資料 5
(http://www.maff.go.jp/j/council/sizai/siryou/18_17/pdf/data5.pdf)
- 43 農林水産省 (2009c) 動物等医薬品等データベース. 農林水産省 動物医薬品検査所 (http://www.nval.go.jp/asp/asp_dbDR_idx.asp).
- 44 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-147-07.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of Hygromycin B Phosphotransferase (Test Substance APH4-0102) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社外秘)
- 45 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-148-07.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of Hygromycin B Phosphotransferase (Test Substance APH4-0102) Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社外秘)
- 46 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-127-09.
Study Title: APH4 (Entrez Database Accession No. CAA85741) : Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社外秘)
- 47 Central Toxicology Laboratory Report#
CTL/AM7143/Regulatory/Report.
Study Title: APH4-0102: ACUTE ORAL TOXICITY OF APH4 PROTEIN IN THE MOUSE. (社外秘)
- 48 NCBI (2009) Entrez Protein Database. National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=protein>). Accessed January 14, 2009.
- 49 Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
- 50 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-128-09.
Study Title: Vip3Aa19 (Entrez Database Accession No. ABG20428): Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社外秘)
- 51 Customized Screening Report Prepared for : Syngenta Crop Protection, Inc.

- T/O 09-5956 August 28, 2009 (3T3). (社外秘)
- 52 Customized Screening Report Prepared for : Syngenta Crop Protection, Inc.
T/O 09-6080 August 28, 2009 (Caco-2). (社外秘)
- 53 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-057-09.
Study Title: Comparison of Vip3Aa19 Protein Expressed in Event COT102-Derived Cotton Plants and Vip3Aa19 Protein Expressed in Recombinant *Escherichia coli*. (社外秘)
- 54 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-142-10.
Study Title: Analysis of Hygromycin B Phosphotransferase (APH4) Protein Expressed in Event COT102-Derived Cotton and APH4 Protein Expressed in Recombinant *Escherichia coli* by Western Blot and Glycosylation Analysis. (社外秘)
- 55 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-173-07.
Study Title: *In Vitro* Digestibility of Vip3Aa19 as Contained in Test Substance VIP3A-0204 under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社外秘)
- 56 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-222-10.
Study Title: N-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of a 3 kDa Band Obtained from Simulated Mammalian Gastric Fluid Digestion of Microbially Produced Vip3Aa19. (社外秘)
- 57 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-221-10.
Study Title: N-Terminal Amino Acid Sequence Analysis of a 3 kDa Band Obtained from Simulated Mammalian Gastric Fluid Digestion of Microbially Produced Hygromycin B Phosphotransferase (APH4). (社外秘)
- 58 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-017-07.
Study Title: *In vitro* Digestibility of Vip3Aa19 under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社外秘)
- 59 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-023-07.
Study Title: Effect of Temperature on the Stability of Vip3Aa19 Protein. (社外秘)
- 60 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-153-07.
Study Title: Effect of Temperature on the Stability of Hygromycin B Phosphotransferase from Test Substance APH4-0102 as Assessed by Immunoreactivity. (社外秘)
- 61 ILSI (2006) International Life Sciences Institute (ILSI) Crop Composition Database version 3.0 (<http://www.cropcomposition.org/>). Search Criteria: Crop Type=Cotton - *Gossypium hirsutum*, Tissue Type=Fuzzy Seed, Crop Year=All, Country=All, State=All.

628

629