

1 「除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913 系統」に係る安全性確認

2
3
4 I はじめに

5 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913 系統（以下「MON88913 (*G.*
6 *barbadense*) 系統」という。）について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物
7 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
8 づき審議を行った。

9
10 II 確認対象飼料の概要

11 飼料名：除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913 系統

12 性 質：除草剤グリホサート耐性

13 申請者：日本モンサント株式会社

14 開発者：Monsanto Company

15
16 MON88913(*G. barbadense*) 系統は、*Gossypium hirsutum* L.を宿主として既に平
17 成 18 年 2 月 2 日に飼料としての安全性確認がなされている除草剤グリホサート耐性ワ
18 タ（改変 *cp4 epsps*, *G. hirsutum* L. (MON88913)）（以下、「MON88913(*G.*
19 *hirsutum*) 系統」という)に導入されている *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 5-
20 エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（改変 *cp4 epsps* 遺伝子）を、同
21 じワタ属の複 2 倍体であるが、別の種に分類される *G. barbadense* へ、戻し交配育種
22 により導入し作出した。

23 除草剤グリホサートは、芳香族アミノ酸生合成経路（シキミ酸合成経路）中の酵素
24 の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS) (E.C.2.5.1.19)
25 と特異的に結合してその活性を阻害、芳香族アミノ酸が不足した植物体は枯死する。
26 MON88913(*G. barbadense*) 系統は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子により、改変 5-エノール
27 ピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（改変 CP4 EPSPS たん白質）を発現する。グリ
28 ホサートは改変 CP4 EPSPS たん白質と結合することができないため、シキミ酸合成
29 経路が阻害されず、植物体は正常に芳香族アミノ酸を合成し、成長・生育することが
30 できる。

31 なお、MON88913(*G. barbadense*) 系統と既存のピマワタとの相違は、
32 MON88913(*G. barbadense*) 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサ
33 ートの影響を受けない点のみであり、有害生理活性物質の一つであるゴシポールを含
34 め、成分の種類や濃度は変化していない。

35 一般に、ピマ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。

36
37 III 審議内容

38 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

39 (1) 遺伝的素材に関する事項

40 MON88913(*G. barbadense*) 系統の宿主植物は *Gossypium barbadense* L.で
41 ある。MON88913(*G. barbadense*) 系統は、戻し交配育種法を用いて、
42 MON88913(*G. hirsutum*) 系統中の導入遺伝子以外の遺伝的背景を *G. hirsutum*
43 から *G. barbadense* に置き換えることにより作出されている。このことから、

44 MON88913 (*G. barbadense*) 系統中に導入されている改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、
45 2006 年 2 月 2 日に飼料としての安全性確認がなされている MON88913 (*G.*
46 *hirsutum*) 系統に導入されている改変 *cp4 epsps* 遺伝子と同一である(参考文献
47 1)。なお、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、土壌中及び植物の根圏に存在する微生物
48 類の一つである *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

49
50 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

51 MON88913 (*G. barbadense*) 系統の宿主は *G. barbadense* 種に属する商業栽
52 培ピマワタ品種である。主に綿実の搾油かすが牛、豚、鶏等の配合飼料の原料と
53 して用いられる他、綿実そのものも、乳牛用の飼料原料として利用される。

54
55 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

56 宿主植物であるピマワタ及び MON88913 (*G. barbadense*) 系統における、主要
57 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
58 素(ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸)全 52 成分の比較を行った結果、
59 安全性に影響を及ぼす差異は認められなかった(参考文献 2)。

60
61 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

62 MON88913 (*G. barbadense*) 系統と宿主との相違は、MON88913 (*G.*
63 *barbadense*) 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響
64 を受けずに生育できる点のみである。この点を除くと MON88913 (*G.*
65 *barbadense*) 系統は宿主と同じであり、既存種と比較して①収穫時期(成熟程度)
66 と貯蔵方法、②摂取(可食)部位、③摂取量、④調整及び加工方法についても全く
67 変わりはない。

68
69 以上(1)～(4)により、MON88913 (*G. barbadense*) 系統の飼料としての安
70 全性を評価するために、既存のピマワタを比較対照として用いる方法が適用でき
71 と判断された。

72
73 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

74 MON88913 (*G. barbadense*) 系統中には、MON88913 (*G. hirsutum*) 系統から戻
75 し交配育種法を用いて移入された 2 つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子により、除草剤グリ
76 ホサートに対する耐性が高まる。その結果、収穫時に問題となる雑草に対して、グ
77 リホサート散布が可能になる。このように、収穫期の雑草防除が可能となること
78 により、ワタ農家が機械で大規模収穫する際に混入する雑草に起因する綿毛(リント)
79 の汚色を防止し、より品質の高い綿毛を収穫することが可能となる。

80
81 3 宿主に関する事項

82 (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

83 宿主はアオイ科(Malvaceae)ワタ属(*Gossypium*)に属する複 2 倍体栽培ワタ
84 (*G. barbadense*)である。*G. barbadense* は *G. hirsutum* と共通の染色体構造を

85 持つ複 2 倍体(tetraploid: $2n = 4x = 52$)であり、遺伝的障壁はなく容易に交配で
86 きることが知られている(参考文献 3、4)。

87
88 (2) 遺伝的先祖に関する事項

89 ワタ属のうち栽培種は 4 種 (*G. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum*、*G.*
90 *barbadense*) に分けられる。

91 南米の北西部が原産地と考えられている *G. barbadense* は、超長繊維(Extra
92 Long Staple: ELS)の特性を有し、高級衣料素材として使用されている。一方、
93 飼料としての安全性確認が済んでいる MON88913(*G. hirsutum*) 系統の宿主で
94 ある *G. hirsutum* は、陸地ワタ(Upland cotton)と呼ばれ、中繊維の特性を有し、
95 全ワタ生産量の 90%を占め、衣料用素材として使用されている。両者は品種改良
96 を目的に頻繁に交配が行われてきた。遺伝的類似性も非常に高いと考えられてい
97 る(参考文献 5-7)。

98
99 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

100 ピマワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、この
101 生理活性物質は綿実を含むあらゆる植物組織の分泌器官に存在する(参考文献 8)。
102 ゴシポールは内臓器官や肺に炎症を起こし、実験動物においては呼吸困難、麻痺
103 を起こす毒性物質として知られている。また、ゴシポール含量は、一般的に *G.*
104 *barbadense*の方が *G. hirsutum*より高いことが知られているが、搾油工程の加
105 熱処理により無毒化されることが知られている(参考文献 9)。綿実油は圧搾法、
106 抽出法及び圧抽法により搾油されており、全ての方法において油腺を破壊させる
107 ための熱と圧力が用いられている(参考文献 10、11)。搾油工程中の熱、圧力及
108 び加湿により油腺が破壊されると、ゴシポールはたん白質やその他の物質と結合
109 し、毒性の少ない結合型となる(参考文献 12)。遊離型ゴシポールは単胃動物
110 にとって有害であることが知られているが、結合型ゴシポールは動物が利用でき
111 ない不活型のゴシポールであり、毒性は低いと考えられている。

112 また、搾油工程における大量のアルカリによる脱酸あるいは温度条件によつて
113 は、シクロプロペノイド脂肪酸(マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロス
114 テルクリン酸)が生じることがある。シクロプロペノイド脂肪酸は、生殖・繁殖
115 力に有害な影響を及ぼすとされているが、搾油工程における脱臭処理によって著
116 しく減少するため、問題にはならない(参考文献 13)。

117
118 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

119 ピマワタは種子植物であり、それを食する家畜等や他の生物に寄生または定着
120 することはない。

121 (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

122 ピマワタに感染する病原体は知られているが、家畜等に対する病原性はもたな
123 いことが知られている。

124
125 (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

126 ピマワタは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低く、MON88913 (*G.*
127 *barbadense*) 系統もその特性は同様であると考えられる。

128
129 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

130 現在栽培されているピマワタは、雄ずいと雌ずいの生殖器官を1つの花に有す
131 る両性植物である。ピマワタは主に自家受粉によって種子が作られる。遺伝的に
132 は他のワタとの他家受粉は可能であるが、他の植物種とは交雑しない。花粉は重
133 いため風媒は起こりにくく、ハチによる虫媒はわずかに起こる。我が国における
134 ワタの栽培はごく僅かであり、観賞用に栽培されているに過ぎない。

135
136 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

137 現在、ピマワタを含め、ワタは繊維原料として実綿(綿毛のついた種子)から綿
138 毛が、綿毛を分離したあとの種子(綿実)から食用油、油かす及びリントが生産さ
139 れている。一般に綿実重量比で、油が16%、油かすが45%、リントが9%となっ
140 ており、残りは種子殻及び生産時に生じるロス分である(参考文献14)。ワタは
141 飼料分野では主として油かすの形態で利用されている。綿実油かすは、乳牛、養
142 豚、肉牛用として配合飼料の原料として用いられている。また綿実そのものも、
143 乳牛に給与されている(参考文献15)。

144 2008年における綿実油かすの輸入量は約5,086トンであった(参考文献16)。
145 2007年度には、約6,061トンの綿実油かすが配合飼料の原料として用いられて
146 いる。その内訳は、乳牛用として98.7%、豚用として0.5%、肉牛用として0.7%
147 となっている(参考文献17)。

148
149
150 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

151 上記(3)のとおり、ピマワタにはゴシポール等の有害生理活性物質が存在す
152 ることが知られているが、上記(8)のとおり、ピマワタは利用形態ごとに飼料
153 として安全に利用されている。

154
155 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

156 ピマワタは種子繁殖する植物であり、その生育には高温、高照度、低土壌水分
157 条件を好む。生存・増殖能力は、栽培される地域の気候条件あるいは生育期の気
158 象条件に左右されている。また、種子の自然条件下での寿命は短く、土壌温度が
159 15~16℃に達する前に播種されると、土壌中でほとんど腐敗してしまう(参考文
160 献18)。ピマワタは耕転や感受性を示す除草剤の使用により防除される。よって
161 雑草化する可能性は無いものと考えられる。

162
163 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

164 ワタ属と交雑可能な近縁植物は存在せず、日本においては商業的栽培されてい
165 ない。

166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199

4 ベクターに関する事項

MON88913(*G. barbadense*)系統は、2006年2月2日に飼料としての安全性確認がなされている除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913(*G. hirsutum*) 系統に導入されている改変 *cp4 epsps* 遺伝子を、戻し交配育種により同じワタ属の複2倍体であるが、別の種に分類される *G. barbadense* に導入することにより作出された。そのため、ベクターに関する以下の(1)～(7)の事項については既に安全性の確認が済んでいる。

- (1) 名称及び由来に関する事項
- (2) 性質に関する事項
- (3) 薬剤耐性に関する事項
- (4) 伝達性に関する事項
- (5) 宿主依存性に関する事項
- (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項
- (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

5 挿入遺伝子に関する事項

MON88913(*G. barbadense*)系統は、2006年2月2日に飼料としての安全性確認がなされている除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913(*G. hirsutum*) 系統に導入されている改変 *cp4 epsps* 遺伝子を、戻し交配育種により同じワタ属の複2倍体であるが、別の種に分類される *G. barbadense* に導入することにより作出された。そのため、挿入遺伝子に関する、(1) 供与体に関する事項、(3) 構造に関する事項、(4) 性質に関する事項及び(5) 純度に関する事項については既に安全性の確認が済んでいる。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

MON88913(*G. barbadense*)系統ピマワタは、MON88913(*G. hirsutum*)に非組換え *G. barbadense* の商業品種を掛け合わせた F1 雑種に、当該商業品種を合計で4回戻し交配を繰り返した後、その後代をさらに別の *G. barbadense* の商業品種と3回掛け合わせた後、自殖を行った。導入遺伝子のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代をほ場における農業形質評価の対象とした。挿入された遺伝子の性質について表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
P-FMV/TSF1 による制御される <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-FMV/TSF 1	シロイヌナズナ TSF1 プロモーターにゴマノハモザイクウイルス 35S プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター。目的遺伝子の生殖器官及び栄養器官での恒常的発現に寄与する。

L-TSF1	翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードするシロイヌナズナ TSF1 遺伝子のリーダー配列 (exon 1)。目的遺伝子の発現を高める。
I-TSF1	翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードするシロイヌナズナ TSF1 遺伝子のイントロン配列。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4 EPSPS たん白質を輸送するシロイヌナズナ EPSPS 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS たん白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に変更を加えたもの。
T-E9	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域。mRNA の転写を集結させ、ポリアデニル化を誘導する。
P-35S/ACT8 により制御される <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-35S/ACT8	シロイヌナズナ ACT8 プロモーターにカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター。目的遺伝子の栄養器官での恒常的発現に寄与する。
L-ACT8	シロイヌナズナの ACT8 遺伝子のリーダー配列。目的遺伝子の発現を高める。
I-ACT8	シロイヌナズナの ACT8 遺伝子のイントロンと、その近傍のエクソン配列。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4 EPSPS たん白質を輸送するシロイヌナズナ EPSPS 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。
改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS たん白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に変更を加えたもの。
T-E9	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3' 非翻訳領域。mRNA の転写を集結させ、ポリアデニル化を誘導する。

200

201

(6) 安定性に関する事項

202

203

204

205

206

207

MON88913 (*G. baebadense*) 系統の 3 世代の自殖後代について、各世代における挿入遺伝子の安定性を確認するためにサザンブロット分析を行った。その結果、すべての世代から挿入遺伝子に由来するバンドが検出され、複数世代における安定性を確認できた。また、ウェスタンブロット分析を行った結果、すべての世代から改変 CP4 EPSPS たん白質が検出され、複数世代で正常に発現していることが確認できた。

208

209

210

以上の結果から MON88913 (*G. barbadense*) 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 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 19)。

211

(7) コピー数に関する事項

212 既に飼料としての安全性確認がされている MON88913 (*G.hirsutum*) 系統にお
213 いては、ゲノム中 1 箇所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確
214 認されている。上記 5 の (6) 安定性に関する事項のとおり、
215 MON88913 (*G.barbadense*) 系統においても、当該 T-DNA 領域は安定して遺伝し
216 ている (参考文献 20)。

217
218 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

219 MON88913 (*G. barbadense*) 系統における改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量
220 について、2007 年に米国の 5 カ所のほ場から採取した葉及び種子サンプルを供し
221 て ELISA 法により測定した。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質の葉における
222 発現量の範囲は 1800~3200 µg/g dwt (平均値 2400 µg/g dwt)、種子における発
223 現量の範囲は 200~450 µg/g dwt (平均値 360 µg/g dwt) であった (参考文献 21)。
224

225 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

226 MON88913 (*G. barbadense*) 系統には導入されていない。
227

228 (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
229 に関する事項

230 既に飼料としての安全性確認がされている MON88913 (*G.hirsutum*) 系統には、
231 目的以外のたん白質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていな
232 いことが確認されている。同様に、従来育種法を用いて作出された
233 MON88913 (*G.barbadense*) 系統にも、目的以外のたん白質を発現するオープン
234 リーディングフレームは含まれていないと考えられる。
235

236 6 組換え体に関する事項

237 (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

238 MON88913 (*G. barbadense*) 系統と宿主との相違は、MON88913 (*G.*
239 *barbadense*) 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響
240 を受けずに生育できる点のみである。この点を除けば、MON88913 (*G.*
241 *barbadense*) 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、
242 飼料としての利用方法も変わらない。
243

244 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

245 MON88913 (*G. barbadense*) 系統中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質は、
246 MON88913 (*G. hirsutum*) 系統中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質と同一
247 である。

248 改変 CP4 EPSPS たん白質が既知の毒性たん白質と構造相同性を有していない
249 こと、急性的に毒性を示すとは考えにくいことは、既に安全性確認がされている
250 MON88913 (*G. hirsutum*) 系統の評価の際に、データベースを用いた既知毒素と
251 のアミノ酸配列の比較及びマウスを用いた急性経口投与試験により確認されて

252 いる。同様に、従来育種法を用いて作出された MON88913 (*G. barbadense*) 系統
253 が発現する改変 CP4 EPSPS たん白質についても、毒性を有するとは考えられな
254 い。

255

256 (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

257 MON88913 (*G. hirsutum*) 系統中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質が消化
258 や熱処理に対して不安定であることは MON88913 (*G. hirsutum*) 系統の評価の
259 際に、①人工胃液、②人工腸液及び③加熱処理のそれぞれに対する感受性を試験
260 することにより確認されている。従来育種法を用いて作出された
261 MON88913 (*G. barbadense*) 系統が発現する改変 CP4 EPSPS たん白質につい
262 ても、物理化学的処理に対する感受性は同様であり、従来の方法で確実に失活・消
263 化すると考えられる (参考文献 1)。

264

265 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

266 EPSPS たん白質は、芳香族アミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路を触媒す
267 る。シキミ酸経路は、植物が固定する炭素の 5 分の 1 に関与していると推測され
268 ており、代謝において重要な経路とされている (参考文献 22、23)。本経路に
269 おける炭素の流れは、経路の第 1 段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツ
270 ロン酸-7-リン酸 (DAHP) 合成酵素の活性による調節を受け制御されることが証
271 明されているが、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階は、中間代謝物
272 質や最終生成物によって阻害・抑制されることはほとんどないことが知られてい
273 る (参考文献 24、25)。これらのことは、EPSPS たん白質が本経路における律
274 速酵素ではないことを示唆する。従って、仮に EPSPS たん白質活性が増加した
275 としても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高くなることはない
276 と推測された。また実際に MON88913 (*G. barbadense*) 系統の芳香族アミノ酸濃
277 度について非組換えピマワタと比較した結果、同等性が確認された。

278 また、EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-
279 リン酸 (S3P) と特異的に反応することが知られている。PEP と S3P 以外に唯
280 一 EPSPS たん白質と反応することが報告されているのは、S3P の類似体である
281 シキミ酸のみで、EPSPS たん白質と反応する PEP の類似体はない (参考文献
282 26)。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応
283 性のおよそ 200 万分の 1 であり、シキミ酸が *in planta* で EPSPS たん白質と反
284 応することはないと考えられる。

285

286 (5) 宿主との差異に関する事項

287 2007 年に米国の 5 箇所のは場において栽培された MON88913 (*G.*
288 *barbadense*) 系統、対照の非組換えピマワタ及び 8 品種の商業ワタ品種について、
289 アミノ酸組成、脂肪酸組成 (C14-C22)、シクロプロペノイド脂肪酸 (マルバリン酸、
290 ステルクリン酸、ジヒドロステルクリン酸)、繊維質 {酸性デタージェント繊維
291 (ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF)}、ミネラル (カルシウム、銅、鉄、マグ

292 ネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛)、主要構成成分(たん
293 白質、脂質、灰分及び水分)、ビタミン E、ゴシポールの合わせて 52 項目につい
294 て成分分析を行った。

295 その結果、すべての項目の分析値が従来ピマワタ品種の変動の範囲内であり、
296 分析を行った主要構成成分及び栄養阻害物質に関して、MON88913(*G.*
297 *barbadense*)系統と非組換えピマワタは同等であると考えられた(参考文献 2)。
298

299 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

300 2007 年に MON88913(*G. barbadense*)系統のほ場試験を米国で行い、
301 MON88913(*G. barbadense*)系統の生存・増殖能力が対照の非組換えピマワタと
302 同等であることを確認した。
303

304 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

305 上述のように、MON88913(*G. barbadense*)系統の生存及び増殖能力は対照の
306 非組換えピマワタと同等であることから、生存及び増殖能力の制限についても両
307 者の間に相違はないと考えられる。
308

309 (8) 不活化法に関する事項

310 MON88913(*G. barbadense*)系統は、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性
311 を示す除草剤の使用)など、ピマワタを枯死させる従来の方法で不活化される。
312

313 (9) 外国における認可等に関する事項

314 米国では遺伝子組換え作物の形質を従来 of 交配育種法を用いて異なる種に導
315 入する場合新たな規制の対象とはならない。米国食品医薬品局(FDA)により
316 2006 年 8 月に飼料について承認されている MON88913(*G. hirsutum*)系統の承
317 認の範囲に、MON88913(*G. barbadense*)系統が含まれるとの確認がなされた。

318 欧州食品安全機関(EFSA)へ 2007 年 4 月に MON88913(*G. hirsutum*)系統
319 の承認の範囲に、MON88913(*G. barbadense*)系統を追加し、MON88913(*G.*
320 *hirsutum*)系統の再登録の申請を行った。

321 カナダ食品検査局(CFIA)により 2008 年 10 月に *G. hirsutum* と *G.*
322 *barbadense* の同等性に関する資料を提出し、飼料としての安全性が確認された。

323 オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)において、*G.*
324 *hirsutum* と *G. barbadense* は区別されていないため、新たに食品として
325 MON88913(*G. barbadense*)系統の安全性を確認する必要はない。
326

327 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

328 MON88913(*G. barbadense*)系統と従来 of ピマワタとの栽培方法における違
329 いは、MON88913(*G. barbadense*)系統では除草剤グリホサートに対して耐性を
330 示す点のみである。それ以外は、従来 of 栽培方法と相違はない。
331

332 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項
333 MON88913 (*G. barbadense*) 系統の種子の製法及び管理方法は従来のピマワ
334 タと同様である。

335

336 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
337 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
338 該当しない。

339

340 IV 審議結果

341 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913 系統について、「組換え DNA 技術応
342 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
343 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。

344

345 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 系統の安全性評価 ー要旨ー (社内レポート)
- 2 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913 (*G. barbadense*) 系統における構成成分の分析 : MSL-0021809 (社外秘) (社内レポート)
- 3 Percival, A. E., J.F. Wendel, and J.M. Stewart. (1999) Taxonomy and Germplasm Resources, in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. Pp 33-63. Smith, W.C. (ed.). John Wiley and Sons, Inc.
- 4 Pillay, M and Myers, G.O., Genetic Diversity in Cotton Assessed by Variation in Ribosomal RNA Genes and AFLP Markers, Crop Sci. 39 (6) 1881. (1999)
- 5 Yuan, Y.L., Chen, Y.H., Tang, C.M., Jing, S.R., Liu, S.L., Pan, J.J., Koher, R.J., Zhang, T.Z. (2000) Effects of the dominant glandless gene Gl2e on agronomic and fibre characters of Upland cotton. Plant breeding 119: 59-64
- 6 Wang, L., Dong, M., Paterson, A.H. (1995) The distributin of *Gossypium hirsutum* chromatin in *G.barbadense* germ plasm: molecular analysis of ontrogressive plant breeding. TAG Theoretical and Applied Genetics V91: 1153-1161.
- 7 Khan, S.A., Hussain, D., Askari, E., Steward, J.M., Malik,K.A., Zafar,Y. (2000) Molecular phylogeny of *Gossypiym* species by DNA fingerprinting. Theoretical and Applied Genetics 101: 931-938.
- 8 Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. Residue Review 61:126-160.
- 9 生化学辞典、東京化学同人、1990.
- 10 NCPA. (1993) Cottonseed Oil. L.A.Jones and C.C.King eds. National Cottonseed Products Association, Inc., and The Cotton Foundation. Pp.1-60.
- 11 Martin, S. D. 1990. "Gossypol effects in animal feeding can be controlled." Feedstuffs. Vol 62, No 33.
- 12 Hron, R.J. Sr., Kuk, M.S., and Wan, P.J. 1996. Quick method for estimating free gossypol in cottonseed, meats, collets, and extracted meals. J. Amer. Oil Chem. Soc.. 73. 2. 199-202

- 13 Phelps, R.A., F.S. Shenstone, R.J. Kemmerer, and R.J. Evans. 1965. A Review of Cyclopropenoid Compounds: Biological Effects of some Derivatives. *Poult.Sci.* 44: 358-394.
- 14 Cherry, J.P. and H.R. Leffler. 1984. Seed. In Cotton, Kohel, R.J. and Lewis, C.F., eds. *Amer. Soc. Agron.* Madison, WI. Chapter 13, p 511-569.
- 15 新編 飼料ハンドブック、日本科学飼料協会、1998年
- 16 日本貿易月表、大蔵省編、日本関税協会、平成20年12月号、2008.
- 17 飼料月報、平成20年8月、農林水産省生産局畜産部畜産振興課編 社団法人配合飼料供給安定機構発行
- 18 Hughes, H.D. and E.R. Nelson. 1957. *Crop Production, Principles and Practices.* The MacMillian Company, New York.
- 19 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913(*G. barbadense*)系統の発現たん白質の複数世代間での発現の安定性：MSL-0021860(社外秘) (社内レポート)
- 20 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913(*G. barbadense*)系統中における導入遺伝子の複数世代での安定性：MSL-0022369(社外秘) (社内レポート)
- 21 除草剤グリホサート耐性ピマワタ MON88913(*G. barbadense*)系統中の改変CP4 EPSPSたん白質の発現量：MSL-0021554(社外秘) (社内レポート)
- 22 Haslam,E. 1974. *The Shikimate Pathway.* John Wiley and Sons, New York, New York.
- 23 Haslam,E. 1993. *Shikimic Acid : Metabolism and Metabolites,* John Wiley and Sons, Chichester, England.
- 24 Herrmann,K.M. 1983. The Common Aromatic Biosynthetic Pathway. In *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation.* K.M.Herrmann and R.L.Somerville, eds. Addison-Wesley, Reading, MA. 301-322.
- 25 Weiss,U. and J.M.Edwards. 1980. Regulation of the Shikimate Pathway. In *The Biosynthesis of Aromatic Compounds.* John Wiley and Sons, New York. pp287-301.
- 26 Gruys,K.J., M.C.Walker, and J A.Sikorski. 1992. Substrate Synergism and the Steady-State Kinetic Reaction Mechanism for EPSP Synthase from *E. coli.* *Biochem.* 31, 5534-5544.

346

347

1

2
3 「チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985 系統」に係る安全性確認(案)
4

5 I はじめに

6 チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985 系統 (以下「15985 (*G. barbadense*) 系統」と
7 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
8 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。
9

10 II 確認対象飼料の概要

11 飼料名 : チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985 系統

12 性 質 : チョウ目害虫抵抗性

13 申請者 : 日本モンサント株式会社

14 開発者 : Monsanto Company
15

16 15985(*G. barbadense*) 系統は、*Gossypium hirsutum* L.を宿主とし、既に平成 15
17 年 3 月 27 日に飼料としての安全性確認がなされているチョウ目害虫抵抗性ワタ (以下、
18 「15985(*G. hirsutum*) 系統」という)に導入されている改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変
19 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子を、同じワタ属の複 2 倍体である
20 が、別の種に分類される *G. barbadense* へ、戻し交配育種により導入し作出した。

21 改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の供与体は、*Bacillus thuringiensis*
22 subsp. *kurstaki* (*B.t.k.*)であり、発現する改変 *Cry1Ac* たん白質及び *Cry2Ab2* たん白
23 質が、標的昆虫の中腸上皮に存在する受容体と特異的に結合し、生体膜に陽イオン透
24 過性小孔を形成し、消化プロセスを阻害することにより、オオタバコガ、タバコガ、
25 ワタキバガ、ヨトウムシ等のチョウ目害虫に対する抵抗性が付与される。また、改変
26 *uidA* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子は、*Escherichia coli* 由来であり、選択マーカーとして利
27 用された。これらの遺伝子は、これまでに多くの遺伝子組換え作物において選択マー
28 カーとして使用されており、安全性に問題がないことが確認されている。

29 なお、15985(*G. barbadense*) 系統と既存のピマワタとの相違は、15985(*G.*
30 *barbadense*) 系統が改変 *Cry1Ac* たん白質及び改変 *Cry2Ab2* たん白質の発現によりチ
31 ョウ目害虫に対する抵抗性を有する点のみであり、有害生理活性物質の一つであるゴ
32 シポールを含め、成分の種類や濃度は変化していない。

33 一般に、ピマ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。
34

35 III 審議内容

36 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

37 (1) 遺伝的素材に関する事項

38 15985(*G. barbadense*) 系統の宿主植物は *G. barbadense* L.である。15985(*G.*
39 *barbadense*) 系統は、戻し交配育種法を用いて、15985 (*G. hirsutum*) 系統中
40 の導入遺伝子以外の遺伝的背景を *G. hirsutum* から *G. barbadense* に置き換える
41 ことにより作出されている。このことから、15985(*G. barbadense*) 系統中に導

42 入されている改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び
43 *npt II* 遺伝子は、2003年3月27日に飼料としての安全性確認がなされている
44 15985 (*G. hirsutum*) 系統に導入されている改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変 *cry2Ab2*
45 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子と同一である(参考文献1、2)。
46 なお、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、土壤中に一般的に存在す
47 るグラム陽性菌である *B. thuringiensis subsp. kurstaki* に由来し、改変 *uidA* 遺
48 伝子及び *npt II* 遺伝子は、*E. coli* K-12 株に由来する。

50 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

51 15985 (*G. barbadense*) 系統の宿主は *G. barbadense* 種に属する商業栽培ピマ
52 ワタ品種である。主に綿実の搾油かすが牛、豚、鶏等の配合飼料の原料として用
53 いられる他、綿実そのものも、乳牛用の飼料原料として利用される。

54
55 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

56 宿主植物であるピマワタ及び 15985 (*G. barbadense*) 系統における、主要構成
57 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
58 シポール及びシクロプロペン脂肪酸)全 52 成分の比較を行った結果、安全性に
59 影響を及ぼす差異は認められなかった(参考文献3)。

60
61 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

62 15985 (*G. barbadense*) 系統と宿主との相違は、15985 (*G. barbadense*) 系統が
63 改変 *Cry1Ac* たん白質及び改変 *Cry2Ab2* たん白質の発現によりチョウ目害虫に
64 対する抵抗性を有する点のみである。この点を除くと 15985 (*G. barbadense*) 系
65 統は宿主と同じであり、既存種と比較して①収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法、②
66 摂取(可食)部位、③摂取量、④調整及び加工方法についても全く変わりはない。

67
68 以上(1)～(4)により、15985 (*G. barbadense*) 系統の飼料としての安全性を
69 評価するために、既存のピマワタを比較対照として用いる方法が適用できると判断
70 された。

71
72 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

73 15985 (*G. barbadense*) 系統中には、15985 (*G. hirsutum*) 系統から戻し交配育
74 種法を用いて移入された改変 *Cry1Ac* たん白質及び改変 *Cry2Ab2* たん白質の発現に
75 より、標的となるピマワタの主要チョウ目害虫に対して相乗的な防除効果が得られ
76 る。改変 *Cry1Ac* たん白質と改変 *Cry2Ab2* たん白質は殺虫スペクトラムが比較的重
77 複しており、両 *Bt* たん白質に対して感受性を示すチョウ目害虫はそれぞれの *Bt* た
78 ん白質に対して抵抗性を獲得しなければ抵抗性害虫になれないため、抵抗性害虫の
79 発生を回避できる。

80
81 3 宿主に関する事項

82 (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

83 宿主はアオイ科 (Malvaceae) ワタ属 (*Gossypium*) に属する複 2 倍体栽培ワタ
84 (*G. barbadense*) である。*G. barbadense* は *G. hirsutum* と共通の染色体構造を
85 持つ複 2 倍体 (tetraploid: $2n = 4x = 52$) であり、遺伝的障壁はなく容易に交配で
86 きることが知られている (参考文献 4、5)。

87
88 (2) 遺伝的先祖に関する事項

89 ワタ属のうち栽培種は 4 種 (*G. herbaceum*、*G. arboreum*、*G. hirsutum*、*G.*
90 *barbadense*) に分けられる。

91 南米の北西部が原産地と考えられている *G. barbadense* は、超長繊維 (Extra
92 Long Staple: ELS) の特性を有し、高級衣料素材として使用されている。一方、
93 飼料としての安全性確認が済んでいる 15985 (*G. hirsutum*) 系統の宿主である
94 *G. hirsutum* は、陸地ワタ (Upland cotton) と呼ばれ、中繊維の特性を有し、全
95 ワタ生産量の 90% を占め、衣料用素材として使用されている。両者は品種改良を
96 目的に頻繁に交配が行われてきた。遺伝的類似性も非常に高いと考えられている
97 (参考文献 6、7)。

98
99 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

100 ピマワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、この
101 生理活性物質は綿実を含むあらゆる植物組織の分泌器官に存在する (参考文献 8)。
102 ゴシポールは内臓器官や肺に炎症を起こし、実験動物においては呼吸困難、麻痺
103 を起こす毒性物質として知られている。また、ゴシポール含量は、一般的に *G.*
104 *barbadense* の方が *G. hirsutum* より高いことが知られているが、搾油工程の加
105 熱処理により無毒化されることが知られている (参考文献 9)。綿実油は圧搾法、
106 抽出法及び圧抽法により搾油されており、全ての方法において油腺を破壊させる
107 ための熱と圧力が用いられている (参考文献 10、11)。搾油工程中の熱、圧力及
108 び加湿により油腺が破壊されると、ゴシポールはたん白質やその他の物質と結合
109 し、毒性の少ない結合型となる (参考文献 12)。遊離型ゴシポールは単胃動物
110 にとって有害であることが知られているが、結合型ゴシポールは動物が利用でき
111 ない不活型のゴシポールであり、毒性は低いと考えられている。

112 また、搾油工程における大量のアルカリによる脱酸あるいは温度条件によっ
113 ては、シクロプロペノイド脂肪酸 (マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロス
114 テルクリン酸) が生じることがある。シクロプロペノイド脂肪酸は、生殖・繁殖
115 力に有害な影響を及ぼすとされているが、搾油工程における脱臭処理によって著
116 しく減少するため、問題にはならない (参考文献 13)。

117
118 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

119 ピマワタは種子植物であり、それを食する家畜等や他の生物に寄生または定着
120 することはない。

121 (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

122 ピマワタに感染する病原体は知られているが、家畜等に対する病原性はもたな
123 いことが知られている。

124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163

(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

ピマワタは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低く、15985 系統もその特性は同様であると考えられる。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

現在栽培されているピマワタは、雄ずいと雌ずいの生殖器官を1つの花に有する両性植物である。ピマワタは主に自家受粉によって種子が作られる。遺伝的には他のワタとの他家受粉は可能であるが、他の植物種とは交雑しない。花粉は重いため風媒は起こりにくく、ハチによる虫媒はわずかに起こる。我が国におけるワタの栽培はごく僅かであり、観賞用に栽培されているに過ぎない。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

現在、ピマワタは、繊維原料として実綿(綿毛のついた種子)から綿毛が、綿毛を分離したあとの種子(綿実)から食用油、油かす及びリントが生産されている。一般に綿実重量比で、油が16%、油かすが45%、リントが9%となっており、残りは種子殻及び生産時に生じるロス分である(参考文献14)。ワタは飼料分野では主として油かすの形態で利用されている。綿実油かすは、乳牛、養豚、肉牛用として配合飼料の原料として用いられている。また綿実そのものも、乳牛に給与されている(参考文献15)。

2008年における綿実油かすの輸入量は約5,086トンであった(参考文献16)。2007年度には、約6,061トンの綿実油かすが配合飼料の原料として用いられている。その内訳は、乳牛用として98.7%、豚用として0.5%、肉牛用として0.7%となっている(参考文献17)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

上記(3)のとおり、ピマ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、ピマ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

ピマワタは種子繁殖する植物であり、その生育には高温、高照度、低土壌水分条件を好む。生存・増殖能力は、栽培される地域の気候条件あるいは生育期の気象条件に左右されている。また、種子の自然条件下での寿命は短く、土壌温度が15~16°Cに達する前に播種されると、土壌中でほとんど腐敗してしまう(参考文献18)。ピマワタは耕転や感受性を示す除草剤の使用により防除される。よって雑草化する可能性は無いものと考えられる。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

164 ワタ属と交雑可能な近縁植物は存在せず、日本においては商業的栽培されてい
165 ない。

166

167 4 ベクターに関する事項

168 15985 (*G. barbadense*) 系統は、2003年3月27日に飼料としての安全性確認が
169 なされているチョウ目害虫抵抗性ワタ 15985 (*G. hirsutum*) 系統に導入されている
170 改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子を、
171 戻し交配育種により同じワタ属の複 2 倍体であるが、別の種に分類される *G.*
172 *barbadense* に導入することにより作出された。そのため、ベクターに関する以下の
173 (1) ~ (7) の事項については既に安全性の確認が済んでいる。

- 174 (1) 名称及び由来に関する事項
- 175 (2) 性質に関する事項
- 176 (3) 薬剤耐性に関する事項
- 177 (4) 伝達性に関する事項
- 178 (5) 宿主依存性に関する事項
- 179 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項
- 180 (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

181

182 5 挿入遺伝子に関する事項

183 15985 (*G. barbadense*) 系統は、2003年3月27日に飼料としての安全性確認が
184 なされているチョウ目害虫抵抗性ワタ 15985 (*G. hirsutum*) 系統に導入されている
185 改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子を、
186 戻し交配育種により同じワタ属の複 2 倍体であるが、別の種に分類される *G.*
187 *barbadense* に導入することにより作出された。そのため、挿入遺伝子に関する、(1)
188 供与体に関する事項、(3) 構造に関する事項、(4) 性質に関する事項及び(5)
189 純度に関する事項については既に安全性の確認が済んでいる。

190

191 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

192 15985 (*G. barbadense*) 系統ピマワタは、15985 (*G. hirsutum*) に非組換え
193 *G. barbadense* の商業品種を掛け合わせた F1 雑種に、当該商業品種を合計で 6
194 回戻し交配を繰り返した後、自殖により固定することで作出された。導入遺伝子
195 のホモ接合性を確認し、選抜された個体の後代をほ場における農業形質評価の対
196 象とした。挿入された遺伝子の性質について表 1 にまとめた。

197

198

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
改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット	
<i>E35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来のプロモーター配列。 (プロモーター：転写の開始に関与する領域。)

改変 <i>cry1Ac</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-73 株の <i>cry1Ac</i> 遺伝子の一部を改変した配列。改変 Cry1Ac たん白質を発現する領域。
7S 3'	ダイズの β -conglycinin 遺伝子の 3' 非翻訳領域であり、mRNA のポリアデニル化シグナルを含むターミネーター配列。 (ターミネーター：転写を終結させる領域。)
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット	
35S	CaMV の 35S プロモーター配列
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> K-12 株のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II を発現し、スペクチノマイシン、ストレプトマイシンに対する耐性を付与することで、選抜マーカーとして利用する。
NOS3'	ノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域であり、ターミネーター配列として機能。
改変 <i>uidA</i> 遺伝子発現カセット	
P-e35S	CaMV の 35S プロモーター配列
改変 <i>uidA</i>	<i>E. coli</i> のプラスミド pUC19 の <i>uid</i> 遺伝子の一部を改変した配列。改変 GUS たん白質を発現することで、選抜マーカーとして利用する。
NOS3'	ノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域であり、ターミネーター配列として機能。
改変 <i>cry2Ab2</i> 遺伝子発現カセット	
P-e35S	CaMV の 35S プロモーター配列
PetHSP70 leader	ペチュニアの <i>hsp70</i> (熱ショックたん白質) の 5' 非翻訳領域。
AEPSPS/CT P2	<i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS 遺伝子由来の N 末端葉緑体輸送ペプチドをコードする配列
改変 <i>cry2Ab</i>	<i>B. thuringiensis</i> の <i>cry2Ab</i> 遺伝子の一部を改変した配列。改変 Cry2Ab たん白質を発現する領域。
NOS3'	ノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域であり、ターミネーター配列として機能。

199

200

(6) 安定性に関する事項

201

202

203

204

205

206

207

208

15985 (*G. baebadense*) 系統の 3 つの自殖後代について、各世代における挿入遺伝子の安定性を確認するためにサザンブロット分析を行った。その結果、すべての世代から挿入遺伝子に由来するバンドが検出され、複数世代における安定性を確認できた。また、ウェスタンブロット分析を行った結果、すべての世代から改変 CP4 EPSPS たん白質が検出され、複数世代で正常に発現していることが確認できた (参考文献 19、20)。

以上の結果から 15985 (*G. barbadense*) 系統に導入された改変 *cry1Ac* 遺伝子、改変 *cry2Ab2* 遺伝子、改変 *uidA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が後代世代に安定して

209 遺伝していることが示された。

210

211 (7) コピー数に関する事項

212 既に飼料としての安全性確認がされている 15985 (*G.hirsutum*) 系統において
213 は、ゲノム中に改変 *cry1Ac* 遺伝子及び *npt II* 遺伝子を含む T-DNA 領域並びに改
214 変 *cry2Ab2* 遺伝子及び改変 *uidA* 遺伝子を含む直鎖状遺伝子断片領域がそれぞれ1
215 コピーずつ組み込まれていることが確認されている。上記5の(6) 安定性に関
216 する事項のとおり、15985 (*G.barbadense*) 系統においても、当該 T-DNA 領域は
217 安定して遺伝している (参考文献 19、20)。

218

219 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

220 15985 (*G. barbadense*) 系統における改変 Cry1Ac たん白質、改変 Cry2Ab2 た
221 ん白質、改変 GUS たん白質及び NPT II たん白質の発現量について、2007 年に米
222 国の5ヵ所のほ場から採取した葉及び種子サンプルを供して ELISA 法により測定
223 した (参考文献 21)。その結果は以下のとおり。

224 1) 改変 Cry1Ac たん白質

225 葉 : 1.2~11µg/g dwt (平均値 4.5µg/g dwt)

226 種子 : 0.39~1.1µg/g dwt (平均値 0.6µg/g dwt)

227 2) 改変 Cry2Ab2 たん白質

228 葉 : 210~570µg/g dwt (平均値 320µg/g dwt)

229 種子 : 380~610µg/g dwt (平均値 480µg/g dwt)

230 3) 改変 GUS たん白質

231 葉 : 1,300~2,700µg/g dwt (平均値 1,900µg/g dwt)

232 種子 : 88~140µg/g dwt (平均値 110µg/g dwt)

233 4) NPTII たん白質

234 葉 : 定量限界以下~36µg/g dwt (平均値 24µg/g dwt)

235 種子 : 定量限界以下~5.7µg/g dwt (平均値 4.1µg/g dwt)

236

237 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

238 *npt II* 遺伝子は、*E.coli* K-12 株 のトランスポゾンである Tn5 由来であり、そ
239 の遺伝子産物である NPT II たん白質は形質転換細胞の選抜の際に抗生物質耐性マ
240 ーカーとして使用される。NPT II たん白質は ATP を利用してネオマイシン及び関
241 連するアミノグリコシド系抗生物質をリン酸化して不活化する。これまでに NPT
242 II たん白質が家畜等の健康に影響を与えたという報告はされていない。

243

244 (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
245 に関する事項

246 既に飼料としての安全性確認がされている 15985 (*G.hirsutum*) 系統には、目
247 的以外のたん白質を発現するオープンリーディングフレームは含まれていない

248 ことが確認されている。同様に、従来育種法を用いて作出された
249 15985 (*G. barbadense*) 系統にも、目的以外のたん白質を発現するオープンリーデ
250 イングフレームは含まれていないと考えられる (参考文献 20)。
251

252 6 組換え体に関する事項

253 (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

254 15985 (*G. barbadense*) 系統と既存のピマワタとの相違は、15985 (*G.*
255 *barbadense*) 系統が改変 Cry1Ac たん白質及び Cry2Ab2 たん白質の発現により
256 チョウ目害虫に対する抵抗性を有する点のみである。この点を除けば、15985 (*G.*
257 *barbadense*) 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、
258 飼料としての利用方法も変わらない。
259

260 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

261 15985 (*G. barbadense*) 系統中で発現する改変 Cry1Ac たん白質、改変
262 Cry2Ab2 たん白質、改変 GUS たん白質及び NPT II たん白質は、15985 (*G.*
263 *hirsutum*) 系統中で発現する改変 Cry1Ac たん白質、改変 Cry2Ab2 たん白質、
264 改変 GUS たん白質及び NPT II たん白質と同一である。

265 これらのたん白質が既知の毒性たん白質と構造相同性を有していないこと、急
266 性的に毒性を示すとは考えにくいことは、既に安全性確認がされている 15985 (*G.*
267 *hirsutum*) 系統の評価の際に、データベースを用いた既知毒素とのアミノ酸配列
268 の比較及びマウスを用いた急性経口投与試験により確認されている。同様に、従
269 来育種法を用いて作出された 15985 (*G. barbadense*) 系統が発現するこれらのた
270 ん白質についても、毒性を有するとは考えられない (参考文献 1、2)。
271

272 (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

273 15985 (*G. hirsutum*) 系統中で発現する改変 Cry1Ac たん白質、改変 Cry2Ab2
274 たん白質、改変 GUS たん白質及び NPT II たん白質が消化や熱処理に対して不安
275 定であることは 15985 (*G. hirsutum*) 系統の評価の際に、①人工胃液、②人工
276 腸液及び③加熱処理のそれぞれに対する感受性を試験することにより確認され
277 ている。従来育種法を用いて作出された 15985 (*G. barbadense*) 系統が発現する
278 改変 CP4 EPSPS たん白質についても、物理化学的処理に対する感受性は同様で
279 あり、従来の方法で確実に失活・消化すると考えられる (参考文献 1、2)。
280

281 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

282 1) 改変 Cry1Ac たん白質

283 改変 Cry1Ac たん白質は酵素活性を持たないため、植物中の代謝経路に影響を
284 与えるとは考えられない。
285

286 2) 改変 Cry2Ab2 たん白質

287 改変 Cry2Ab2 たん白質は酵素活性を持たないため、植物中の代謝経路に影響を

288 与えるとは考えられない。

289
290

3) 改変 GUS たん白質

291 改変 GUS たん白質を発現する *uidA* 遺伝子は植物形質転換の過程で可視定量マ
292 ーカーとして使用される (参考文献 22、23)。*E.coli* 由来の GUS たん白質は食
293 品として安全であると報告されている (参考文献 24)。更に、GUS 様活性はトウ
294 モロコシ、ダイズ及びトマト等を含む 50 以上の植物の胚、果実、種皮及び胚乳な
295 どの多くの組織で検出されている (参考文献 25)。

296 15985 (*G. hirsutum*) 系統の構成成分の分析において、対照の非組換えワタ
297 (*G. hirsutum*) との間に安全性に影響を及ぼす差異が認められなかったことや米
298 国や日本で行われた環境安全性試験で形態、生育特性に差異が認められなかった
299 こと、そして他の食用作物において GUS 様活性が認められていることから、GUS
300 たん白質の発現が植物の代謝経路に重要な影響を及ぼすとは考えにくい。

301
302

4) NPT II たん白質

303 NPT II たん白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタ
304 マイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化
305 反応にのみ関与していることが報告されている (参考文献 26-28)。さらに、NPT
306 II たん白質の構造活性学的な検討の結果、NPT II たん白質はアミノグリコシド系
307 抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化 (例：水酸基を除去する、アミノ基
308 を改変する等)により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができな
309 くなることが示されている (参考文献 26)。以上のことから、NPT II たん白質
310 がピマワタ中で発現することにより新規の代謝系が生じたり、新規の代謝産物が
311 生じたりすることはないと考えられる。

312
313

(5) 宿主との差異に関する事項

314 2007 年に米国の 5 箇所のは場において栽培された 15985 (*G. barbadense*) 系統、
315 対照の非組換えピマワタ及び 8 品種の商業ワタ品種について、アミノ酸組成、脂
316 肪酸組成 (C14-C22)、シクロプロペノイド脂肪酸 (マルバリニン酸、ステルクリン酸、
317 ジヒドロステルクリン酸)、繊維質 {酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デター
318 ジェント繊維 (NDF)}、ミネラル (カルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、
319 リン、カリウム、ナトリウム、亜鉛)、主要構成成分 (たん白質、脂質、灰分及び
320 水分)、ビタミン E、ゴシポールの合わせて 52 項目について成分分析を行った。

321 その結果、すべての項目の分析値が従来ピマワタ品種の変動の範囲内であり、
322 分析を行った主要構成成分及び栄養阻害物質に関して、15985 (*G. barbadense*) 系
323 統と非組換えピマワタは同等であると考えられた (参考文献 3)。

324
325

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

326 2007 年に 15985 (*G. barbadense*) 系統のは場試験を米国で行い、15985 (*G.*

327 *barbadense*)系統の生存・増殖能力が対照の非組換えピマワタと同等であることを
328 確認した。

329

330 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

331 上述のように、15985(*G. barbadense*)系統の生存及び増殖能力は対照の非組
332 換えピマワタと同等であることから、生存及び増殖能力の制限についても両者の
333 間に相違はないと考えられる。

334

335 (8) 不活化法に関する事項

336 15985(*G. barbadense*)系統は、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を
337 示す除草剤の使用)など、ピマワタを枯死させる従来の方法で不活化される。

338

339 (9) 外国における認可等に関する事項

340 米国では遺伝子組換え作物の形質を従来の交配育種法を用いて異なる種に導
341 入する場合新たな規制の対象とはならない。米国食品医薬品局(FDA)により
342 2006年8月に飼料について承認されている15985(*G. hirsutum*)系統の承認の範
343 囲に、15985(*G. barbadense*)系統が含まれるとの確認がなされた。

344 欧州食品安全機関(EFSA)へ2007年4月に15985(*G. hirsutum*)系統の承認
345 の範囲に、15985(*G. barbadense*)系統を追加し、15985(*G. hirsutum*)系統の再
346 登録の申請を行った。

347 カナダ食品検査局(CFIA)により2008年10月に*G. hirsutum*と*G.*
348 *barbadense*の同等性に関する資料を提出し、飼料としての安全性が確認された。

349 オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)において、*G.*
350 *hirsutum*と*G. barbadense*は区別されていないため、新たに食品として
351 15985(*G. barbadense*)系統の安全性を確認する必要はない。

352

353 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

354 15985(*G. barbadense*)系統と従来のピマワタとの栽培方法における違いは、
355 15985(*G. barbadense*)系統ではチョウ目害虫に対して抵抗性を示す点のみで
356 ある。それ以外は、従来の栽培方法と相違はない。

357

358 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

359 15985(*G. barbadense*)系統の種子の製法及び管理方法は従来のピマワタと
360 同様である。

361

362 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
363 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

364 該当しない。

365

366 IV 審議結果

367 チョウ目害虫抵抗性ピマワタ15985系統について、「組換えDNA技術応用飼料及

368 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
369 による確認を行って差し支えないと判断された。

370

371 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 鱗翅目害虫抵抗性ワタ 15985 系統の安全性評価 ー要旨ー (社外秘)
- 2 インガード・ワタの安全性評価 ー要旨ー (社外秘)
- 3 チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985 (G. barbadense) 系統における構成成分の分析 : MSL-0021810 (社外秘)
- 4 Percival, A. E., J.F. Wendel, and J.M. Stewart. 1999. Taxonomy and Germplasm Resources, in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. Pp 33-63. Smith, W.C. (ed.). John Wiley and Sons, Inc.
- 5 Pillay, M and Myers, G.O., Genetic Diversity in Cotton Assessed by Variation in Ribosomal RNA Genes and AFLP Markers, Crop Sci. 39 (6) 1881. (1999)
- 6 Wang, L., Dong, M., Paterson, A.H. (1995) The distribution of Gossypium hirsutum chromatin in G.barbadense germ plasm: molecular analysis of ontogressive plant breeding. TAG Theoretical and Applied Genetics V91: 1153-1161.
- 7 Khan, S.A., Hussain, D., Askari, E., Steward, J.M., Malik, K.A., Zafar, Y. (2000) Molecular phylogeny of Gossypium species by DNA fingerprinting. Theoretical and Applied Genetics 101: 931-938.
- 8 Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. Residue Review 61:126-160.
- 9 生化学辞典、東京化学同人、1990.
- 10 NCPA. (1993) Cottonseed Oil. L.A.Jones and C.C.King eds. National Cottonseed Products Association, Inc., and The Cotton Foundation. Pp.1-60.
- 11 Martin, S. D. 1990. "Gossypol effects in animal feeding can be controlled." Feedstuffs. Vol 62, No 33.
- 12 Hron, R.J. Sr., Kuk, M.S., and Wan, P.J. 1996. Quick method for estimating free gossypol in cottonseed, meats, collets, and extracted meals. J. Amer. Oil Chem. Soc.. 73. 2. 199-202
- 13 Phelps, R.A., F.S. Shenstone, R.J. Kemmerer, and R.J. Evans. 1965. A Review of Cyclopropenoid Compounds: Biological Effects of some Derivatives. Poultr.Sci. 44: 358-394.
- 14 Cherry, J.P. and H.R. Leffler. 1984. Seed. In Cotton, Koher, R.J. and Lewis, C.F., eds. Amer. Soc. Agron. Madison, WI. Chapter 13, P 512-558
- 15 新編 飼料ハンドブック、日本科学飼料協会、1998年
- 16 日本貿易月表、大蔵省編、日本関税協会、平成20年12月号、2008.
- 17 飼料月報、平成20年8月、農林水産省生産局畜産部畜産振興課編 社団法人配合飼料供給安定機構発行
- 18 Hughes, H.D. and E.R. Nelson. 1957. Crop Production, Principles and Practices. The MacMillian Company, New York.
- 19 チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985 (G. barbadense) 系統中の導入遺伝子の世代間にわたる

安定性の確認：MSL-0022379(社外秘)

- 20 チョウ目害虫抵抗性ピマワタ 15985(G. barbadense)系統中の発現たん白質の世代間にわたる安定性の確認：MSL-0021859(社外秘)
- 21 チョウ目害虫抵抗性ワタ 15985(G. barbadense)系統中の改変 Cry1Ac たん白質、改変 Cry2Ab2 たん白質、改変 GUS たん白質及び NPTⅡ たん白質の発現量：MSL-0021555(社外秘)
- 22 Oshima, A., J.W. Kyle, R.D. Miller, J.W. Hoffmann, P.P. Powell, J.H. Grubb, W.S. Sly, M. Tropak, K.S. Guise, and R.A. Gravel. 1987. Cloning, sequencing and expression of cDNA for human β -glucuronidase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:685-9.
- 23 Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS Fusions: β -D-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The EMBO Journal 6 (13): 3901-3907.
- 24 Gilissen, L. J. W., P. L. J. Metz, W. J. Stiekema and J.-P. Nap. 1998. Biosafety of E. coli β -glucuronidase (GUS) in plants. Trans. Res. 7:157-163.
- 25 Hu, C.Y., P.P. Chee, R.H. Chesney, J.H. Zhou, P.D. Miller and W.T. O' Brien. 1990. Intrinsic GUS-like activities in seed plants. Plant Cell Rep. 9: 1-5.
- 26 Price, K.E., and J.C. Godfrey. 1974. Effect of structural modifications on the biological properties of aminoglycoside antibiotics containing 2-deoxystreptamine. Adv Appl Microbiol 18:191-307.
- 27 Davies, J. 1980. Aminoglycoside-aminocyclitol antibiotics and their modifying enzymes. Pages 474-489 in Antibiotics in laboratory medicine, V. Lorian, (ed.) The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 28 Davies, J., and D.I. Smith. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Annu Rev Microbiol 32:469-518.