

「チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 系統」に係る安全性確認

I はじめに

チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 系統（以下「COT67B ワタ」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：チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 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

COT67B ワタは、グラム陽性土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 株に由来する *cry1Ab* 遺伝子の塩基配列を一部改変した改変 *cry1Ab* 遺伝子 (*mcry1Ab* 遺伝子)を導入したワタである。*mcry1Ab* 遺伝子により、チョウ目害虫に対し高い殺虫活性を示す改変 Cry1Ab たん白質 (mCry1Ab たん白質)を発現する。mCry1Ab 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 mCry1Ab たん白質は特定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は、摂食しても影響はない。

COT67B 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* 遺伝子)を導入したが、交配による遺伝的分離により、*aph4* 遺伝子を持たず、*mcry1Ab* 遺伝子のみを持つ個体を選抜したため、COT67B ワタには、*aph4* 遺伝子は含まれていない。

なお、COT67B ワタと既存のワタとの相違は、COT67B ワタが改変 Cry1Ab たん白質の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、ゴシポールを初めとする有害生理活性物質を含め、成分の種類や量は変化していない。

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。

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

COT67B ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の Coker312 である。

mCry1Ab たん白質をコードする *mcry1Ab* 遺伝子の供与体は、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 株である。mCry1Ab

たん白質は、C 末端側領域に 26 個の連続アミノ酸配列（ガイザーモチーフ）が存在する点をのぞき、そのアミノ酸配列は野生型 Cry1Ab たん白質と一致している。ガイザーモチーフは野生型の Cry1Aa たん白質や Cry1Ac たん白質などの Cry1 たん白質では C 末端側に共通して認められる配列である。Cry1Ab たん白質にガイザーモチーフを付加することにより、微生物農薬生産時の培養において Cry1Ab たん白質を他の Cry1 たん白質と同じ温度条件で効率よく回収することが可能となる（参考文献 1）。なお、ガイザーモチーフの付加は、COT67B ワタにおいて、*mcry1Ab* 遺伝子に新たな機能を追加することを目的としてはいないが、*mcry1Ab* 遺伝子はシンジェンタ社が開発した遺伝子であり、特許関連の権利を有することから、COT67B ワタの作出に用いた。

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 である（参考文献 2,3,4）。*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、APH4 たん白質と記す。)は、ハイグロマイシンとその類縁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酵素たん白質である（参考文献 3,4）。交配による遺伝的分離により、*aph4* 遺伝子を持たず、*mcry1Ab* 遺伝子のみを持つ個体を選抜したため、COT67B ワタに *aph4* 遺伝子は存在しない。

（２）家畜等の安全な飼養経験に関する事項

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搾油した後の油粕が飼料に利用されている（参考文献 5）。

（３）飼料の構成成分等に関する事項

飼料として利用される部分は上記 1 の（２）に記載したとおり綿実であり、その主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ることが知られている（参考文献 5）。COT67B ワタにおけるこれらの量は、宿主である従来ワタと同程度であることが示されている（参考文献 6,7）。

（４）既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

COT67B ワタと既存ワタとの相違は、COT67B が mCry1Ab たん白質の発現によ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、COT67B ワタは既存ワタと同じであり、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ワタと相違はない。

以上（１）～（４）により、COT67B の飼料としての安全性を評価するために、既存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。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

COT67B ワタは、mCry1Ab たん白質を発現することにより、チョウ目害虫に対して抵抗性を示し、ワタに被害を及ぼす cotton bollworm(*Helicoverpa zea*)及び tobacco budworm(*Heliothis virescens*)等のチョウ目害虫（参考文献 8,9,10）に対し効果的な防除を行うことが可能となる。米国のワタ栽培における cotton bollworm と tobacco budworm による複合被害で生じた収量減は、2004 年において約 1 億 1,000 万ドルであったと推定されている（参考文献 11）。COT67B ワタは、上記の cotton bollworm や tobacco budworm に対して抵抗性を示すことが、米国の圃場試験で確認されている（参考文献 12）。なお、COT67B ワタが従来のワタと異なる点は、上記チョウ目昆虫に対する防除方法であり、その飼料としての利用目的や利用方法に関して従来のワタとの相違はない。

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

COT67B ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の Coker312 である。

（2）遺伝的先祖に関する事項

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13）。

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 14,15）。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 14,16）。

（3）有害生理活性物質の生産に関する事項

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ることが知られている（参考文献 5）。

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 5,17）。

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）。

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芻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 5,17）。

（4）寄生性及び定着性に関する事項

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。

（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 18）。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 19）。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。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ない（参考文献 20）。

（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

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作物として栽培されている。種子の発芽最低温度は 12℃、最適温度は 27～36℃であり、また、生育初期の温度は 24～30℃が望ましく、生育後期ではさらに高温が良いとされる。日本では、一般に平均気温が 15～16℃に達する 5 月上旬中旬に播種され、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 21）。

（7）有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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行う（参考文献 22）。*G. hirsutum* は、*G. barbadense*、*G. tomentosum*、*G. mustelinum* 及び *G. darwinii* と交雑可能で、稔性を有する F1 雑種の形成が比較的容易である（参考文献 15）。

（8）飼料に利用された歴史に関する事項

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

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23）、その後、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13,14）。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940万ha(28%)、中国が約540万ha(16%)、米国が約420万ha(13%)、パキスタンが約310万ha(9%)であった（参考文献24）。なお、綿毛を採取した後に残る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。

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。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すぎない（参考文献21,25）。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

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いる（参考文献5）。

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、米国での生産量は約1,040万トン(14%)であった（参考文献24）。また、日本は2008年に約13万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（参考文献26）。

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（参考文献27）。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28）。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

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、除草剤の残留及び低温は種子発芽の阻害要因となる（参考文献22）。加えて、生育初期の日照不足や低温は開花・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る（参考文献21）。また、物理的防除法(耕耘)や化学的防除法(感受性を示す除草剤の使用)によって、ワタは容易に枯死・不活化される。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

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。このうち、栽培種は2倍体種の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、並びに、4倍体種の *G. hirsutum* と *G. barbadense* の4種のみである。残りはすべて野生種であり（参考文献14）、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ると考えられる。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

COT67B ワタの作出に用いた *mcry1Ab* 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV4641 の構築には、Danisco Biotechnology 社のバイナリーベクター pVictor 由来のベクター pNOV2114 を用いた (参考文献 29)。形質転換した植物細胞の選抜に用いた、*aph4* 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV1914 の構築には、pBIN19 由来のベクター pNOV2122 を用いた (参考文献 30,31)。

(2) 性質に関する事項

mcry1Ab 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV4641 の全塩基数は 10,995 bp、形質転換細胞の選抜に用いたマーカーである *aph4* 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV1914 の全塩基数は 11,727 bp である。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。既知の有害塩基配列は含まない (参考文献 32)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用ベクター pNOV4641 には、その T-DNA 領域の外骨格領域に構築ベクターの細菌中での選抜・維持のため、*E. coli* Tn7 由来の *spec* (*aadA* 遺伝子)が含まれている。*spec* (*aadA* 遺伝子)にコードされるスペクチノマイシンアデニ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スペクチノマイシン耐性が付与される (参考文献 33)。

導入用ベクター pNOV1914 には、その T-DNA 領域の外骨格領域に構築ベクターの細菌中での選抜・維持のため、*Streptococcus faecalis* 由来の *npt3* 遺伝子が含まれている。*npt3* 遺伝子にコードされるアミノグリコシド 3'-リン酸基転移酵素 TypeIII によって、カナマイシン耐性が付与される (参考文献 34)。

また、形質転換した植物細胞の選抜のため、COT67B ワタの作出に用いられた導入用ベクター pNOV1914 は、*aph4* 遺伝子も含んでいる。*aph4* 遺伝子にコードされるハイグロマイシン B リン酸基転移酵素によって、ハイグロマイシン耐性が付与される (参考文献 2,3,4)。しかし、*aph4* 遺伝子は、再分化個体の選抜に用いた後、自殖後代である T1 世代において、当該遺伝子が分離して *mcry1Ab* 遺伝子のみが挿入されている個体を選抜したため、*aph4* 遺伝子は T1 世代以降の COT67B ワタには存在しない (参考文献 35)。

なお、これらの薬剤耐性遺伝子は、作出された COT67B 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 (参考文献 32)。

(4) 伝達性に関する事項

発現ベクター pNOV4641 及び pNOV1914 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

家畜等が導入用ベクターpNOV4641 及び pNOV1914 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

COT67B ワタの作出に用いた導入用ベクターpNOV4641 はベクターpVictor を、導入用ベクターpNOV1914 はベクターpBIN19 由来の pNOV100 を基に以下の手順で作成した（参考文献 29,30,31）。

pNOV4641

- ① pVictor由来のベクターpVictorHiNKに含まれる[35Sプロモーター]-[*pmi*遺伝子]とM13複製起点を削除し、pHiNK085を作成した。
- ② pHiNK085に、pAD1289由来の *vir* 遺伝子である *virGN54D* 配列を挿入し、pNOV2114を作成した。導入用ベクターpNOV4641のT-DNA外骨格領域はこのpNOV2114に由来する。
- ③ pNOV1321由来の *mcry1Ab* 遺伝子をpNOV3501の[Act2プロモーター]-[NOSターミネーター]に挿入し、*mcry1Ab* 遺伝子発現カセット断片([Act2プロモーター]-[*mcry1Ab* 遺伝子]-[NOSターミネーター])を構築した。構築した *mcry1Ab* 遺伝子発現カセット断片をpNOV2114のT-DNA領域に、挿入し、pNOV4641作成した。

pNOV1914

- ① pBIN19 由来のベクターpNOV100 に pAD1289 由来の *vir* 遺伝子である *virGN54D* 配列を挿入し、pNOV2122 を作成した。導入用ベクターpNOV1914 の T-DNA 外骨格領域はこの pNOV2122 に由来する。
- ② pNOV2122 の T-DNA 領域に、pNOV103 由来の *aph4* 遺伝子発現カセット断片([Ubq3 プロモーター]-[*aph4* 遺伝子]-[NOS ターミネーター])を挿入し、pNOV1914 を作成した。

(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

導入用ベクターpNOV4641 及び pNOV1914 の宿主への導入にはアグロバクテリウム法が用いられた。なお、COT67B ワタでは再分化個体(T0 世代)の自殖後代である T1 世代において、挿入遺伝子の分離によって *aph4* 遺伝子が存在せず、*mcry1Ab* 遺伝子のみが挿入されている個体を選抜したため、COT67B ワタに *aph4* 遺伝子を含めた導入用ベクターpNOV1914 由来の遺伝子は存在しない（参考文献 32,35）。

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

mcry1Ab 遺伝子は、グラム陽性土壌細菌である *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 株の *cry1Ab* 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社が人工合成した改変遺伝子である（参考文献 1,39）。

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 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（参考文献 2,3,4）。

② 安全性に関する事項

mcry1Ab 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 株が属する *B. 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。

aph4 遺伝子の供与体は、プラスミド pKC203 である。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

4 の (6) に記載した方法で作成した 2 つの導入用ベクター、pNOV4641 及び pNOV1914 を、1 つのアグロバクテリウムに組み込んだ後、そのアグロバクテリウムをワタの葉柄に接種し、共存培養した。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して再分化個体(T0 世代)を得た。ワタ細胞に残存するアグロバクテリウムの除菌のため、用いたハイグロマイシン添加培地には 500 mg/L の抗生物質 cefotaxime を添加した。

形質転換の際、*mcry1Ab* 遺伝子発現カセット及び *aph4* 遺伝子発現カセットはそれぞれ宿主のゲノムに独立して挿入された。そのため、以下の方法を用いて *mcry1Ab* 遺伝子カセットのみを持つ個体を選抜した。

ハイグロマイシンで選抜した T0 個体に対して PCR 分析を行い、*mcry1Ab* 遺伝子と *aph4* 遺伝子の両方が存在する個体を選抜した。次に、この T0 個体の自殖により得られた T1 個体に、個体別に定量 PCR 分析を行い、*mcry1Ab* 遺伝子がホモ接合体でありながら、*aph4* 遺伝子が存在しない個体を選抜した（参考文献 35）。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

Act2 プロモーター(1,408 bp) : シロイヌナズナのアクチン 2 遺伝子由来のイントロン(453 bp)を含むプロモーター配列（参考文献 36）。導入用ベクター pNOV4641 の *mcry1Ab* 遺伝子発現カセットに用いられた。

Ubq3 プロモーター(1,721 bp) : シロイヌナズナのユビキチン 3 遺伝子由来の第 1 イントロン(375 bp)を含むプロモーター配列（参考文献 37）。導入用ベクター pNOV1914 の *aph4* 遺伝子発現カセットに用いられた。

② ターミネーターに関する事項

NOS ターミネーター(253 bp) : *Rhizobium radiobacter*(*Agrobacterium tumefaciens*) の nopaline synthase 遺伝子のポリアデニル化シグナルを含む

配列(Entrez Accession Number V00087) (参考文献 38)。*mcry1Ab* 遺伝子
発現カセットと *aph4* 遺伝子発現カセットの両方に用いられた。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

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
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 32)。

(4) 性質に関する事項

導入用ベクター pNOV4641 及び pNOV1914 の挿入遺伝子の各構成要素、由来
及び機能について表 1 に示した。

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>mcry1Ab</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 36)。
<i>mcry1Ab</i>	チョウ目昆虫に殺虫活性を示す <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1 株の野生型 Cry1Ab たん白質をコードする野生型 <i>cry1Ab</i> 遺伝子に 26 個 のアミノ酸配列 (ガイザーモチーフ (参考文献 1)) をコードする塩基配 列を付加した改変遺伝子。 <i>mcry1Ab</i> 遺伝子の塩基配列は、植物での発現 に最適なコドンに置換しているが (参考文献 39)、付加した 26 個のアミ ノ酸配列以外にアミノ酸配列に変更はない。 Cry1Ab たん白質を含め、 <i>B. thuringiensis</i> で産生される結晶たん白質で ある Cry たん白質は、特定の昆虫種に対して殺虫活性を示すことが知ら れている。感受性昆虫種が Cry たん白質を摂取すると、特定の大きさの 活性ポリペプチド(コアたん白質)を生じ、中腸上皮細胞の特異的受容体に 結合してイオンチャネルを形成し、消化器官が損傷を受けて摂食障害を起 こし、死に至ることが知られている (参考文献 42,43,44,45,46,47,48,49,50)。
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(Entrez Accession Number V00087) (参考文献 38)。
<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(375 bp)を含むプ ロモーター配列 (参考文献 37)。
<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、 <i>E. coli</i> のプラスミド由来 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 4) で、形質転 換細胞の選抜マーカーとして用いた。APH4 たん白質は、ハイグロマイ シン B をリン酸化により不活化するため (参考文献 51)、導入用ベクタ ー pNOV1914 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、

	形質転換細胞の選抜が可能となる。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)の nopaline synthase 遺伝子のポリアダニル化シグナルを含む配列(Entrez Accession Number V00087) (参考文献 38)。

(5) 純度に関する事項

導入用ベクター pNOV4641 は *spec* (*aadA* 遺伝子)を、導入用ベクター pNOV1914 は *npt3* 遺伝子を細菌選抜マーカー遺伝子としてベクターの外骨格領域に有している。いずれも細菌におけるベクターの選抜及び増殖を通じて純化されている。

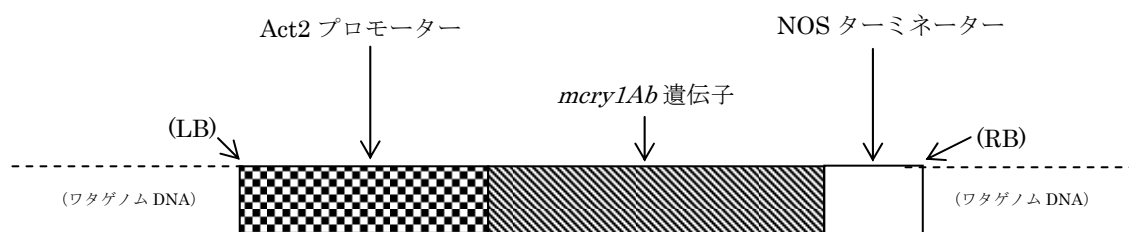
(6) 安定性に関する事項

COT67B ワタの 3 つの世代を用いて、COT67B ワタにおける挿入遺伝子の分離様式を *mcry1Ab* 遺伝子を増幅する PCR 分析により検定した。その結果、COT67B 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示された (参考文献 32)。

また、COT67B ワタの複数世代を用いてサザンブロット分析を行った結果、*mcry1Ab* 遺伝子が後代世代に安定して遺伝するとともに、*aph4* 遺伝子は存在していないことが示された (参考文献 32)。

(7) コピー数に関する事項

COT67B 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分析を行ない、COT67B ワタにおける挿入遺伝子のコピー数、完全性及び導入用ベクター pNOV4641 の外骨格領域の存在の有無、並びに *aph4* 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV1914 由来の遺伝子の有無を確認した。その結果、COT67B ワタのゲノムには、1 コピーの完全な *mcry1Ab* 遺伝子発現カセットが組み込まれており、導入用ベクター pNOV4641 の外骨格領域及び *aph4* 遺伝子を含む導入用ベクター pNOV1914 由来の領域は存在しないことが確認された (参考文献 32)。COT67B ワタにおける挿入遺伝子の模式図を下に示した。



また、COT67B ワタの挿入遺伝子の 5' 及び 3' 末端近傍配列 (各 1,000 bp) をクローニングし、塩基配列を決定した。COT67B の宿主である Coker312 の配列と比較した結果、遺伝子の挿入に伴いワタゲノムの 50 bp の欠損と 1 bp の挿入が見られたものの、挿入遺伝子の近傍配列についてワタのゲノム配列と一致していることを確認した (参考文献 32)。

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

って、ワタの既知の遺伝子が損なわれていないか検討した。両近傍配列(各1,000 bp)及び隣接するT-DNA領域(90 bp)の配列(各1,090 bp)において、既知のたん白質と相同性を持つ配列が存在するかについて、NCBI Non-redundant protein sequences (nr)に対し、blastxによる検索を行った(E value 10以下)。その結果、E value 10以下の既知たん白質が5'末端側で6つの、3'末端側で1つのたん白質が見いだされたものの、その中にワタの既知のたん白質の配列は見いだされなかった。このことから、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32)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

米国アーカンソー州、ジョージア州、ルイジアナ州及びミシシッピ州の試験圃場において栽培した COT67B ワタの 1 世代から、生育ス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 法によって mCry1Ab たん白質の発現量を分析した。その結果、COT67B ワタの各組織及び生育ステージにおいて mCry1Ab たん白質の発現が確認され、飼料としての利用部位である種子における収穫直前(発芽後約 22 週目)の平均発現量は、25.17 µg/g 乾燥重であった。その他の部位における平均発現量は、葉は最大で 246.03 µg/g 乾燥重(同 13 週目)、根は 56.56 µg/g 乾燥重(同 4 週目)、さくは 45.24 µg/g 乾燥重(同 15 週目)、花は 161.74µg/g 乾燥重(同 13 週目)であった(参考文献 52)。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用ベクターpNOV4641 及び pNOV1914 の外骨格領域には、それぞれ *spec* (*aadA* 遺伝子)及び *npt3* 遺伝子が含まれているが、作出された COT67B ワタには両遺伝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る。また、COT67B ワタは、5 の (2) に記載した方法により、*aph4* 遺伝子を含まない個体が選抜されている。したがって COT67B ワタには抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しない。

(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

COT67B 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 32)。

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

COT67B ワタでは、挿入された *mcry1Ab* 遺伝子によって mCry1Ab たん白質を発現している。mCry1Ab 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

mCry1Ab 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、National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez Protein Database (参考文献 53)及び blastp search program (version 2.2.6) (参考文献 54)を用いて検索を行った(参考文献 55)。その結果、Cry タンパク質を含めた δ -エンドトキシンの他に、mCry1Ab 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 55,56)。

加えて、マウスを用いた急性経口毒性試験(投与量 1,830 mg/kg 体重)も実施されたが、mCry1Ab たん白質に起因した毒性影響は見られなかった(参考文献 57)。

(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

mCry1Ab たん白質の COT67B ワタにおける産生量は極めて微量で、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 COT67B 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・抽出したものをを用いた。*E. coli* 過剰発現系由来の mCry1Ab たん白質と COT67B ワタで発現する mCry1Ab たん白質との同等性は殺虫活性、免疫学的反応、見かけの分子量、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ることにより確認した(参考文献 58)。

①人工胃液に対する感受性

mCry1Ab たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウェスタンブ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 mCry1Ab たん白質のバンドは検出されなくなった(参考文献 59)。

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

mCry1Ab たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、SDS-PAGE 分析とウェスタンブロット分析で評価した。その結果、反応開始 5 分後には完全な mCry1Ab たん白質のバンドは検出されなくなり、約 58 kDa と約 55 kDa のポリペプチド断片が生じた。これらのポリペプチド断片は反応開始 48 時間後でも検出された(参考文献 60)。なお、*B. thuringiensis* が産生する Cry たん白質は、パンクレアチンに含まれるトリプシンのようなプロテアーゼに対して耐性を示し、特定の大きさのコアたん白質には消化されるが、その後は安定的であることが既に知られている(参考文献 61,62)。

以上の結果から、mCry1Ab たん白質は他の Cry たん白質と同様に、人工腸液中で速やかに約 58 kDa と約 55 kDa のポリペプチド断片に分解されるが、その後は消化が進まないことが確認された。

③加熱処理

加熱処理感受性を ELISA 分析により評価した結果、mCry1Ab たん白質の免疫反応活性は、65℃、30 分の静置で約 1%にまで低下し、95℃、30 分の静置で検出されなくなった。このことから、mCry1Ab たん白質は加熱処理に対して安定でないことが示された（参考文献 63）。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

mcry1Ab 遺伝子によって発現する mCry1Ab たん白質はチョウ目昆虫に殺虫活性を示すたん白質である。mCry1Ab たん白質が酵素活性を有するとは考えられておらず、宿主の代謝系と独立して機能していることから、COT67B ワタにおける mCry1Ab たん白質の発現が植物の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

COT67B ワタと従来のワタとの差異を評価するため、2004 年に COT67B 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脂肪酸)の分析を行った（参考文献 6,7）。

米国の計 4 カ所(ルイジアナ州 Bossier City、ルイジアナ州 Winnsboro、ミシシッピ州 Leland 及びアリゾナ州 Newport ; 4 反復/供試ワタ/圃場)の圃場で栽培し、それぞれ種子を収穫し、各種成分分析を行った。各分析結果については、COT67B ワタと対照の非組換えワタ間で分散分析による統計処理を行った。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、標準的な F 検定により決定した。F 検定における確率が 5%未満の場合($p < 0.05$)を統計学的に有意とした。

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

主要構成成分（水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、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、COT67B ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差($p < 0.05$)は認められなかった。ミネラル成分としてカルシウム(Ca)とリン(P)について分析した結果、リンでは COT67B ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差($p < 0.05$)は認められなかった。一方、カルシウムでは統計学的有意差が認められた(COT67B ワタ 1,522 mg/kg dw, 非組換えワタ 1,447 mg/kg dw)ものの、その分析値は一般のワタ品種で報告されている文献値(877.6 - 3,300 mg/kg dw)の範囲内であった（参考文献 62,64）。

以上の分析結果から、COT67B ワタの主要構成成分及びミネラル成分は、対照に用いた非組換えワタあるいは従来のワタと同程度であることが示された。

②種子におけるビタミン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成の分析結果

ビタミン類としてビタミン E(α -トコフェロール)について分析した結果、

COT67B ワタと対照の非組換えワタとの間で統計的有意差($p < 0.05$)が認められた (COT67B ワタ 0.156 mg/g dw, 非組換えワタ 0.139 mg/g dw) が、その分析値はいずれも一般のワタ品種で報告されている文献値 (0.0821-0.2252 mg/g dw) の範囲内であった。アミノ酸組成の分析結果において、COT67B 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、いずれのアミノ酸でも認められなかった。脂肪酸組成の分析結果において、パルミチン酸、ステアリン酸及びオレイン酸を除き、COT67B ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお、表 2 のとおり、有意差が認められたパルミチン酸、ステアリン酸及びオレイン酸に関して、その分析値はいずれも一般のワタ品種で報告されている文献値の範囲内であった (参考文献 62,64)。

表 2 有意差の認められた脂肪酸

供試ワタ	16:0 (パルミチン酸) (% TFA)	18:0 (ステアリン酸) (% TFA)	18:1 (オレイン酸) (% TFA)
COT67B ワタ	23.84	2.39	15.59
非組換えワタ	24.23	2.32	15.17
F 検定における確率	<0.001 * ²	0.002 *	<0.001 *
文献値の範囲	21.11 – 26.88	2.15 – 3.32	13.4 – 20.0

1 : TFA = 総脂肪酸。

2 : アスタリスク(*)の数値は統計学的有意差があったことを示す($p < 0.05$ のとき有意差あり)。

以上の分析結果から、COT67B ワタのビタミン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成は、対照に用いた非組換えワタあるいは従来ワタと同程度であることが示された。

③種子における有害生理活性物質の分析結果

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ール(総ゴシポール及び遊離ゴシポール)、並びに、シクロプロペノイド脂肪酸(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)について分析した。その結果、ジヒドロステルクリン酸を除き、COT67B ワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお、有意差が認められたジヒドロステルクリン酸に関して、総脂肪酸に占める割合 (COT67B ワタ 0.151%, 非組換えワタ 0.174%) は、一般のワタ品種で報告されている文献値 (0.105 - 0.50 %) の範囲内であった (参考文献 62,64)。

以上の分析結果から、COT67B ワタの有害生理活性物質は、対照の非組換えワタあるいは従来ワタと同程度であることが示された。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国で行われた温室試験及び野外圃場試験を通じて、COT67B ワタの生存・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。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

上述のように、COT67B ワタの生殖・増殖能力に対照の非組換えワタとの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非組換えワタと同様であると考えられる。

(8) 不活化法に関する事項

COT67B 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(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。

(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2009年2月に食品・飼料としての安全性が確認された。

また、2007年4月に米国農務省(USDA)へ無規制裁培のための申請を行った。また、2008年6月に米国環境保護庁(EPA)からCOT67B ワタで発現しているmCry1Abたん白質の許容値設定免除の承認を得ている。

カナダにおいては、2007年6月にカナダ食品検査庁(CFIA)に飼料・環境の安全性審査の申請を行った。

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2009年9月に食品としての安全性の承認を受けた。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

COT67B ワタと既存のワタとの相違は、COT67B ワタにチョウ目害虫に対する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ない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

COT67B ワタにおける種子の製法及び管理方法については、既存のワタと相違はない。なお、米国における開発段階の圃場試験に用いたCOT67B ワタの種子は、保存庫(4℃、40%相対湿度)で保管されている。

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

チョウ目害虫抵抗性ワタ COT67B 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

567 よる確認を行って差し支えないと判断された。

568

569 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 Geiser, M. and Moser, J. (1991) Temperature-stable *Bacillus thuringiensis* toxin. Canadian Patent No. 2,035,199.
- 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: 206-220.
- 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 #SSB-105-06-A2.
Study Title: Compositional Analysis of Cottonseed from Event COT67B Cotton Plants. (社外秘)
- 7 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-110-07.
Study Title: Vitamin E Analysis of Cottonseed from Event COT67B Cotton Plants. (社外秘)
- 8 BUGWOOD (2007) Cotton Insects. GEORGIA IPM.
(<http://www.gaipm.org/cotton/index.html>).
- 9 MSUcares (2007) 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 Williams, M. (2005) Cotton insect loss estimates – 2004. *In*: Proceedings of the 2005 Beltwide Cotton Conferences, New Orleans, Louisiana - January 4 - 7, 2005, pp. 1105-1160.
- 12 Study title: Field Efficacy Evaluation of Event COT67B in 2006.(社外秘)
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
 - 16 Smith, C.E. and Stephens, S.G. (1971) Critical identification of Mexican archaeological cotton remains. *Econ. Bot.*, 25: 160-168.
 - 17 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.251-263.
 - 18 APS (2007) Diseases of Cotton (*Gossypium* spp.). Common Names of Plant Diseases. American Phytopathological Society.
(<http://www.apsnet.org/online/common/names/cotton.asp>).
 - 19 IPM Center (2007) National Site for the USDA Regional IPM Centers Information System. (<http://www.ipmcenters.org/>).
 - 20 Martelli, G.P. (2001) Transgenic resistance to plant pathogens: Benefits and risks. *J. Plant Pathol.*, 82: 37-46.
 - 21 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.
 - 22 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.
 - 23 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.
 - 24 FAOSTAT (2009) Food and Agriculture Organization (of the United Nations). (<http://faostat.fao.org/default.aspx>).
 - 25 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.
 - 26 財務省貿易統計 (2009) <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>.
 - 27 農林水産省 (2009a) 油糧生産実績調査 (平成 18 年確報版). 農林水産省 : 農林水産施策について(統計). (<http://www.maff.go.jp/www/info/bunrui/mono09.html>).
 - 28 農林水産省 (2009b) 飼料月報 (概要) 平成 18 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/lin/pdf/h1804-03.pdf>).
 - 29 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-143-07.
Study Title: Description of the Plasmid Lineage culminating in pNOV4641, the Plasmid Used in the Transformation Resulting in Event COT67B Cotton. (社外

秘)

- 30 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-144-07 A3.
Study Title: Description of the Plasmid Lineage culminating in pNOV1914, a Plasmid Used in the Transformation Resulting in Event COT67B Cotton. (社外秘)
- 31 Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research*, 12: 8711-8721.
- 32 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-134-09 A3.
Study Title: Molecular Characterization of the Transgenic DNA in Event COT67B Cotton for Japan. (社外秘)
- 33 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.
- 34 Trieu-Cuot, P. and Courvalin, P. (1983) Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene*, 23: 331-341.
- 35 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-137-10.
Study Title: Event COT67B cotton: Real-Time PCR Analysis of Individual T1 Plants. (社外秘)
- 36 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.
- 37 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.
- 38 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.
- 39 Koziel, M.G., Desai, N.M., Lewis, K.S., Kramer, V.C., Warren, G.W., Evola, S.V., Crossland, L.D., Wright, M.S., Merlin, E.J., Launis, K.L., Rothstein, S.J., Bowman, C.G., Dawson, J.L., Dunder, E.M., Pace, G.M., and Suttie, J.L. (1997) Synthetic DNA sequence having enhanced insecticidal activity in maize. United States Patent No. 5,625,136.
- 40 Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., and Goodman, H.M. (1982) Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular Applied Genetics*, 1: 361-370.
- 41 Wang, K., Herrera-Estrella L., Van Montagu, M., and Zambryski, P. (1984) Right 25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome.

Cell, 38: 455-462.

- 42 Sacchi, VF., Parenti, P., Hanozet, GM., Giordana, B., Luthy, P. and Wolfersberger, MG. (1986) *Bacillus thuringiensis* toxin inhibits K⁺-gradient-dependent amino acid transport across the brush border membrane of *Pieris brassicae* midgut cells. *Federation of European Biological Society Letters*, 204: 213-218.
- 43 Wolfersberger, MG., Hofmann, C. and Luthy, P. (1986) Interaction of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin with membrane vesicles isolated from lepidopteran larval midgut. Pp. 237-238. *In* Bacterial Protein Toxins. Falmagne, P., Fehrenbech, FJ., Jeljaszewics, J. and Thelestam, M. (eds.). Gustav Fischer, New York.
- 44 Hofmann, C., Luthy, P., Hunter, R. and Pliska, V. (1988a) Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 173: 85-91.
- 45 Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Höfte, H., Van Rie, J., Mansens, S. and Van Mellaert, H. (1988b) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 7844-7848.
- 46 Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. (1989) Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insect. *European Journal of Biochemistry*, 186: 239-247.
- 47 Van Rie, J., Jansens, S., Höfte, H., Degheele, D. and Van Mellaert, H. (1990) Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1378-1385.
- 48 English, L. and Slatin, SL. (1992) Mode of action of delta-endotoxins from *Bacillus thuringiensis*: a comparison with other bacterial toxins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22: 1-7.
- 49 Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, DR. and Dean, DH. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62: 775-806.
- 50 Broderick, NA., Raffa, KF., and Handelsman, J. (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 15196-15199.
- 51 Pardo, J.M., Malpartida, F., Rico, M. and Jimenez, A. (1985) Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygrosopicus* – the producing organism. *J. Gen. Microbiol.*, 131:1289-1298.

- 52 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-022-06 A1.
Study Title: Quantification of Cry1Ab Protein in Event COT67B Cotton Tissues and Whole Plants. (社外秘)
- 53 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>).
- 54 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.
- 55 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-124-09.
Study Title: Full Length Cry1Ab: Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known Toxins. (社外秘)
- 56 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-104-09.
Study Title: FLCry1Ab : Assessment of Amino Acid Sequence Homology with Known or Putative Allergens. (社外秘)
- 57 Central Toxicology Laboratory Report#:AM7516-REG.
Study Title: FLCRY1AB-0103: SINGLE DOSE ORAL TOXICITY STUDY IN THE MOUSE. AM7516/REGULATORY/REPORT. (社外秘)
- 58 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-016-06.
Study Title: Characterization of the Cry1Ab Protein Produced in Event COT67B-Derived Cotton Plants and Comparison with Cry1Ab Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli*. (社外秘)
- 59 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-026-06.
Study Title: *In vitro* Digestibility of Full-Length Cry1Ab Protein (Test Substances FLCRY1AB-0103 and IAPCOT67B-0106) Under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社外秘)
- 60 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-018-07.
Study Title: *In vitro* Digestibility of Full-length Cry1Ab Under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社外秘)
- 61 Bietlot, H., Carey, P.R., Choma, C., Kaplan, H., Lessard, T., and Pozsgay, M. (1989) Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *Biochem J.*, 260: 87-91.
- 62 OECD (2007) Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing Bacillus Thuringiensis-Derived Insect Control Proteins.
- 63 Syngenta Seeds Biotechnology Report #SSB-020-07.
Study Title: Effect of Temperature on the Immunoreactivity of Full-Length Cry1Ab Protein. (社外秘)
- 64 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.

570