

「LLCotton25」に係る安全性確認

I はじめに

LLCotton25 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 : LLCotton25
性 質 : 除草剤グルホシネート耐性
申 請 者 : バイエルクロップサイエンス株式会社
開 発 者 : アベンティス クロップサイエンス社

LLCotton25 は、グルホシネートの殺草活性を不活性化する酵素 PAT を発現する遺伝子（*bar* 遺伝子）を導入したものであり、グルホシネートの影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

LLCotton25 と既存のワタとの相違は、LLCotton25 が PAT の発現により、グルホシネートの影響を受けない点だけである。

一般に、綿実及びその油粕が家畜等の飼料として広範に使用されている。

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

宿主として用いた植物はワタ(*Gossypium hirsutum*)で、Malvaceae 科または Mallow 科の *Gossypium* 属に属し、Coker312 品種が遺伝子組換えに用いられた。導入に用いたビアラフォス耐性遺伝子（*bialaphos resistance gene*、以下「*bar* 遺伝子」という。）は土壌中のグラム陽性放線菌 *Streptomyces hygrosopicus* より分離された。

2 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

綿実及びその油粕が家畜等の飼料として広範に使用されている。

3 飼料の構成成分等に関する事項

LLCotton25 と宿主の Coker312 を用いて、主栄養成分（たん白質、灰分、粗脂肪、炭水化物）の分析を実施した。たん白質については、それぞれの個々のアミノ酸組成の比較、脂肪については脂肪酸組成の比較を行った。また、ゴシポールやシクロプロペン脂肪酸といった有害生理活性成分についても実施した。その結果、LLCotton25 とその親品種 Coker312 との間に生物学的に意味のある相違は認められなかった。

4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

LLCotton25 の栽培期間中にグルホシネートを直接使用できる点を除けば、栽培方法は既存のワタと同じである。また、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法の使用方法についても既存のワタと全く相違はない。

以上 1.1～1.4 により、LLCotton25 の飼料としての安全性を評価するために、既存の飼料を比較対照として用いるという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

LLCotton25 はグルホシネートの殺草作用を不活性化する *bar* 遺伝子が導入され、グルホシネートの影響を受けずに生育することができる。結果として、グルホシネートをワタ栽培期間中にも直接使用できる(参考文献①)。

3 宿主に関する事項

1 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

宿主として用いた植物はワタ(*Gossypium hirsutum*)で、Malvaceae 科または Mallow 科の *Gossypium* 属に属し、Coker312 品種(参考文献②)が遺伝子組換えに用いられた。

2 遺伝的先祖に関する事項

地域別に存在する幾種もの在来種のワタが交雑し、現在の栽培用のワタが開発されたと考えられる。

3 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタはゴシポールやシクロプロペン脂肪酸といった有害生理活性物質を生産することが知られている。ゴシポールは食欲減退、体重減少、消化不良を引き起こす(参考文献③)。また、シクロプロペン脂肪酸はステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害し、膜の透過性が変化し、産卵鶏では卵がピンク色になってしまう(参考文献④)。

4 寄生性及び定着性に関する事項

ワタが家畜等に寄生又は定着するという報告はない。

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

ワタの病気は多く知られているが、これらのワタに感染する病原体について家畜等に対して病原性を持つという報告はない。

6 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

ワタは栽培作物で、自然環境下では人の介入なしに生き延びることはできない。多くの文献によりワタが雑草化しないことが報告されている(参考文献⑤,⑥,⑦)。

7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ワタ是一年生の植物で、自家受粉作物であり(参考文献⑧)、ワタの受粉は昆虫によって媒介される。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

宿主であるワタは、米国においては 150 年以上前から綿実及びその油粕が家畜の餌として利用されてきた歴史を有しており(参考文献⑨)、現在においても家畜等の飼料として広範に使用されている。

9 飼料の安全な利用に関する事項

搾油後の綿実油粕は家畜等の飼料として使用されている。また、綿毛を取り除いた綿実が直接に家畜等の飼料として用いられることもある。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

ワタの生育のためには、15℃以上の年平均気温が必要である。さらに、無霜期間が180～200 日以上、生育期間の 40%以上の晴天日が必要である。わが国のようにワタの播種期・幼苗期に低温・多湿なところでは種子が地中で腐敗したり、幼苗が諸種の病菌によって立枯れ・腰折れなどを引き起こすことが多い。また、結実・開絮期には多雨・多湿のため蒴が病気に侵されることが多い。

11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

Gossypieae 亜科には有毒物質ゴシポールが含まれていて、内臓器官、肺の炎症を起こすことが知られている。当該亜科に含まれる 8 つの属のうち1つが *Gossypium* L.属であり、宿主の *Gossypium hirsutum* が含まれる。

4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

LLCotton25 を作出するためのベクターはプラスミド pGSV71 を用いた(参考文献⑩)。プラスミド pGSV71 は、プラスミド pGSC1700(参考文献⑪)を基に作製され、プラスミド pBR322(参考文献⑫)に由来する複製起点を有し、また *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)における複製を可能にするための *Pseudomonas* のプラスミド pVS1(参考文献⑬)由来の複製起点も含んでいる。

2 性質に関する事項

プラスミド pGSV71 の塩基数は 9,555bp である。プラスミド pGSV71 に存在するすべての遺伝子は、その由来・機能等が明らかになっており、既知の有害な塩基配列を含まない。

3 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pGSV71 は大腸菌及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)においてストレプトマイシン/スペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子(*aadA*)を有している。*aadA* 遺伝子は、大腸菌を用いてプラスミド pGSV71 を構築する際に選択マーカーとして用いたもので、この遺伝子は植物で機能するプロモーターを持たないため、植物での発現は考えられない。また、*aadA* 遺伝子は T-DNA の外部に位置しているのでワタゲノム中には挿入されなかった。

4 伝達性に関する事項

プラスミド pGSV71 の宿主としては大腸菌や *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)などの細菌が知られているが、ワタのような植物体ではこのプラスミドは伝達性を有さない。

5 宿主依存性に関する事項

プラスミド pGSV71 の宿主としては大腸菌や *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)などのグラム陰性細菌に限られている。

6 発現ベクターの作成方法に関する事項

LLCotton25 の作出に用いた発現ベクターpGSV71 は、pGSC1700 に由来する植物形質転換用ベクターpGSV1 の T-DNA 内の余分な配列を除去した後、ポリリンカー配列を導入し、pGSV7 を作成し、次に 35S プロモーター及び 3'nos ターミネーターを含む *bar* 遺伝子カセットを pGSV7 に導入することにより構築した。

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

発現ベクター pGSV71 を用いて *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*)を用いたバイナリーベクター法により、Coker312 品種由来の組織片(胚軸から小根までの領域)を用いて行われた。組織片から完全な植物体まで再生させ、さらにグルホシネートを含む再生培地を用いてグルホシネート耐性株を選抜した。選抜されたグルホシネート耐性株はポットに植えられ、温室で優良系統の選抜を、更にほ場で選抜を繰り返し行い、最終的に LLCotton25 系統が選抜された。

5 挿入遺伝子に関する事項

1 供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

bar 遺伝子は *Streptomyces hygroscopicus* ATCC21705 株から分離された。これはグルホシネートの除草作用に対する耐性をもたらす酵素 PAT をコードしている(参考文献⑭)。

(2) 安全性に関する事項

Streptomyces 属はグラム陽性芽胞形成性土壌細菌であり土壌、飼料、堆肥、及び水中等にあつて、古くより家畜等に近い存在であった。病原性は報告されておらず、実際の長い家畜等との接触の歴史の中で *Streptomyces hygroscopicus* の安全性に問題は無いと考えられる。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

4.6 及び 4.7 参照。

3 構造に関する事項

プロモーターとしてカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター(参考文献⑮)を用いた。ターミネーターは 3'nos ターミネーター(3'非翻訳領域)(参考文献⑯)を用いた。導入された組換え DNA 断片中の構成遺伝子は、いずれもその由来、機能等について明らかにされており、有害な塩基配列を含まない。

4 性質に関する事項

bar 遺伝子は、アセチル基転移酵素を生成させる。この酵素は、グルホシネートをア

セチル化し、N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートによるグルタミン合成酵素の阻害作用を不活性化する。ベクターpGSV71においてLBとRBのT-DNAに挟まれた部分が新たにワタゲノム中に導入された。両端にあたるLBとRBに関しては部分配列のみで完全な配列は導入されなかった。

組換えワタ LLCotton25 に導入された DNA

略号	ベクター上での位置	サイズ (bp)	遺伝的要素及び機能
RB	部分配列		pTiB6S3由来のT-DNAの右側境界反復配列。
	0223-0249	27	合成ポリリンカー配列
P35S3	0250-1634	1385	カリフラワーモザイクウイルス35S転写物遺伝子由来のプロモーター領域
bar	1635-2186	552	bar遺伝子のコード領域。
	2187-2205	19	合成ポリリンカー配列
3'nos	2206-2465	260	pTiT37のT-DNA由来のノパリン合成酵素遺伝子(nos)の3'非翻訳末端からの260bp
	2466-2519	54	合成ポリリンカー配列
LB	部分配列		pTiB6S3由来のT-DNAの左側境界反復配列。

5 純度に関する事項

挿入したすべての DNA 断片はすべてクローン化され、その塩基配列が解明されている。したがって目的外の遺伝子の混入はなく純化されている。

6 安定性に関する事項

挿入 DNA の安定性を調べるために自家交配した後代種及び FM989 品種を戻し交配した系統を用いてサザンブロット分析を行った結果、すべての試験サンプルにおいて、予測された内部 T-DNA 断片と右境界組込み断片が確認され、ゲノムレベルで挿入遺伝子の安定性が確認された。

7 コピー数に関する事項

サザンブロット分析の結果から、bar 遺伝子カセットの完全な 1 コピーがワタゲノムに組み込まれていることが示された。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

除草剤(グルホシネート・アンモニウム)を散布した場合の葉(生育の4段階)、有毛種子(綿毛を除いたもの)、種子(有毛種子からリント皮を除いたもの)中の PAT 含量の平均値はそれぞれ、約 57.7~98.3mg/g 生重、61.3~74.5mg/g 生重、108~136mg/g 生重(平均 127mg)、また、根、茎については、グルホシネート・アンモニウムを散布しなかった場合であるが、根で 5.63~10.1mg/g 生重、茎で 34.3~45.5mg/g であった。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子(*aadA*)は、プラスミド pGSV71 において T-DNA の外部に位置しているので、ワタゲノム中に導入されなかった。

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

LLCotton25 に導入された DNA の塩基配列を決定し、発現ベクターpGSV71 上の T-DNA で挟まれた領域の塩基配列と比較したところ、相違はなかった。*bar* 遺伝子はコザックコンセンサス配列を持つ翻訳開始点を有し、内部の ATG から目的以外のたん白質を発現する可能性はないと考えられる。LLCotton25 における挿入遺伝子の発現を調べるために、*bar* 遺伝子の相補鎖 RNA プローブとしてノーザンブロット分析を行ったところ、*bar* 遺伝子は根、葉、種子等の全ての組織において存在することが確認された。また想定される長さの RNA が作られていることが確認された。

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

導入された *bar* 遺伝子により LLCotton25 にはグルホシネートを散布してもその影響を受けない特性を付与する PAT が発現しており、その作用でグルホシネートを散布しても作物が枯死しないこと以外は既存のワタと同等である。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

遺伝子産物とデータベースに登録されている既知の毒素(アレルゲンを含む)との *bar* 遺伝子産物(PAT)のアミノ酸配列との相同性検索が行われた。1)既知毒素と *bar* 遺伝子産物についての全体的な相同性の評価、2)調べたいたん白中にアレルゲンエピトープになり得る連続した 8 個のアミノ酸配列長を単位とした部位毎の相同性の評価結果、1)において他の生物種由来の PAT 以外に有意な相同性を示さなかった。また、2)においては既知アレルゲンと PAT の 8 個単位におけるアミノ酸長の連続配列との完全な一致はなかった。

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

(1) 人工胃液に対する感受性

組換え大腸菌により生産させた *bar* 遺伝子産物である PAT を人工胃液中で 0.5~60 分間処理した結果、30 秒以内に検出限界以下に消化されることがウエスタンブロット分析により確認された。

(2) 人工腸液に対する感受性

組換え大腸菌により生産させた *bar* 遺伝子産物である PAT を人工腸液中で 0.5~60 分間処理した結果、5 分以内に検出限界以下に消化されることがウエスタンブロット分析により確認された。

(3) 加熱処理に対する感受性

PAT を 40℃以上で 15 分間保温した場合、酵素活性が失活することが確認された。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

PAT は極めて高い基質特異性を有している。グルホシネート以外に生体内で PAT の

基質となるものとして最も可能性の高い物質は、親和性は極めて低いながらも δ -ヒドロキシリジンが考えられるが、植物中においてはその存在は報告されていない。したがって新たに導入された PAT の基質となる物質はワタには存在せず、新たに導入された PAT がワタの代謝経路に影響を与えることはないと考えた。

5 宿主との差異に関する事項

綿実における主要構成成分の分析では粗脂肪、粗たん白、粗繊維、灰分、酸性デタージェントファイバー(ADF)、中性デタージェントファイバー(NDF)、炭水化物、水分において同等性が確認された。アミノ酸組成、脂肪酸組成についても、ペンタデカン酸を除き、同等性が確認された。ペンタデカン酸については定量限界以下の測定値が多く、ばらつきが大きかったためと考えられた。

カルシウム、リンなどの無機塩類、ビタミン E の含量の測定においては、カルシウムを除き、同等性は確認された。なお、カルシウムについても、測定値は文献値の範囲内であった。

有害生理活性物質であるゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸に該当するステルクリン酸、マルバリン酸、ジヒドロステルクリン酸を分析したところ、ジヒドロステルクリン酸を除き同等性が確認された。ジヒドロステルクリン酸に関しても、測定値は文献値の範囲内であり問題はないと考えられる。以上のことから、既存のワタと比較して生物学的に意味のある差異はないと考えられた。

6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

LLCotton25 系統の圃場試験は、米国の冬季育成圃場及び栽培適地において実施され、除草剤耐性、病害虫感受性、形態や成長性、生殖性、一般農業特性及び雑草性について調べられた。これらの圃場試験において、病害虫に対する予想外の耐性や異常な雑草化は認められなかった。

7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

LLCotton25 の生存・増殖能力は、親品種と差異がないことが米国における圃場試験で明らかとなっている。

8 不活化法に関する事項

物理的防除(耕起)や化学的防除(グルホシネート以外の非選択性除草剤の散布)など、ワタを不活化する従来の方法によって LLCotton25 は不活化される。

9 外国における認可等に関する事項

米国においては、2002 年 2 月、米国農務省に無規制裁培の申請を行い、2003 年 3 月に認可を得ている。また、2003 年 4 月に米国食品医薬品局(FDA)に食品及び飼料としての安全性に関する協議を終了している。日本では 2003 年 2 月、環境安全性の認可を得るために模擬的環境利用の申請を行い、4 月にその承認が得られ、現在、独立行政法人農業技術研究機構九州沖縄農業研究センターの隔離ほ場にて環境安全性の栽培試験を行っている。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

LLCotton25 と従来のワタの作出、育種及び栽培方法の違いはワタの生育期間を通じてグルホシネートを利用できる点であり、それ以外は従来と同じである。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

LLCotton25 の種子の製法及び管理方法については、既存のワタ品種と同じである。

7 2 から 6 までの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

- 1 単回投与の毒性に関する試験
- 2 反復投与の毒性に関する試験（短期）
- 3 反復投与の毒性に関する試験（長期）
- 4 世代繁殖に関する試験
- 5 催腫瘍性に関する試験
- 6 変異原性に関する試験
- 7 催奇形性に関する試験
- 8 対象家畜等を用いた飼養試験
- 9 その他必要な試験

組換え大腸菌を用いて生産された PAT を用いてマウスの急性静脈内投与試験が自社内で行われた。PAT1、10mg/kg をマウス各 5 匹に静脈内投与したところ、いずれの投与群でも死亡例はなく、15 日後の剖検においても異常な病理学的所見は認められなかった(参考文献⑰)。

IV 審議結果

LLCotton25 について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献

- ① OECD 1999. Series of Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11 Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosinothricin herbicide;. ENV/JM/MONO(99)13.
- ② Metzger R.M., Supak J.R. 1990. Characteristics of Cotton Varieties Grown in Texas. Third Edition. Texas Agricultural Extension Service B1312. p. 34.
- ③ Berardi L.C., Goldblatt L.A. 1980. Gossypol. In Toxic constituents of plant foodstuffs. 2nd Ed., I.I. Liener, ed., Academic Press, New York. 183-237.
- ④ Gunstone F.D., Harwood J.L., Padley F.B. 1994. In The Lipid Handbook, 2nd Edition (Chapman & al., eds.) London. University Press, Cambridge. pp. 13-14, 47-146.
- ⑤ Crockett L. 1977. Wildly Successful Plants: North American Weeds. University of Hawaii Press, Honolulu, Hawaii.
- ⑥ Holm, L., Pancho, J.V., Herberger, J.P., Plucknett, D.L. (1979) A Geographical Atlas

- of World Weeds. John Wiley and Sons, NY. 391 pp.
- ⑦ Muenscher W.C. 1980. Weeds. Second Edition. Cornell University Press, Ithaca and London.
 - ⑧ Niles G.A., Feaster, C.V. 1984. Cotton, Agronomy No. 24, p 205, Soil Science Society of America, Inc., (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds). Wisconsin, USA
 - ⑨ NCPA, 1999 - National Cottonseed Products Association. Cottonseed and its Products. CSIP 10th Edition. 1999 Digital Edition. National Cottonseed Products Association, Inc. P.O. Box 172267. Memphis, TN 38187.
 - ⑩ Reynaerts A. 1999. Description of vector pGSV71 (*Gossypium hirsutum*). Aventis Document #C004636.
 - ⑪ Cornelissen M., Vandewiele M. 1989. Nuclear transcriptional activity of the tobacco plastid *psbA* promoter. Nucleic Acids Research. 17. 19-29.
 - ⑫ Bolivar F., Rodriguez R.L., Greene P.J., Betlach M.C., Heyneker H.L., Boyer H.W., Crosa J., Falkow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene. 2. 95-113.
 - ⑬ Itoh Y. Watson J.M., Haas D., Leisinger T. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas plasmid* pVS1. Plasmid. 11. 206-220.
 - ⑭ Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Sathah, A., Nagaoka, K., Thompson, C.J. 1986. The Bialaphos Biosynthetic Genes of *Streptomyces hygroscopicus*: Molecular Cloning And Characterization Of The Gene Cluster. *Molec. Gen. Genet.* 205:42-50.
 - ⑮ Odell J.T., Nagy F., Chua, N-H. 1985. Identification of DNA Sequences Required for Activity of the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter. Nature. 313. 810-812.
 - ⑯ Depicker A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman H.M. 1982. Nopaline synthase : transcript mapping and DNA sequence. J. Molec. Appl. Genet. 1. 561-573.
 - ⑰ Kennel P. 2002. PAT(Phosphinothricin-Acetyl-Transferase) protein derived from bar gene acute toxicity by intravenous injection in the mouse. Bayer CropScience Report of study SA 01352