

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グルホシネート耐性及び
チヨウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統**

**平成 24 年 7 月 5 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
(1)	遺伝的素材に関する事項	4
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	4
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
3	宿主に関する事項	5
(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	5
(2)	遺伝的先祖に関する事項	5
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	5
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	5
(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	5
(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	5
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項	6
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	6
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
4	ベクターに関する事項	6
(1)	名称及び由来に関する事項	6
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	7
(4)	伝達性に関する事項	7
(5)	宿主依存性に関する事項	7
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	7
(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	7
5	挿入遺伝子に関する事項	7
(1)	供与体に関する事項	7
(2)	遺伝子の挿入方法に関する事項	8
(3)	構造に関する事項	8
(4)	性質に関する事項	9
(5)	純度に関する事項	10
(6)	コピー数に関する事項	10
(7)	安定性に関する事項	10
(8)	発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	11
(9)	抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	11

（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	1 1
6 組換え体に関する事項.....	1 2
（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	1 2
（2）遺伝子産物の毒性に関する事項	1 2
（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 2
（4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	1 4
（5）宿主との差異に関する事項	1 4
（6）外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	1 6
（7）生存及び増殖能力の制限に関する事項	1 6
（8）不活化法に関する事項	1 6
（9）外国における認可等に関する事項	1 6
（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項	1 6
（11）種子の製法及び管理方法に関する事項	1 7
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	1 7
IV 審議結果	1 7
V 参考文献及び参考資料.....	1 7

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統」に係る 安全性確認

I はじめに

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統（以下「T304-40 ワタ」という。）について、平成 23 年 2 月 14 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統

性 質：除草剤グルホシネート耐性、チョウ目害虫抵抗性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer CropScience（ドイツ）

T304-40 ワタは、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* に由来する *bar* 遺伝子の塩基配列を一部改変した改変 *bar* 遺伝子及び土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *berliner* に由来する改変 *cry1Ab* 遺伝子を導入したワタである。

改変 *bar* 遺伝子により発現する改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（以下「改変 PAT たん白質」とする。）が、除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することで、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性が付与される。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子により発現する改変 Cry1Ab たん白質が、ワタ栽培で発生するニセアメリカタバコガ、アメリカタバコガ、オオタバコガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与させる。なお、チョウ目以外の昆虫や動物が改変 Cry1Ab たん白質を摂食しても影響はない。

T304-40 ワタの作出に用いた導入用プラスミドには、導入遺伝子配列領域とは別の領域にストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子（以下「*aadA* 遺伝子」とする。）が存在する。*aadA* 遺伝子により、導入用プラスミドを有するアグロバクテリウムのみをストレプトマイシン等の添加された培地上で選抜することができる。また、導入用プラスミドの導入遺伝子配列領域外には、ネオマイシンリン酸基転移酵素 I 遺伝子（以下「*nptI* 遺伝子」とする。）の断片も存在する。なお、これらの遺伝子が T304-40 ワタに導入されていないことは確認されている。

T304-40 ワタと既存のワタを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そこで、遺伝子組換え操作により付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

一般に、ワタは綿実及び綿実油かすが家畜等の飼料に使用されている。

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

宿主に用いられた植物は、アオイ科 (Malvaceae)、ワタ連 (*Gossypieae*)、ワタ属 (*Gossypium*) に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) である。

T304-40 ワタには、放線菌 *S. hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子及び土壌細菌 *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 由来の改変 *cry1Ab* 遺伝子が導入されている。

改変 *bar* 遺伝子産物である改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（以下「改変 PAT たん白質」とする。）は、除草剤グルホシネート耐性を付与する。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子産物である改変 Cry1Ab たん白質は、チョウ目害虫抵抗性を付与する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

ワタは、綿実及び綿実油かすの形態で、家畜等の飼料として安全に利用された歴史を有することが明らかとなっている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

宿主植物であるワタ及び T304-40 ワタの構成成分等の量は明らかになっており、比較が可能である (Amann and Eickhoff, 1999; Berberich *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 2005; Calhoun *et al.*, 1995; ILSI, 2007; Lundquist, 1995; Nida *et al.*, 1996; OECD, 2004; USCA, 1982)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

T304-40 ワタと既存のワタとの使用方法について、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調製及び加工方法を確認した結果、相違は認められない。

(1) ～ (4) より、T304-40 ワタの飼料としての安全性評価においては、既存のワタとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

T304-40 ワタは、改変 *bar* 遺伝子産物の発現する改変 PAT たん白質により、除草剤グルホシネート耐性が付与されており、除草剤グルホシネートを散布されても影響を受けずに生育することができる。そのため、生育時期を問わず、農作物への付着を避けるための措置を講ずることなく除草剤グルホシネートを散布することができ、効率的な雑草防除が可能になる。また、改変 *cry1Ab* 遺伝子の発現する改変 Cry1Ab たん白質により、ワタ栽培の主要チョウ目害虫に対して抵抗性を示す。よって、害虫防除のための殺虫剤散布量を軽減することが可能となる。

なお、T304-40 ワタ系統の飼料としての利用目的及び利用方法は従来のワタと相違ない。

85 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

T304-40 ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の商業品種 Coker315 である。

90 (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 種が分布している (Fryxell, 1992; Wendel and Cronn, 2003)。栽培種は 2 倍体種(2n=26)の *G. herbaceum* 及び *G. arboreum*、並びに、4 倍体種(2n=52)の *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* の 4 種のみである。今日生産されるワタの 90%以上を *G. hirsutum* が占めている (OECD, 2008)。

95 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタは、有害生理活性物質として、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸 (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の総称) を含むことが知られている。

100 ゴシポールは多くのワタ属で認められるテルペン類化合物であり、種子を含む植物の腺組織に局在しており (Abou-Donia,1989)、草食動物や害虫に対して抵抗性を持つために重要な物質であるとされている (Bell,1986)。結合型と遊離型があり、結合型は有害性を示さないが、遊離型のゴシポールは単胃動物に対する毒性が強い。従って、綿実由来の食品及び飼料では、ゴシポール濃度を最小限に抑える必要がある (Berardi and Goldblatt,1980 ; 唐澤, 2004)。

105 ステルクリン酸 (C-19) やマルバリン酸 (C-18) 等のシクロプロペン脂肪酸は、ワタ特有の脂肪酸である。ステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害することにより、鶏卵の卵黄膜の脆弱化や変色を引き起こすことから (Gunstone *et al.*,1994)、産卵鶏に不給与とされる等、家畜により綿実等の給餌量が制限されている (田先, 1996 ; 唐澤, 2004)。これらの脂肪酸は、製油工程を経た後では著しく減少する (新谷,1989; Gunstone *et al.*,1994)。

110 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

115 ワタの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

ワタに感染する病原体は知られているが (Munro,1987)、それら病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

120 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできず、雑草化しないことが知られている (OECD, 2008)。なお、我が国においても栽培種のワタが自生したという報告はなされていない。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ワタは一年生、短日性、両性花の植物であり、主に自家受粉により種子が作られる (Niles and Feaster, 1984)。他家受粉の場合、ワタの花粉は重く粘性があるため、通常的环境下では風媒ではなく虫媒により行われることもある。また、
130 同一倍数体のワタ属との間では交雑する可能性があるが、異なる倍数体のワタ属との間では交雑しない (OECD, 2008)。我が国において宿主に用いられたワタと交雑可能な近縁野生種の存在は知られていない。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

135 綿実収穫された後、綿繰り機で綿毛 (長繊維綿毛: リント) を取り除いて脱綿毛綿実となり、洗浄後、短い繊維 (リントー) を除去する撚摺機により綿実殻と種子に分離される。種子は粉碎・搾油され、綿実油かすが得られる。綿実油かすは、成牛や成羊等に対して配合飼料の原料として利用されている。また、豚及び鶏の飼料には、適切な量で配合される。綿実殻は栄養価が少なくかさの多い成分であるものの、乾牧草と同等の価値があり、牧草の補充供給物として利用されている (NCPA, 1999)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

145 上記 (3) のとおり、ワタにはゴシポール等の有害生理活性物質が存在することが知られているが、上記 (8) のとおり、綿実及び綿実油かす等を適切に取り扱うことにより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

150 栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできないことが報告されている。

ワタは、種子の発芽最低温度が12℃、最適温度が27～36℃で、日照を好む植物である。ワタの生育のためには、年平均気温が15℃以上、無霜期間が180～200日以上、晴天日が生育期間の40%以上あることが必要とされる。我が国のように、ワタの播種期・幼苗期に低温・多湿な環境では、種子は地中で腐敗し、幼苗は種々の病原菌により立枯れ・腰折れ等を引き起こすことが多い。また、結実期・開絮期には、多雨・多湿のため、さくが病気に侵されることが多い (原田, 1987)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

160 ワタ連 (*Gossypieae*) にはゴシポール腺があり、有害物質であるゴシポールが含まれる。ワタ連に分類されるワタ属 (*Gossypium*) の近縁種には、8つの属がある (Fryxell, 1968)。

4 ベクターに関する事項

165 (1) 名称及び由来に関する事項

T304-40 ワタの作出には、発現ベクターpTDL008 が用いられた。本ベクターは、プラスミド pGSV20 を基に作成された（参考資料 1）。

（２）性質に関する事項

170 pTDL008 の塩基数は 14,393bp である。その塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている。pTDL008 に存在する全ての遺伝子の特性は明らかとなっており、既知の有害な塩基配列を含まない（参考資料 2）

（３）薬剤耐性に関する事項

175 pTDL008 は、大腸菌 (*E. coli*) 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) において、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子 (*aadA* 遺伝子) を有する。本遺伝子は pTDL008 を構築するためにプラスミドが挿入された大腸菌を選抜するマーカーとして用いられた。また、完全な遺伝子ではないが、pTDL008 は、カナマイシンやネオマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質に対して耐性を付与する選択マーカー遺伝子 (*nptII* 遺伝子) の断片を有する。なお、これらの遺伝子は T304-40 ワタには導入されていないことが確認されている（５（６）コピー数に関する事項参照）。

180

（４）伝達性に関する事項

185 pTDL008 には伝達性因子は含まれていない。

（５）宿主依存性に関する事項

pTDL008 の宿主域は、*E. coli* 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) など数種のグラム陰性細菌に限られており、他の植物あるいは家畜等が宿主となることはない。

190

（６）発現ベクターの作成方法に関する事項

T304-40 ワタの作出に用いた pTDL008 は、基となった pGSV20（参考資料 1）の T-DNA 領域に、後述の改変 *bar* 遺伝子発現カセットと改変 *cryIAb* 遺伝子発現カセットを含む領域を挿入して作出された。

195

（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

アグロバクテリウム法 (Murray *et al.*, 1999) により、pTDL008 の T-DNA 領域をワタゲノム中に導入した。

200

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

- ・改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygroscopicus* に由来し、野生型 *bar* 遺伝子がコードする野生型 PAT たん白質の N-末端の 2 つのコドン、植物で使用頻度の高

205

いコドン及び翻訳の効率を高めるコドンにそれぞれ置換したものである。

- ・ 改変 *cry1Ab* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *berliner* に由来し (Höfte *et al.*, 1986)、野生型 *cry1Ab5* 遺伝子の C-末端領域の一部を含まず、翻訳効率向上のため N-末端にコドンが導入されているほか、ワタにおける発現に適するよう、アミノ酸配列を変えずに、コドンの一部改変したものである (参考資料 3)。

② 安全性に関する事項

Streptomyces 属は、土壌、飼料、堆肥等に存在し、古くより身近な存在であった。家畜等の動物による直接的な食経験はないが、実際に家畜等の動物との長い接触の歴史があり、病原性等の問題は報告されていない。また、*B. thuringiensis* は、家畜など動物による直接的な食経験はないが、微生物農薬として、長期にわたり、穀物、飼料、果実、野菜、繊維作物等に安全に利用されている (OECD, 2007)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

pGSV20 の T-DNA 領域に改変 *bar* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセットを挿入し、導入用プラスミド pTDL008 を得ている。

アグロバクテリウム法 (Murray *et al.*, 1999) により、組換え遺伝子をワタゲノムに導入している。再生した植物体を、グルホシネートを含む再生培地を用いて培養することにより、グルホシネート耐性株を選抜している。ほ場において選抜を繰り返した後、優良系統を選抜し T304-40 ワタを得ている。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

改変 *bar* 遺伝子のプロモーターには、カリフラワーモザイクウィルス (CaMV) 由来の P35S3 プロモーターを用いた (Odell *et al.*, 1985)。

改変 *cry1Ab* 遺伝子のプロモーターには、Subterranean clover stunt virus (SCSV) のセグメント 7 遺伝子由来のプロモーター (Boevink *et al.*, 1995) を人為的にタンデムに連結したものである Ps7s7 プロモーターを用いた。

② ターミネーターに関する事項

改変 *bar* 遺伝子のターミネーターには、*A. tumefaciens* 由来のプラスミド pTiT37 の T-DNA より得たノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域由来である 3'nos が用いられている (Depicker *et al.*, 1982)。

改変 *cry1Ab* 遺伝子のターミネーターには、*F. bidentis* (yellowtop : キアレチギク) 由来の NADP リンゴ酸酵素遺伝子の 3'非翻訳領域由来である 3'me1 が用いられている (Marshall *et al.*, 1996)。

③ その他

Ps7s7 プロモーター下流に、改変 *cry1Ab* 遺伝子の転写効率を高めるため、

O. sativa (イネ) 由来の E1 遺伝子のリーダー配列である 5'el (Michiels *et al.*, 1992) を結合させた。

以上、挿入 DNA の構成要素はいずれもその由来及び機能等は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない (参考資料 4)。

(4) 性質に関する事項

挿入 DNA の構成要素の由来及び機能等について、表 1 にまとめた。改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の機能の詳細は表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び性質等

構成要素	由来及び機能
改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子発現カセット	
3'mel	<i>F. bidentis</i> (yellowtop : キアレチギク) 由来のターミネーター領域 (Marshall <i>et al.</i> , 1996)。
<i>cry1Ab</i> (改変 <i>cry1Ab</i>)	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i> 由来する野生型 <i>cry1Ab5</i> 遺伝子 (Höfte <i>et al.</i> , 1986) の一部を改変した遺伝子。チョウ目害虫抵抗性を付与する。
5'e1	<i>O. sativa</i> (イネ) 由来の E1 遺伝子のリーダー配列領域 (Michiels <i>et al.</i> , 1992)。
Ps7s7	Subterranean clover stunt virus (SCSV) セグメント 7 遺伝子由来のプロモーター領域 (Boevink <i>et al.</i> , 1995)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット	
P35S3	Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域 (Odell <i>et al.</i> , 1985)。
<i>bar</i> (改変 <i>bar</i>)	<i>S. hygroscopicus</i> に由来する改変 PAT たん白質をコードし (Thompson <i>et al.</i> , 1987)、除草剤グルホシネート耐性を付与する。
3'nos	<i>A. tumefaciens</i> 由来のターミネーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。

① 改変 *bar* 遺伝子の機能

植物の窒素代謝の過程で生成されるアンモニアの無毒化には、グルタミン合成酵素が中心的役割を果たしており、グルホシネートはグルタミン合成酵素の働きを阻害することでアンモニアを蓄積させ、除草活性を発揮する。改変 *bar* 遺伝子により発現した改変 PAT たん白質がグルホシネートを N-アセチルグルホシネートに変換することにより、グルホシネートを不活化させる。その結果、植物はグルホシネートの影響を受けずに生育できる。

② 改変 *cry1Ab* 遺伝子の機能

改変 *cry1Ab* 遺伝子によって産生される改変 Cry1Ab たん白質は、チョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ、アメリカタバコガ、オオタバコガ及びワタアカミムシ等に殺虫活性を示す。

270 改変 Cry1Ab たん白質を含む *Bt* たん白質は、標的昆虫の中腸で分泌される
プロテアーゼにより部分消化され、活性型のコアたん白質となる。コアたん白
質は、中腸上皮上に存在する、コアたん白質に特異的な受容体と結合すること
により、中腸上皮細胞膜にイオンチャネルを形成する。その結果、消化プロセ
275 スが阻害された標的昆虫は、飢餓状態に陥る、又は、敗血症を引き起こすこと
で死に至る (Knowles and Dow, 1993; Broderick *et al.*, 2006)。

(5) 純度に関する事項

挿入された DNA の構成要素はすべてクローニングされ、その塩基配列が解明
されており (参考資料 4)、目的外の遺伝子の混入はなく純化されている。

280

(6) コピー数に関する事項

T304-40 ワタの葉からゲノム DNA を抽出し、T-DNA 領域及び各構成要素を
プローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、1 コピーの T-DNA 領
域 (改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセット及び改変 *bar* 遺伝子発現カセット) ととも
285 に、1 コピーの改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセット及び 3'mel 断片が移入されたこ
とが確認された (参考資料 5)。T304-40 ワタに導入された DNA の塩基配列及
び近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、5'側から、3'mel 断片、
Ps7s7 プロモーター領域が一部欠損した改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセット及びほ
ぼ完全長の T-DNA 領域の順に移入されていた。導入遺伝子の塩基配列は、
290 3'mel 断片中に 1 塩基置換があった以外、導入用プラスミド pTDL008 上の T-
DNA 領域の塩基配列と完全に一致することが確認された (参考資料 4)。

また、導入用プラスミド pTDL008 上の T-DNA 領域外配列がワタゲノムに移
入されていないことを確認するため、T-DNA 領域外配列をプローブとして同様
にサザンブロット分析を行った。その結果、T-DNA 領域外配列は T304-40 ワタ
295 に移入されていないことが確認された (参考資料 6)。

更に、T304-40 ワタにおける T-DNA 領域の挿入箇所の近傍配列と宿主ワタ
Coker315 の配列を比較した。その結果、挿入箇所の 32bp の欠損を除き、宿主
ワタゲノムと一致していることが確認された (参考資料 7)。挿入箇所に内在性
遺伝子が存在した可能性を、BLASTx によりデータベース (Dad, Genpept,
300 Uniprot) に登録されている既知たん白質との相同性を確認した。その結果、
T304-40 ワタの挿入箇所を含めた近傍領域に既知たん白質と相同性を示す配列
は確認されず、内在性遺伝子が存在した可能性は低いと考えられた (参考資料
8)。

305 (7) 安定性に関する事項

挿入遺伝子が複数の後代世代において安定して遺伝していることを確認するた

め、6 世代の T304-40 ワタを用いて、サザンブロット分析を行った。その結果、T304-40 ワタの挿入遺伝子が複数世代に安定して遺伝していることが確認された（参考資料 9、10）。

310

（8）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

315

T304-40 の各生長期（4-6 葉期、開花期及び開花終了後）の各組織（葉、茎及び根(4-6 葉期及び開花期)、花粉、頂端、花蕾及び花(開花期)並びにさく(開花終了後)) における改変 *bar* 遺伝子及び改変 *cry1Ab* 遺伝子の発現を、それぞれの遺伝子の転写産物に対して相補的な RNA をプローブとして、ノーザンブロット分析により確認した。その結果、検出限界値以下であった花粉中の改変 *cry1Ab* 遺伝子を除き、全ての組織で導入遺伝子の発現が確認された（参考資料 11）。

320

次に、各組織（根、茎、葉、花蕾、頂端、さく、全地上部、花粉、蜜、花及び種子）、未加工種子（穀実、地毛外皮）、加工種子（脱地毛綿実、長繊維綿毛（リント）、短繊維綿毛（地毛）、種子外皮、綿実油かす、加熱処理綿実油かす、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油）における改変 PAT たん白質及び改変 Cry1Ab たん白質の発現量を、ELISA 分析により確認した。その結果、改変 PAT たん白質については、定量限界値又は検出限界値を下回った加熱処理綿実油かす、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油を除く全ての試料において発現量が確認された。また、改変 Cry1Ab たん白質については、定量限界値又は検出限界値を下回った脱地毛綿実地毛外皮、長繊維綿毛、種子外皮、綿実油かす、加熱処理綿実油かす、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油を除く全ての試料において発現量が確認された（参考資料 12、13、14）。

325

330

（9）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド pTDL008 の T-DNA 領域外には、ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性（*aadA*）遺伝子及びネオマイシンリン酸基転移酵素 I（*nptII*）遺伝子の断片（*nptII*-fragment）が存在する。上記（6）コピー数に関する事項に記載したとおり、これらの遺伝子が T304-40 ワタに導入されていないことは、サザンブロット分析により確認されている（参考資料 6）。

335

（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

340

遺伝子導入により生じた、導入遺伝子とワタゲノムの境界領域（5'側及び 3'側）及び導入遺伝子内の境界領域（3'mel 及び改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセット、改変 *cry1Ab* 遺伝子発現カセット及び T-DNA 領域）、計 4 つの境界領域において新たなオープンリーディングフレーム（ORF）が作られた可能性をバイオインフォマティクス解析により確認した。ORF は、終止コドン（TAA、TAG 又は TGA）に挟まれ、3 アミノ酸以上の長さを持つ領域と定義し、GetORF（EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suite）を用い、6 つの読み枠（センス鎖 3 つ及びアンチセンス鎖 3 つの読み枠）で ORF を検索した。その結果、24 個の ORF が検出された（参考資料 8）。検出された 24 個の ORF

345

350 のうち、8 アミノ酸以上の長さを持つ 23 個の ORF について、BLASTP アルゴリズムを用い、データベース（Uniprot-Swissprot, Uniprot-TrEMBL, DAD, PDB, GenPept）中の既知の毒素たん白質との相同性検索を行った。その結果、登録されている既知の毒素たん白質との間に相同性は認められなかった（参考資料 15）。よって、仮にこれらの ORF により新たなたん白質が作られたとしても、毒性を示す可能性は低いと考えられる。

355 次に、検出された 24 個の ORF の発現の可能性を確認するため、T304-40 ワタ及び非組換え体の各組織について、4 つの境界領域の RNA プローブを用いて、ノーザンブロット分析を行った（参考資料 11）。その結果、いずれの組織においても新たな ORF による転写産物は認められなかった（参考資料 20）。よって、遺伝子導入により新たに作られた ORF からたん白質が生ずる可能性は低いと考えられる。

360

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

365 T304-40 ワタが組換え DNA 操作により新たに獲得した性質は、改変 PAT たん白質を発現することにより獲得した除草剤グルホシネート耐性、及び改変 Cry1Ab たん白質を発現することにより獲得したチョウ目害虫抵抗性である。

（2）遺伝子産物の毒性に関する事項

① 改変 PAT たん白質

370 改変 PAT たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用い、データベース（Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept）中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行った。また、BLOSUM62 を用い、データベース中に登録されている全てのたん白質との類似性を評価した。その結果、改変 PAT たん白質と既知の毒性たん白質との相同性は認められなかった（参考資料 16）。

375

② 改変 Cry1Ab たん白質

380 改変 Cry1Ab たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用い、データベース（Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept）中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行った。また、BLOSUM62 を用い、データベース中に登録されている全てのたん白質との類似性を評価した。その結果、改変 Cry1Ab たん白質と既知の毒性たん白質との相同性は認められなかった（参考資料 18）。

（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

385 試験には、*E. coli* で生産した改変 PAT たん白質及び改変 Cry1Ab たん白質をそれぞれ用いられている。これらのたん白質及びワタ植物体内で発現している各たん白質については、a) 分子量（SDS-PAGE）、b) 免疫反応性（ウェスタンブロット分析）、c) 糖たん白質染色分析（GlycoProfile™ III fluorescent kit;

390 Sigma-Aldrich)、d) ペプチド分析 (LC/MS)、e) 活性 (改変 PAT たん白質: 比色定量, 改変 Cry1Ab たん白質: 生物検定)、f) N-末端配列の決定 (エドマン分解) により、同一性が確認されている (参考資料 20)。

① 人工胃液に対する感受性

395 (f) 改変 PAT たん白質
改変 PAT たん白質の人工胃液 (pH 1.2、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 0.5 分以内に 90%以上が分解され、2 分以内に検出不可能な程度にまで分解されることが確認された (参考資料 21)。

400 (g) 改変 Cry1Ab たん白質
改変 Cry1Ab たん白質の人工胃液 (pH 1.2、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 0.5 分以内に検出不可能な程度にまで分解されることが確認された (参考資料 22)。

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

405 (f) 改変 PAT たん白質
改変 PAT たん白質の人工腸液 (pH7.5、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 2 分以内に完全に分解されることが確認された (参考資料 23)。

410 (g) 改変 Cry1Ab たん白質
改変 Cry1Ab たん白質の人工腸液 (pH 7.5、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から完全長の Cry1Ab たん白質は速やかに消化されるが、60 分処理を行っても完全には分解されないことが確認された (参考資料 24)。

415

③ 加熱処理

(f) 改変 PAT たん白質
a. 熱処理による影響
420 改変 PAT たん白質の熱安定性 (60、75、90°Cでそれぞれ 10、30、60 分間処理) を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認した。その結果、90°Cで 60 分処理を行っても安定であった。また、ウエスタンブロット分析の結果から、抗体との反応性に対する熱処理の影響も認められなかった (参考資料 25)。

425 b. 酵素活性に対する熱処理の影響
PAT たん白質の反応速度と温度 (10°C~55°C) の関係を測定した。その結果、45°Cまで酵素活性が増加し、45°C以上では増加は認められなかった。また、35°C以上の温度で 15 分間保温した後に酵素活性を測定すると、PAT たん白質の失活が認められた (Botterman *et al.*, 1991)。
以上のことから、改変 PAT たん白質は、熱に対し構造的には安定である

430 が、酵素活性は不安定であると考えられた。

(イ) 改変 Cry1Ab たん白質

a. 熱処理による影響

435 改変 Cry1Ab たん白質の熱安定性（60、75、90℃でそれぞれ 10、30、
60 分間処理）を SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により確認
した。その結果、90℃で 60 分処理を行ってもある程度安定であった。また、
ウエスタンブロット分析の結果から、抗体との反応性に対する熱処理
の影響も認められなかった（参考資料 26）。

b. 殺虫活性に対する熱処理の影響

440 改変 Cry1Ab たん白質に熱処理（45℃及び 60℃、それぞれ 0、5、10、
30、60、120、240 分及び一晩）を施し、これらの混入した餌を標的昆虫
であるアメリカタバコガに与え、1 週間後の死亡率を測定して半数致死濃
度（LC₅₀）を決定し、殺虫活性を評価した。その結果、改変 Cry1Ab たん
白質は 45℃では処理時間にかかわらず同程度の LC₅₀ 値を示した。60℃で
445 は 120 分以上の処理により LC₅₀ 値は約 3 倍となり、一晩処理により殺虫
活性はほぼ失われた（参考資料 27）。

以上のことから、改変 Cry1Ab たん白質は、90℃・60 分処理ではある程
度安定的であることが確認されたが、60℃・120 分以上の処理により、殺虫
活性が低下することが確認された。

450

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 改変 PAT たん白質

455 PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L-グルホシネ
ートをアセチル化し、これを不活化する。PAT たん白質は非常に高い基質特異
性を有し、L-グルホシネート以外に T304-40 ワタ中で基質となる物質は考え
られず、ワタが持っている本来の代謝経路に影響を与える可能性は極めて低い
と考えられる（Thompson, *et al.*, 1987; Droge *et al.*, 1992; Wehrmann *et al.*,
1996）。

② 改変 Cry1Ab たん白質

460 改変 Cry1Ab たん白質については、*Bt* たん白質が酵素活性を持つという報
告はなく（参考資料 33）、また、宿主の代謝系から独立して機能するため、
宿主の代謝系に影響し、新たに有害生理活性物質を産生するおそれはないと考
えられる。

465 (5) 宿主との差異に関する事項

T304-40 ワタと従来のワタとの差異を評価するため、2007 年及び 2008 年に
スペインの 16 箇所のは場において T304-40 ワタ及び宿主品種 Coker315 を栽培
した（T304-40 ワタ区（グルホシネート処理区及び未処理区）及び Coker315 区
（グルホシネート未処理区）の 3 処理区を設置。各処理区 3 点平行で実施。）。

470 有毛種子の栄養成分及び有害生理活性物質の分析を行い、宿主品種 Coker315 及び商業栽培品種の文献値との比較を行った（FAO/WHO; 2001; 参考資料 28、29、30）。

① 主要構成成分

475 水分、粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、中性デタージェント繊維及び酸性デタージェント繊維について分析を行った。その結果、T304-40 ワタの分析値は、いずれも宿主品種 Coker315 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

② 脂肪酸組成

480 脂肪酸（カプリン酸(C10:0)、ラウリン酸(C12:0)、ミリスチン酸(C14:0)、ペンタデカン酸(C15:0)、パルミチン酸(C16:0)、マルガリン酸(C17:0)、ステアリン酸(C18:0)、アラキジン酸(C20:0)、ベヘン酸(C22:0)、トリコサン酸(C23:0)、リグノセリン酸(C24:0)、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:0)、エイコセン酸(C20:1)、リノール酸(C18:2)、トランスリノール酸(C18:2)及びアルファリノレン酸(C18:3)) について分析を行った。その結果、T304-40 ワタの分析値は、パルミトオレイン酸(C16:1)を除き、宿主品種 Coker315 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。T304-40 ワタのパルミトオレイン酸(C16:1)の分析値は、表 2 のとおり、宿主品種 Coker315 の分析値と有意な差があり、商業栽培品種の文献値の範囲を外れたが、遺伝子組換えによって付与された性質であるとは考えにくい。また、安全性に支障が生じるとは考えにくい。

表 2 統計学的有意差の認められた成分

項目	脂質中の含有量 (%)					
	Coker315 区 (A)	T304-40 未処理区 (B)	T304-40 処理区 (C)	文献値	統計評価	
サンプル数	48	48	48		A vs B	A vs C
パルミトオレイン酸 (C16:1)	0.45±0.07	0.42±0.04	0.42±0.03	0.46 - 0.89	s	s

(A)区と(B)区及び(A)区と(C)区の分析値について t 検定（有意水準 5%）を行った。

s: 過半数の試験地で有意差が認められ、差異があると評価。

③ アミノ酸組成

アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、

510 フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリン) について分析を行った。その結果、T304-40 ワタの分析値は、いずれも宿主品種 Coker315 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

515 ④ 主要無機塩類及び総トコフェロール
主要無機塩類（カルシウム、リン、カリウム、マグネシウム、鉄及び亜鉛）及び総トコフェロールについて分析を行った。その結果、T304-40 ワタの分析値は、いずれも宿主品種 Coker315 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

520 ⑤ 有害生理活性物質
ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）について分析を行った。その結果、T304-40 ワタの分析値は、いずれも宿主品種 Coker315 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

525 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項
生存及び増殖能力について、T304-40 ワタと非組換え品種との間に差異は認められなかった。

530 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
生存及び増殖能力の制限要因について、T304-40 ワタと非組換え品種との間に相違はないと考えられた。

535 (8) 不活化法に関する事項
物理学的防除（耕耘）や化学的防除（グルホシネート以外の除草剤散布）など、ワタを枯死させる従来の方法によって T304-40 ワタは不活化される。

540 (9) 外国における認可等に関する事項
米国において、米国食品医薬品庁（FDA）より 2011 年 8 月に T304-40 ワタと GHB119 ワタを掛け合わせた品種の食品・飼料としての安全性が確認された。
カナダにおいて、カナダ食品検査庁(CFIA)より 2012 年 1 月に T304-40 ワタと GHB119 ワタを掛け合わせた品種の飼料・環境としての安全性が確認された。
オーストラリア及びニュージーランドにおいて、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)より 2010 年 5 月に T304-40 ワタの食品としての安全性が確認された。

545 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
T304-40 ワタと従来ワタとの栽培方法の違いは、T304-40 ワタでは生育時

期を問わず除草剤グルホシネートを使用することができ、チョウ害虫に対する殺虫剤の使用を軽減若しくは廃止することができる点である。それ以外の点は、従来の作出、育種及び栽培方法と相違はない。

T304-40 ワタには、除草剤グルホシネートが直接散布されるため、グルホシネート及びその主要代謝産物である N-アセチルグルホシネート及び 3-メチルホスフィニコ-プロピオン酸が残留することになる。同じく改変 *bar* 遺伝子を有する遺伝子組換えワタ「除草剤グルホシネート耐性ワタ LLCotton25 系統」の綿実におけるグルホシネート及びその代謝産物の残留値を測定した結果、最大総残留量は 3.4ppm であった（参考資料 31）。我が国において、綿実は飼料中における残留農薬の基準値の対象として設定されていない。食品としての綿実におけるグルホシネートの残留基準値はグルホシネート及びその代謝産物の総和として 4ppm に設定されている（日本食品化学研究振興財団）。以上のことから、除草剤グルホシネート耐性ワタに残留するグルホシネート及びその代謝産物の量は、飼料として問題となる量ではないと考えられた。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

T304-40 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。

組換え植物個体からの自殖又は戻し交配により作出した後代種子については、DNA 検定や ELISA テストキット（リーフストリップ）による確認を行い、不合格となった種子ロットは廃棄するシステムが整備され、母体種子の品質を管理している。また、T304-40 ワタに挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 法により、T304-40 ワタを特異的に識別する方法を確立している（参考資料 32）。

7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

該当しない。

IV 審議結果

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ T304-40 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Amann, Mary M.; Eickhoff, Jane C. Identification of nutrients and antinutrients to analyze in cotton-derived foods for human and animal consumption. Environ. 1999, p.1-5, 41.
- 2 Abou-Donia, Mohamed B. "Gossypol". Toxicants of Plant Origin. Volume IV

- Phenolics Cheeke, Peter.R. ed., CRC Press, Inc., 1989, p.1-22.
- 3 Bell, Alois A. "Physiology of secondary products". Cotton Physiology . Mauney, Jack R.; Steward, James McD. eds. The cotton foundation reference book series, 1986, p.597- 621.
 - 4 Berardi, Leah C.; Goldblatt, Leo A. "Gossypol". Toxic constituents of plant foodstuffs 2nd ed. Liener, I. E. ed. Academic Press, 1980, p.183-237, ISBN 0-12-449960-0.
 - 5 Berberich, Sharon A.; Ream, Joel E.; Jackson, Teri L.; Wood, Randall.; Stipanovic, Robert; Harvey, Patricia.; Patzer, Shari.; Fuchs, Roy L. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. Journal of agricultural and food chemistry. 1996, 44(1), p.365-371.
 - 6 Bertrand, J A.; Sudduth, T Q.; Condon, A.; Jenkins, T C.; Calhoun, M C. Nutrient content of whole cottonseed. Journal of Dairy Science. 2005, 88(4), p.1470-1477.
 - 7 Boevink, P.; Chu, P.W.G.; Keese, P. Sequence of subterranean clover stunt DNA: Affinities with the geminiviruses. Virology. 1995, (207), p.354-361.
 - 8 Botterman, Johan.; Gossele, Veronique.; Thoen, Chris.; Lauwereys, Mark. Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. Gene. 1991, (102), p.33-37.
 - 9 Broderick, Nichole A.; Raffa Kenneth F.; Handelsman, Jo. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. PNAS. 2006, 103(41), p.15196 -15199.
 - 10 Calhoun, Millard C.; Kuhlmann, S W.; Baldwin, B C. Cotton feed product composition and Gossypol availability and toxicity. National Cottonseed Products Association, Inc. Survey 1993-94. Proceedings of the 2nd National Alternative Feeds Symposium, 1995, p.125-145.
 - 11 Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H. M. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics. 1982, 1(6), p.561-573.
 - 12 Droge, W.; Broer, I.; Puhler, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene metabolize the herbicide *L*-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. Planta. 1992, 187, p.142-151.
 - 13 FAO/WHO Food Standards. Named vegetable oils. Codex Stan. 210, Codex Alimentarius, 2001, 15p.
 - 14 Fryxell, Paul A. A redefinition of the tribe *Gossypieae*. Bot.Gaz. 1968, 129(4), p.296-308.
 - 15 Fryxell, Paul A.; Craven, Lyn A.; Stewart, J. McD. A revision of *Gossypium* sect. *Grandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species. Systematic Botany. 1992, 17(1), p.91-114.
 - 16 Gunstone, Frank D.; Harwood, John L.; Padley, Fred B. "Cyclic acids". The Lipid Handbook. 2nd ed., Chapman & Hall, 1994, p.13-14.
 - 17 Höfte, Herman.; de Greve, Henri.; Seurinck, Jef.; Jansens, Stefan.; Mahillon, Jacques., Ampe, Christophe.; Vandekerckhove, Joel.; Vanderbruggen, Hilde.; Van Montagu, Marc.; Zabeau, Marc.; Vaeck, Mark. Structural and functional analysis of

- a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715. Eur. J. Biochem. 1986, 161, p.273-280.
- 18 ILSI.Crop composition database Search results, ver.3.0. ILSI Crop compositional database-search, 2007.
 - 19 Knowles, Barbara H.; Dow, Julian A.T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. BioEssays 1993, 15(7), p.469-476.
 - 20 Lundquist, Richard.; Current uses of traditional-products. Dairy nutrition consultant. 1995, p.656-665.
 - 21 Marshall, Jerry S.; Stubbs, John D.; Taylor, William C. Two genes encode highly similar chloroplastic NADP-malic enzymes in *Flaveria*. Plant Physiology.1996, 111, p.1251-1261.
 - 22 Michiels, Frank.; Morioka, Sinji.; Scheirlinck, Trees.; Komari, Toshihiko. Stamen-specific promoters from rice. WO92/13956. 1992-08-20.
 - 23 Munro, John .M. "Disease" Cotton. 2nd eds,Longman Scientific & Technical, 1987, p.210-230.
 - 24 Murray, Fiona.; Llewellyn, Danny.; McFadden, Helen.; Last David.; Dennis, Elizabeth S.; Peacock, W. James. Expression of the *talaromyces flavus* glucose oxidase gene in cotton and tobacco reduces fungal infection, but is also phytotoxic. Molecular Breeding. 1999, 5, p.219-232.
 - 25 National Cottonseed Products Association (NCPA) . Cottonseed and its Products. CSIP 10th Edition Digital ed., 1999.
 - 26 Nida, Debbie L.; Patzer, Shari.; Harvey, Patricia.; Stipanovic, Robert.; Randall, Wood.; Fuchs, Roy L. Glyphosate-tolerant cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. J. Agric. Food Chem. 1996, 44(7), p.1967-1974.
 - 27 Niles, G. A.; Feaster, C. V. "Breeding". *Cotton*. Agronomy No.24. Kohel, R. J.; Lewis C. F. eds. American Society of Agronomy, 1984, p.201-231.
 - 28 Odell, Joan T.; Nagy, Ferenc.; Chua, Nam-Hai. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature. 1985, 313(28), p.810-812.
 - 29 OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*):Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2004)16, 2004.
 - 30 OECD. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control protein. ENV/JM/MONO(2007)14, 2007.
 - 31 OECD. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33, 2008.
 - 32 Thompson, Charles J.; Movva, N. Rao.; Tizard, Richard.; Cramer, Reto.; Davies, Julian E.; Lauwereys, Marc.; Botterman, Johan. Characterization of the herbicide

- resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal . 1987, 6(9), p.2519-2523.
- 33 USCA. United states-Canadian tables of feed composition. 3rd revision. National academy press, 1982, 42p.
 - 34 Wendel, Jonathan F.; Cronn, Richard C. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. Advances in Agronomy. 2003, 78, p.139-186.
 - 35 Wehrmann, Axel.; Van Vliet, Adri.; Opsomer, Chris.; Botterman, Johan.; Schulz, Arno. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology. 1996, 14, p.1274-1278.
 - 36 唐澤豊. “飼料資源”. 動物の飼料. 文永堂出版, 2004, p.78.
 - 37 新谷勲. “食用植物油脂のけん化物”. 食品油脂の科学. 幸書房, 1989, p.31-32.
 - 38 田先威和夫. “飼料と配合・給与”. 新編 畜産大事典. 養賢堂, 1996, p.977.
 - 39 日本食品化学研究振興財団. 農薬等の基準値“グルホシネート”, <http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/search.html> (accessed 2009-11-19)
 - 40 原田重雄. “繊維料” 工芸作物学. 栗原浩編. 農文社, 1987, p.26-42.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 I.Criel, 2008 : Origin of vector pTDL008 and map of the parent vector (ベクター pTDL008 の起源及びその親となるベクターのマップ)
- 2 M.Lecleir, 2007 : Description of vector pTDL008 (ベクターpTDL008 の解説)
- 3 K.D.Pestel and K.Hendrickx, 2010: Cry1Ab protein description and characterization (Cry1Ab たん白質の説明及び特徴)
- 4 S.Moens, 2008 : Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (*Gossypium hirsutum* の組換え体 T304-40 系統に挿入された全 DNA 塩基配列及び組込み部位)
- 5 S.Moens and I.Criel, 2010 : Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (*Gossypium hirsutum* の組換え体 T304-40 系統の挿入部位の詳細な解析)
- 6 V.Habex and H.V.Hreck, 2010 : Confirmation of the absence / presence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (*Gossypium hirsutum* の組換え体 T304-40 においてベクター由来の配列が存在するかの確認)
- 7 S.Moens, 2009 : Determination of additional flanking sequences of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 and the corresponding pre-insertion locus (*Gossypium hirsutum* 組換え体 T304-40 系統の近傍配列の決定と挿入前遺伝子座との対応)
- 8 S.Moens, 2009 : Bioinformatics analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 (*Gossypium hirsutum* 組換え体 T304-40 系統のバイオインフォマティクス解析)
- 9 K.Mertens and S.Moens, 2010 : Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations, in different backgrounds

- and grown in different environments (異なる世代、異なる遺伝的背景、異なる環境で栽培した *Gossypium hirsutum* の組換え体 T304-40 系統の構造的安定性の解析)
- 10 S.Moens, 2010 : Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event T304-40 over different generations. (*Gossypium hirsutum* の組換え体 T304-40 系統の異なる世代における構造的安定性の解析)
 - 11 S.Moens, 2010 : Full expression analysis of the trait genes and newly created ORFs of cotton event T304-40 (T304-40 系統の形質遺伝子及び新しく作られた ORF における全発現分析)
 - 12 T.Currier and J.Massengill, 2009 : Protein expression analysis of cotton event T304-40, expressing Cry1Ab and Pat/*bar* proteins, USA, 2007 (Cry1Ab、Pat/*bar* たん白質を発現した T304-40 ワタにおけるたん白質の発現分析)
 - 13 A.Martone, 2010 : Analyses of raw agricultural commodity (fuzzy seed) of Cry1Ab cotton event T304-40 for PAT/*bar* and Cry1Ab and its non-transgenic counterpart for PAT/*bar* and Cry1Ab proteins. (Cry1Ab ワタ T304-40 と非組換え体の未加工農産物(有毛種子)の PAT/*bar* 及び Cry1Ab たん白質の分析)
 - 14 A.Martone, 2010 : Analyses of processed products from Cry1Ab cotton seed event T304-40 and its non-transgenic counterpart for PAT/*bar* and Cry1Ab proteins, 2008, USA (USA、2008 年における T304-40 系統の Cry1Ab 綿実と対照の非組換え体から得た加工農産物における PAT/*bar* 及び Cry1Ab たん白質の分析)
 - 15 A.Capt, 2009 : Cotton transformation event T304-40 : *In silico* analysis of additional putative Open Reading Frame (ORF) sequences for identifying potential homologies to known toxins and allergens (ワタ組換え体 T304-40 : 追加の推定オープンリーディングフレームにおける既知毒素たん白及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するための *In silico* 分析)
 - 16 A.Capt, 2009 : PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known toxins (PAT/*bar* たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
 - 17 A.Capt, 2009 : PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known allergens (PAT/*bar* たん白質におけるアミノ酸配列の既知アレルゲンとの相同性検索)
 - 18 A.Capt, 2009 : Cry1Ab protein amino acid sequence homology search with known toxins (Cry1Ab たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
 - 19 A.Capt, 2009 : Cry1Ab protein amino acid sequence homology search with known allergens (Cry1Ab たん白質におけるアミノ酸配列の既知アレルゲンとの相同性検索)
 - 20 A.Martone, 2008 : Structural and functional equivalence of Cry1Ab, Cry2Ae and PAT/*bar* proteins produced in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and *Escherichia coli* to Cry1Ab, Cry2Ae and PAT/*bar* in TwinLink™ cotton *Gossypium hirsutum*, USA, 2007 (*Bacillus thuringiensis* 及び *Escherichia coli* で作られた Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar* たん白質と、TwinLink™ ワタで作られた Cry1Ab, Cry2Ae, PAT/*bar* たん白質の構造的、機能的同等性)
 - 21 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/*bar* protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid (PAT/*bar* たん白質 人工胃液における消化性試験)
 - 22 J.B.Rasclé, 2009 : Cry1Ab protein *in vitro* digestibility study in human simulated

- gastric fluid (Cry1Ab たん白質 人工胃液における消化性試験)
- 23 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/ *bar* protein *in vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (PAT/*bar* たん白質 人工腸液における消化性試験)
- 24 D.Rouquie, 2007 : Cry1Ab protein *in vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid (Cry1Ab たん白質 人工腸液における消化性試験)
- 25 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/ *bar* protein heat stability study (PAT/*bar* たん白質 熱安定性試験)
- 26 D.Rouquie, 2007 : Cry1Ab protein: heat stability study (Cry1Ab たん白質 熱安定性試験)
- 27 K.Hendrickx, 2009 : Heat stability of the Cry1Ab and Cry2Ae protein bioassay data (Cry1Ab、Cry2Ae たん白質の熱安定性 バイオアッセイデータ)
- 28 R.Oberdorfer, 2010 : Nutritional impact assessment report for the insect-resistant cotton (transformation event T304-40) (害虫抵抗性ワタ (T304-40) における栄養影響評価)
- 29 V.Rattemeyer-Matschurat, 2009 : Analysis of substantial equivalence of transgenic and non-transgenic cotton (組換えワタと非組換えワタの統計学的相同性解析)
- 30 R.Oberdorfer, 2010 : General information for the nutritional impact assessment (GM ワタの栄養影響評価における一般情報)
- 31 A.Scott and M.Freyssinet, 2004 : Glufosinate-ammonium residues in/on commodities of Liberty herbicide-tolerant cotton (Liberty 耐性ワタ産物におけるグルホシネートアンモニウムの残留試験)
- 32 D.Paelinck, 2004 : dPCR (T304-40 の識別方法)
- 33 D.Schouppe, 2011 : Literature survey on enzymatic activity of Cry proteins (Cry たん白質の酵素活性に関する文献調査)