

# 「除草剤グリホサート耐性ワタ MON 88913 系統」に係る安全性確認

## I はじめに

除草剤グリホサート耐性ワタ MON 88913 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」(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 : 除草剤グリホサート耐性ワタ MON 88913 系統  
性質 : 除草剤グリホサート耐性  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : 米国モンサント社

除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 系統(以下「MON 88913 系統」という。)は、グリホサート(商品名:ラウンドアップ)存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する遺伝子(改変 *cp4 epsps* 遺伝子)を導入したものであり、グリホサ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。

MON88913 系統と既存のワタとの相違は、MON 88913 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を受けない点だけである。

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

宿主に用いた植物はワタで、Malvales 目 Malvaceae 科ワタ属(*Gossypium*)に属する(参考文献①)。

導入に用いた改変 *cp4 epsps* 遺伝子は土壌微生物である *Agrobacterium* sp. CP4 株から同定・単離され、植物での発現を高めるためとベクター構築のため、遺伝子に改変が加えられている。

#### 2 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

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、乳牛に与える飼料の原料として利用されており、配合される割合は農家間で異なるが、約一割から二割程度が配合されている(参考文献②)。

#### 3 飼料の構成成分等に関する事項

綿実の主要構成成分(乾物重%)は、たん白質 28.23%、総脂質 22.70%、ADF31.31%、NDF42.26%、灰分 4.33%、炭水化物 44.74%であり、綿実油かすの主要構成成分(乾物重%)は、たん白質 44.94%、総脂質 2.20%、ADF18.87%、NDF25.28%、灰分 7.39%、炭水化物 45.49%であった。

また、有害生理活性物質であるゴシポール含有量(乾物重%)は、綿実の総ゴシポール 0.81%、

綿実油かすの総ゴシポール 1.32%であった。

#### 4 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON88913 系統と既存のワタとの相違は、本組換えワタが CP4 EPSPS たん白質の発現によりグリホサートの影響を受けずに生育できる点のみである。この点を除くと MON88913 系統は既存ワタと同じであり、既存のワタと比較して①収穫時期(成熟程度)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も全く変わりはない。

以上 1.1～1.4 により、MON88913 系統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

MON 88913 系統はグリホサートの存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入され、グリホサートの影響を受けずに生育することができる。結果としてグリホサートをその栽培期間中に 1 回～数回散布するだけでほぼ完全に雑草を防除することができるようになるため、雑草の発生に応じたより効果的で省力的な除草が行えるようになる。

#### 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

ワタは Malvales 目 Malvaceae 科ワタ属(*Gossypium*)に属する(参考文献①)。なお、組換え母本品種には *Gossypium hirsutum* に属する商業栽培ワタ品種 Coker312 を用いた。

##### 2 遺伝的先祖に関する事項

ワタ属は 39 種から成るが、主に熱帯及び亜熱帯の比較的乾燥した地域を原産地とする(参考文献①)。このうち栽培種は、旧大陸の「栽培アジア綿」と総称される 2 倍体種(n=13)の *G. herbaceum* と *G. arboreum* 及び、新大陸の「陸地綿」と呼ばれる 4 倍体種(n=26)の *G. hirsutum* と *G. barbadense* である(参考文献③)。現在、「栽培アジア綿」は、インド、アフリカ及びアジアの限定された地域で栽培されているのみで、世界で生産されるワタの約 98%は 2 つの「陸地綿」で、その 90%は *G. hirsutum* 種となっている(参考文献④)。

##### 3 有害生理活性物質の生産に関する事項

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⑤)。

##### 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、それを食する家畜や他の生物に寄生また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

ワタにはウイルス病などの病害が発生する。これらの病原体の家畜に対する病原性は報告されていない。

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

ワタは種子により繁殖する。わが国においてワタが自生したという報告はない。

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。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。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

日本へのワタの伝播は古く、799年に三河国に漂着したインド人によって伝えられたことが記録に残っているが、このワタはすぐに消滅したと考えられている。その後、文録年間(1592～1595年)に再び九州に伝えられ、明治15～20年頃には関東以南を中心に10万ヘクタールで栽培されていたが、輸入ワタに圧迫された結果、現在では鑑賞用に極わずかに栽培されているにすぎない(参考文献③)。

9 飼料の安全な利用に関する事項

ワタは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

現在のワタは、栽培作物として適するように人為的に高度に改良された作物であり、人の助けなしに生存、繁殖することはできない。

11 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタ属と交雑可能な近縁植物は存在せず(参考文献⑥)、日本においては栽培されていないため、近縁種の有害生理活性物質の生産は問題にならない。

4 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

MON 88913系統の作出に用いたベクターは、*E. coli* プラスミド・ベクターpBR322に由来するプラスミド・ベクターPV-GHGT35である。

2 性質に関する事項

プラスミド・ベクターPV-GHGT35の全長は13,741bpである。プラスミド・ベクターPV-GHGT35に存在する全ての遺伝子は、その由来・機能が明らかになっており、既知の有害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・ベクターPV-GHGT35はスペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付

与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aad* 遺伝子を持つ。*aad* 遺伝子は T-DNA 領域外に存在しているため MON 88913 系統中に導入されなかった。

#### 4 伝達性に関する事項

プラスミド・ベクターPV-GHGT35 は、伝達性に関する DNA 配列を持たない。

#### 5 宿主依存性に関する事項

プラスミド・ベクターPV-GHGT35 は、自立増殖可能な宿主が *E. coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* といった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

発現ベクターの作成にあたっては、それぞれ異なるプロモーターによって発現が制御されている 2 つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを pBR322 由来のベクターへと連結し、PV-GHGT35 が作出された。

#### 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

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHGT35 の T-DNA 領域をワタ細胞の染色体上に導入した。

### 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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株より単離され、植物での発現を高めるためとベクター構築のため、N末端配列2番目のセリンがロイシンに改変されている。なお、*Agrobacterium* は、土壌中に存在する微生物の一つである。

##### (2) 安全性に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質は植物や微生物が有する芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つである。EPSPS たん白質の酵素機能は既知のものであり、これまでに家畜は植物や微生物から様々な EPSPS たん白質を摂取してきている。

#### 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

プラスミド・ベクターPV-GHGT35 に含まれる全ての遺伝子はその特性が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでいない。以下に各遺伝子発現カセットの構造について記載した。

#### 【改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット】

P-FMV/TSFI プロモーターは、シロイヌナズナ TSF1 プロモーターにゴマノハグサモザイクウイルス 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であり、目的遺伝子の生殖器官及び栄養器官での恒常的発現に関する。ターミネーターにはエンドウの

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域を用いた。

#### 【改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット】

P-35S/ACT8 プロモーターは、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であり、目的遺伝子の栄養器官での恒常的発現に関与する。ターミネーターにはエンドウの ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域を用いた。

#### 4 性質に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、グリホサート存在下でも酵素活性を示す EPSPS(5-エノールピルビンシキミ酸-3-リン酸合成酵素)たん白質を発現する。EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素の一つで、その基質はホスホエノールピルビン酸とシキミ酸-3-リン酸であり、その機能は既知のものである。

#### 5 純度に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株よりプラスミド・ベクターにクローニングした後、改変を加えたものであり、その塩基配列は明らかにされている。

#### 6 安定性に関する事項

各後代について、2つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、挿入遺伝子の安定性が確認された。また、ウェスタンブロット分析によっても供試した全ての世代において、CP4 EPSPS たん白質の分子量と一致するバンドが検出され、発現たん白質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、MON88913 系統の挿入遺伝子はワタゲノムの1箇所に1コピー存在することが示された。

#### 8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON 88913 系統における改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量の平均値は、幼葉、第4節まで成育した個体の成熟葉、約50%が開花した個体の成熟葉、さくを収穫した個体の成熟葉、根及び種子での CP4 EPSPS たん白質の発現量の平均はそれぞれ 970、1400、690、630、99 及び 340µg/gdwt であった。また、4箇所のほ場から採取した花粉における CP4 EPSPS たん白質の発現量の平均は 4.0µg/g fwt 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

MON 88913 系統の作出に用いたプラスミド・ベクターPV-GHGT35 にはプラスミド・ベクターの構築・選抜及び増殖に必要な選抜マーカー遺伝子としてスペクチノマイシン/ストレプトマイシン耐性を付与する *aad* 遺伝子を有しているが、*aad* 遺伝子はベクターの T-DNA 領域外にある。サザンブロット分析及び PCR 分析による導入遺伝子の解析において、MON 88913 系統中に *aad* 遺伝子は導入されていないことが確認された。

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  
MON88913 系統中には 2 つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含むプラスミド PV-GHGT35 の T-DNA 領域のみが1コピー含まれており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認された。このことから、MON88913 系統中には CP4 EPSPS たん白質を発現するオープンリーディングフレームのみが含まれており、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いと考えられた。

## 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

MON 88913 系統と既存のワタとの違いは、MON 88913 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を受けない点である。

### 2 遺伝子産物の毒性に関する事項

GenBank/EMBL 及び SwissProt からなる毒素データベース(TOXIN 5)中に「毒素」として登録されている既知毒素と改変 CP4 EPSPS たん白質との比較を行った。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質と既知毒素との間に相同性は認められなかった。

また、改変 CP4 EPSPS たん白質を用いてマウスの急性強制経口投与試験を行った結果、改変 CP4 EPSPS たん白質の最大投与量 572 mg/kg でもマウスに有害な影響は認められなかった(参考文献⑦)。

### 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

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、試験開始後 15 秒以内に検出限界以下に消失していた。

#### (2)人工腸液に対する感受性

改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性は、10 分後に大半が消失し、100 分後に検出限界以下に消失していた。

#### (3)加熱処理に対する感受性

約 100°C で 38 分間の加熱条件により改変 CP4 EPSPS たん白質の免疫反応性及び酵素活性が 99%以上失われることが ELISA 分析等により確認された。

### 4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

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-リン酸(S3P)に反応する。PEP と S3P 以外に EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P 類似体であるシキミ酸のみである。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であることから、シキミ酸が植物体内で EPSPS たん白質と反応することはないと考察された。

### 5 宿主との差異に関する事項

MON 88913 系統、MON88913(-)及び一般商業品種の綿実、綿実油及び綿実油かすを用い

て、アミノ酸組成、脂肪酸組成、シクロプロパノイド脂肪酸、繊維質、中性デタージェント繊維、ミネラル、主要構成成分、ビタミン E、ゴシポールの合わせて 53 項目について成分分析を行った。

分析の結果、MON 88913 系統と MON88913(-)あるいは既存のワタとの間に生物学的に意味のある差異は認められなかった。

#### 6 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国で行われた MON 88913 系統のほ場試験において、生存・増殖能力に関し非組換えワタと差異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

米国で行われた MON 88913 系統のほ場試験において、生存・増殖能力に関し非組換えワタと差異は認められなかったことから、制限要因についても同等であると考察された。

#### 8 不活化法に関する事項

物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の散布)など、ワタを枯死させる従来の方法によって MON 88913 系統は不活化される。

#### 9 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局(FDA)には、2004 年 5 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行い、2005 年 3 月に認可された。米国農務省(USDA)には、2004 年 3 月に無規制裁培(商業栽培)のための申請を行った。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)には、2004 年 11 月に食品・飼料としての安全性審査の申請を行った。

#### 10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON 88913 系統と既存のワタとの栽培方法の相違は、MON 88913 系統において生育期の雑草防除にグリホサートが使用できる点である。その他の点では同じである。

#### 11 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON 88913 系統の種子の製法及び管理方法については、既存のワタと同じである。

#### 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

- 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

### IV 審議結果

除草剤グリホサート耐性ワタ MON 88913 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

- ① Fryxell, P.A. 1979. The Natural History of the Cotton Tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae). Texas A&M University Press, College Station
- ② 家畜飼料新給与システム普及推進事業、社団法人畜産技術協会、1995.
- ③ 工芸作物学、栗原弘編、農文協、1981.
- ④ Lee, J.A. 1984. Cotton, Agronomy No. 24, p 25, Soil Science Society of America, Inc. (Kohel, R.J. and C.F. Lewis, eds.) Wisconsin. USA
- ⑤ Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological Effects and Metabolism of Gossypol. Residue Review 61:126-160.
- ⑥ 日本の野生植物 木本 II、佐竹義輔 編 平凡社
- ⑦ Harrison, L. *et al.* 1996. The expressed protein in glyphosate-tolerant soybean, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Agrobacterium* sp. strain CP4, is rapidly digested *in vitro* and is not toxic to acutely gavaged mice. *J. Nutr.* 126:728-740.