

# 組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ  
MON88701 系統

平成 26 年 6 月 24 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	3
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	3
	(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
10	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
15	(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	6
	(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	6
	(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
20	(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	7
	(1) 名称及び由来に関する事項	7
	(2) 性質に関する事項	7
25	(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	8
30	5 挿入遺伝子に関する事項	8

	(1) 供与体に関する事項.....	8
	(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.....	9
	(4) 性質に関する事項.....	9
35	(5) 純度に関する事項.....	1 2
	(6) コピー数に関する事項.....	1 2
	(7) 安定性に関する事項.....	1 2
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	1 2
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	1 3
40	(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 3
	6 組換え体に関する事項.....	1 3
	(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 3
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 3
45	(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 3
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	1 5
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	1 6
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	1 7
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	1 7
50	(8) 不活化法に関する事項.....	1 7
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	1 7
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	1 7
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 8
55	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 8
	IV 審議結果.....	1 8
	V 参考文献及び参考資料.....	1 8

## 「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 系統」に係る安全性確認

### I はじめに

60 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 系統（以下「MON88701  
ワタ」という。）について、平成 25 年 11 月 7 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。

65

### II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 系統  
性質 : 除草剤（ジカンバ及びグルホシネート）耐性  
申請者 : 日本モンサント株式会社  
開発者 : Monsanto Company

70

MON88701 ワタには、除草剤ジカンバに対する耐性を付与するために改変 *dmo* 遺  
伝子が、また、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与するために *bar* 遺伝子が導  
入されている。

改変 *dmo* 遺伝子の供与体は、グラム陰性細菌である *Stenotrophomonas maltophilia*  
DI-6 株である。改変 *dmo* 遺伝子によって産生されるジカンバモノオキシゲナーゼ（以  
下「改変 MON88701 DMO たん白質<sup>1)</sup>」という。）が、除草剤ジカンバを除草活性の  
ない化合物に変換することにより、植物に除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。

75

*bar* 遺伝子の供与体は、グラム陽性細菌である *Streptomyces hygrosopicus* である。  
*bar* 遺伝子によって産生される PAT たん白質が、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により、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性を付与す  
る。

80

MON88701ワタと既存の非組換え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。このため、  
MON88701ワタに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  
して安全上問題となる点は認められなかった。したがって、MON88701ワタ  
は、家畜等が飼料として摂取しても、当該家畜等の健康を損なうおそれはない  
と考えられた。

85

なお、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

90

MON88701 ワタの作出に用いた宿主は、アオイ科 (Malvaceae) ワタ属  
(*Gossypium*) に属する *Gossypium hirsutum* L. の従来品種 Coker130 である。

MON88701 ワタには、*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株に由来する改変

<sup>1)</sup> 改変 MON88701 DMO たん白質から形成される三量体を含む。

*dmo* 遺伝子及び *Streptomyces hygroscopicus* に由来する *bar* 遺伝子が導入されている。

- 95 改変 *dmo* 遺伝子は、改変 MON88701 DMO たん白質を発現することにより、MON88701 ワタに除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。  
*bar* 遺伝子は、PAT たん白質を発現することにより、MON88701 ワタに除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

100 (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、主に綿実油かすの形態で、乳牛、肉牛、豚用配合飼料の原料として用いられている (亀岡, 1998)。また綿実そのものも、乳牛用配合飼料の原料として用いられている (亀岡, 1998)。

105 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON88701 ワタ及び非組換えワタの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である (ILSI, 2012、参考資料 20)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

- 110 MON88701 ワタは、改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。この点を除けば、MON88701 ワタは非組換えワタと差異はなく、ア収穫時期 (成熟程度)、イ 家畜等の摂取 (可食) 部位、ウ 家畜等の摂取量、エ 調製及び加工方法についても非組換えワタと変わりはない。

- 115 以上 (1) ~ (4) により、MON88701 ワタの飼料としての安全性評価においては、既存の非組換え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

- 120 非組換えワタでは、除草剤ジカンバ及びグルホシネートの散布は播種前における雑草茎葉処理に限られていた。一方、MON88701 ワタは除草剤ジカンバ及びグルホシネートに対して耐性を持つことから、広葉雑草の抑制のため、発芽前から収穫 7 日前まで除草剤ジカンバを散布できるほか、広範囲にわたる雑草を抑制するため、発芽から開花初期にかけて除草剤グルホシネートを散布することができる。このように、
- 125 2 つの異なる作用機作を有する除草剤を使用することにより、効率よく雑草管理を行うことが可能である。

- 130 除草剤ジカンバは、人工オーキシンの除草剤で、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。  
除草剤グルホシネートは、広葉及びイネ科雑草を防除する非選択性除草剤である。  
除草剤ジカンバ及びグルホシネートは、オオホナガアオゲイトウ (*Amaranthus palmeri*)、ヒメムカシヨモギ (*Conyza canadensis*)、ブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*)、オオブタクサ (*Ambrosia trifida*) 及びヒユモドキ (*Amaranthus tuberculatus*) など除草剤グリホサート抵抗性雑草を含む多くの除草剤抵抗性雑草を防除できるとしている。

### 3 宿主に関する事項

#### 135 (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

宿主は、アオイ科 (*Malvaceae*) ワタ属 (*Gossypium*) に属する *Gossypium hirsutum* L.の従来商業品種 Coker130 である。

#### 140 (2) 遺伝的先祖に関する事項

ワタは熱帯及び亜熱帯において広く分布している約 50 種を有するワタ属に属している (Percival *et al.*, 1999、OECD, 2008)。ワタ属のうち栽培種は、アフリカ及び中東を起源とする 2 倍体の *G. arboretum* 及び *G. herbaceum*、アメリカ大陸を起源とする複 2 倍体の *G. barbadense* 及び *G. hirsutum* の 4 種に分けられる (Brubaker *et al.*, 1999)。このうち宿主である *G. hirsutum* が世界のワタ生産の 90%を占めている (OECD, 2008)。

宿主である *G. hirsutum* を含む複 2 倍体種は、100~200 万年前に別々のゲノムを持つ 2 倍体種の交配から生じたと考えられている (Wendel *et al.*, 2010)。最古の *G. hirsutum* の考古学的形跡は、紀元前 4,000~5,000 年ごろのもので、メキシコのテワカン溪谷で発掘されている (Wendel *et al.*, 2010)。

#### 150 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタは、有害生理活性物質であるゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸を含むことが知られている。

ゴシポールは、ワタにおいて綿実を含むあらゆる組織の分泌器官に存在するテルペノイドである (Abou-Donia, 1976、OGTR, 2008)。綿実におけるゴシポール及びテルペノイド類の含有量は種、品種、施肥及び環境により異なる (0.4 - 2.0 %) (OECD, 2008)。ゴシポールは単胃動物に対し、食欲減退、体重減少、呼吸困難等の症状を起こす (Berardi and Goldblatt, 1980)。また、ゴシポールは代謝経路におけるリジンの利用を妨げ、ミトコンドリアの正常機能に影響を与える (OECD, 2008)。そのため、全粒綿実、綿実油かす及びその他の副産物 (外皮及び綿繰りの副産物) は、主にゴシポールにある程度耐性のある反芻動物の飼料として用いられている。また、綿実油かすは少量であれば単胃動物の飼料として用いられている (OECD, 2009)。

ジヒドロステルクリン酸、マルバリン酸及びステルクリン酸を含むシクロプロペノイド脂肪酸は、綿実中の総脂肪酸の 0.5~1.0%を占める (OECD, 2008)。シクロプロペノイド脂肪酸は飽和脂肪酸の代謝を妨げること (Rolph *et al.*, 1990、Cao *et al.*, 1993)、また、鶏の卵黄の変色や孵化率の減少を引き起こすことが報告されている (Lordelo *et al.*, 2007、OECD, 2008、OECD, 2009)。

ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸は搾油工程により著しく量が減少する (Harris, 1981、NCPA, 1993)。

#### 170 (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。

- 175 (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 (Bell, 1999)、それらが家畜等に対して病原性を持つことは知られていない。
- 180 (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、栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い。
- 185 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項  
ワタは、種子繁殖する多年生のアオイ科作物で、草丈は 1.0~2.0 m に伸び、発育枝と結果枝を生ずる (OECD, 2008)。葉は主茎あるいは枝の軸にらせん状に交互につき、各結果枝は 6~8 個の花芽を付ける (OECD, 2008)。  
ワタは、基本的には自家受粉であるが、虫媒による他家受粉も可能であり、その受精率は 5~30% であると報告されている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから風により飛散する可能性は少ない (OECD, 2008)。開花は、植物の生育と並行して下位結果枝より始まり、生育期の大半で開花が見られる。なお、わが国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。
- 190 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項  
ワタは、飼料分野では主に綿実油かすの形態で広く用いられてきた。綿実油かすは、乳牛、肉牛、豚用配合飼料の原料として用いられている (亀岡, 1998)。また綿実そのものも、乳牛に給与されており、給与量としては 1 日 1 頭あたり 1~2 kg 程度である (亀岡, 1998)。
- 195 (9) 飼料の安全な利用に関する事項  
200 上記 (3) のとおり、ワタには、ゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸が含まれるが、主にゴシポールにある程度耐性のある反芻動物の飼料として安全に利用されている。
- 205 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項  
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。ワタの生存・増殖能力は、栽培地域の気候条件または生育期の気象条件に左右される。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 (Hughes and Henson, 1957)。また、ワタは、除草剤や耕起等の物理的方法により防除できる。
- 210 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項  
215 *G. hirsutum* 及び全ての近縁種はゴシポールを含んでいる (Scheffler and Romano, 2008)。なお、わが国において *G. hirsutum* の近縁種であるワタ属の自然分布は報告されていない。

#### 4 ベクターに関する事項

##### (1) 名称及び由来に関する事項

220 ベクターB は、MON88701 ワタの作出に用いられた導入プラスミド PV-GHHT6997 の中間プラスミドである。なお、ベクターB の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

##### (2) 性質に関する事項

225 ベクターB の塩基数は 9,277 bp である。また、ベクターB の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており（参考資料 1）、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

##### (3) 薬剤耐性に関する事項

230 ベクターB には、抗生物質スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子 (Fling *et al.*, 1985) と、抗生物質ネオマイシン及びカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子 (Beck *et al.*, 1982、Fraley *et al.*, 1983) が含まれている。両遺伝子は、*Escherichia coli* 及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 中での選択マーカーとして用いられている。なお、*nptII* 遺伝子はベクターB から導入用プラスミド PV-GHHT6997 に至る過程で除かれており、*aadA* 遺伝子は、導入用プラスミド PV-GHHT6997 に含まれているが、MON88701 ワタ中に導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている（参考資料 8）。

235

##### (4) 伝達性に関する事項

240 ベクターB 及びその構築に用いられた中間プラスミドには、プラスミドの伝達を可能とする配列は含まれていない。

##### (5) 宿主依存性に関する事項

245 ベクターB には、pBR322 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* (Sutcliffe, 1979) と、広宿主域プラスミド RK2 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *oriV* (Stalker *et al.*, 1981) が組み込まれているが、植物や家畜等では増殖することは出来ない。なお、導入遺伝子の解析の結果、MON88701 ワタには、これらの領域を含む導入用プラスミド PV-GHHT6997 の外側骨格領域は導入されていないことが確認されている（参考資料 8）。

##### (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

250 MON88701ワタの作出には、導入用プラスミドPV-GHHT6997を用いている。本導入用プラスミドは、中間プラスミドA~C及び遺伝子断片D~Fを用いて作出されており（参考資料3）、改変MON88701 DMOたん白質を発現する改変*dmo* 遺伝子発現カセット及びPATたん白質を発現する*bar* 遺伝子発現カセットからなるT-DNA領域を有している。

255

(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

導入用プラスミド PV-GHHT6997 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によりワタに導入している。

260

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

MON88701 ワタに導入された改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子は、*S. maltophilia* DI-6 株及び *S. hygroscopicus* に由来する。

265

なお、ジカンバを分解する土壤微生物は自然環境中に遍在しており、*S. maltophilia* DI-6 株以外の微生物種もジカンバを除草活性のない代謝産物へ変換できる酵素を有していることが知られている (Smith, 1973、Krueger *et al.*, 1991)。

270

② 安全性に関する事項

改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は、好気性の環境中に普遍的に存在するグラム陰性細菌であり、水辺や土壌、植物等から検出されているほか、飼料や畜産物からも検出されている (Swings *et al.*, 1983、Juhnke *et al.*, 1987、Lambert *et al.*, 1987、Juhnke and des Jardin, 1989、Berg *et al.*, 1996、Denton *et al.*, 1998、Berg *et al.*, 1999、Berg *et al.*, 2002、Nunes and de Melo, 2006、Echemendia, 2010)。消化管の常在細菌と同様、*S. maltophilia* は日和見感染菌である (Berg, 1996) が、健康なヒトや家畜等に対する病原性を示すことは稀である (Ryan *et al.*, 2009、Cunha, 2010)。

275

*bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* は、腐生性及び土壌伝播性の細菌である。ストレプトマイセス属 (*Streptomyces*) に属する細菌は環境中に広く存在しており、ヒトへの暴露も一般的であるが (Goodfellow and Williams, 1983)、既知のアレルギー性や毒性は知られていない (Kutzner, 1981、Kämpfer, 2006)。また、*S. hygroscopicus* は、植物、ヒト又はその他の動物に対する病原性を持たないと考えられている (Goodfellow and Williams, 1983、Locci, 1989)。

280

285

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

従来商業ワタ品種 Coker 130 の幼苗から胚軸を切除し、PV-GHHT6997 を含むアグロバクテリウムと共置培養することにより形質転換を行った。その後、カルス育成のため、胚軸部をカルベニシリン、セフトキシム及びグルホシネートを添加した組織培養培地に移し、カルベニシリン及びセフトキシムによって形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去し、グルホシネートによって形質転換体を選抜した。その後、選抜された細胞から植物体を再分化させ、得られた再分化個体 (R0) を自殖させることにより R1 世代を作出した。

290

295

R0 個体と R1 世代において、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を確認し、T-DNA 領域を有し、外側骨格領域を含まない個体を選抜した。

300 続いて、改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子をホモで有する R1 世代を自殖し、R2 世代を作成した。R2 世代において、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を確認し、PCR 分析及びサザンブロット分析を用いて、1 コピーの T-DNA をホモで有する個体を特定した。R2 世代から自殖を繰り返して得られた後代を対象にさらに導入遺伝子解析の結果及び形態特性についての評価を行い、最終的な商品化系統として MON88701 ワタを選抜した。

305 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

改変 *dmo* 遺伝子は、peanut chlorotic streak caulimovirus 由来の *PCISV* プロモーター (Maiti and Shepherd, 1998) によりその発現が制御されている。

310 *bar* 遺伝子は、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の *e35S* プロモーター (Odell *et al.*, 1985) によりその発現が制御されている。

② ターミネーターに関する事項

315 改変 *dmo* 遺伝子のターミネーターは、ピマワタ (*G. barbadense*) の初期繊維形成に関わる繊維たん白質をコードする *E6* 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり (John, 1996)、改変 *dmo* 遺伝子からの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

320 *bar* 遺伝子のターミネーターは、ノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) の *nos* 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり (Bevan *et al.*, 1983、Fraley *et al.*, 1983)、*bar* 遺伝子からの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

325 導入用プラスミド PV-GHHT6997 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

330 導入用プラスミド PV-GHHT6997 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。改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子の機能については詳細を表外に記載した。

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
改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA I)	
<i>PCISV</i> プロモーター	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) のプロモーターで、植物細胞内で転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
<i>TEV</i> リーダー配列	Tobacco etch virus (TEV) 由来の 5' 末端非翻訳領域 (Niepel

	and Gallie, 1999)であり、遺伝子発現の制御に関わる。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	シロイヌナズナの EPSPS の葉緑体輸送ペプチド ( <i>CTP2</i> ) をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列であり、たん白質を葉緑体へと輸送する (Klee <i>et al.</i> , 1987、Herrmann, 1995)。
改変 <i>dmo</i> 遺伝子	<i>S. maltophilia</i> DI-6 由来の DMO たん白質の植物体内での発現を最適化したコード配列で、ジカンバ耐性を付与する (Wang <i>et al.</i> , 1997、Herman <i>et al.</i> , 2005)。
<i>E6</i> ターミネーター	ピマワタの初期繊維形成に関わる繊維たん白質をコードする <i>E6</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり (John, 1996)、mRNA のポリアダデニル化を誘導する。
<i>bar</i> 遺伝子発現カセット	
<i>e35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S RNA 由来のプロモーターであり (Odell <i>et al.</i> , 1985)、2重エンハンサーを持つ (Kay <i>et al.</i> , 1987)。植物細胞で転写を誘導する。
<i>Hsp70</i> リーダー配列	ペチュニア ( <i>Petunia hybrid</i> ) 由来の <i>DnaK</i> 遺伝子の 5' 非翻訳領域であり、熱ショックたん白質 (HSP70) をコードする (Winter <i>et al.</i> , 1988、Rensing and Maier, 1994)。遺伝子発現の制御に関わる。
<i>bar</i> 遺伝子	<i>S. hygroscopicus</i> 由来の PAT たん白質をコードする配列であり、グルホシネート耐性を付与する (Thompson <i>et al.</i> , 1987)。
<i>nos</i> ターミネーター	ノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている <i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) pTi 由来の <i>nos</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり、ポリアダデニル化を誘導する (Bevan <i>et al.</i> , 1983、Fraley <i>et al.</i> , 1983)。

① 改変 *dmo* 遺伝子の機能

335

改変 *dmo* 遺伝子によって発現される改変 MON88701 DMO たん白質は、除草剤ジカンバから除草活性の無い 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA; 3,6-dichlorosalicylic acid) とホルムアルデヒドへの脱メチル反応を触媒する (Chakraborty *et al.*, 2005)。

340

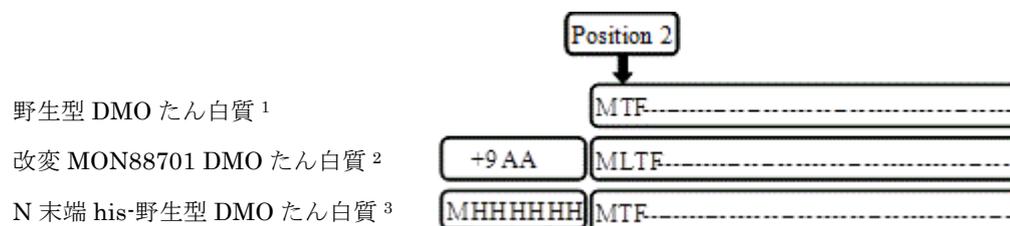
改変 MON88701 DMO たん白質は分子量 39.5 kDa の 349 個のアミノ酸からなる 1 本鎖ポリペプチドである。改変 MON88701 DMO たん白質のアミノ酸配列は *S. maltophilia* DI 6 株由来の野生型 DMO たん白質 (Herman *et al.*, 2005) と比較して、N 末端側に葉緑体輸送ペプチド (*CTP2*) 由来の 9 個のアミノ酸が付加されており、野生型 DMO たん白質の N 末端にあるメチオニンを 1 番目として 2 番目にロイシンが挿入されている (図 1、p11)。

345

DMO たん白質の結晶構造は、3 つの同一の DMO たん白質単量体からなる三量体であることが明らかとなっている (D'Ordine *et al.*, 2009、Dumitru *et al.*, 2009)。したがって、MON88701 ワタが除草剤ジカンバに対して耐性を持つためには、三量体の改変 MON88701 DMO たん白質が MON88701 ワタ中

350

で形成される必要がある。実際に MON88701 ワタが除草剤ジカンバに耐性を示し、MON88701 ワタから抽出された改変 MON88701 DMO たん白質にジカンバに対する脱メチル化酵素活性が確認されていることから（参考資料 4）、MON88701 ワタ内で発現される改変 MON88701 DMO たん白質は三量体を形成し、除草剤ジカンバの脱メチル反応を触媒していると考えられた。



355

図 1 DMO たん白質の形態

- 1 *S. maltophilia* から単離された野生型 DMO たん白質 (Herman *et al.*, 2005)。
- 2 MON88701 系統から抽出された改変 MON88701 DMO たん白質及び *E. coli* で産生された改変 MON88701 DMO たん白質は同じアミノ酸配列を有する。なお、MON88701 系統から抽出された改変 MON88701 DMO たん白質は、たん白質発現の世代間の安定性 (5 の (7)、p12)、たん白質の発現量 (5 の (8)、p12) を評価するために用いられた。*E. coli* で産生された改変 MON88701 DMO たん白質は、物理化学的処理に対する感受性 (6 の (3)、p13) 及び  $\sigma$  アニス酸との反応性 (6 の (4)、p15) を評価するために用いられた。
- 3 N 末端 his-野生型 DMO たん白質は、*E. coli* により産生された、N 末端側にヒスチジンタグが付加された DMO たん白質である。*in vitro* での基質特異性試験に用いられた (6 の (4)、p15)。

360

365

② *bar* 遺伝子の機能

*bar* 遺伝子は、PAT たん白質を発現することにより、植物体に除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

370

PAT たん白質は、これまでに 2 つの異なるストレプトマイセス属 (*S. hygroscopicus* (Thompson *et al.*, 1987) 及び *S. viridochromogenes* (Wohlleben *et al.*, 1988)) から単離されている。*S. hygroscopicus* から単離された PAT たん白質は、*bar* 遺伝子によりコードされており、*S. viridochromogenes* から単離された PAT たん白質は、*pat* 遺伝子によりコードされている。これらの PAT たん白質は 183 個のアミノ酸からなり、85% の相同性を有している。Wehrmann らによる *bar* 遺伝子及び *pat* 遺伝子由来の PAT たん白質の調査結果 (Wehrmann *et al.* 1996) から、OECD は両者の機能と安全性は同等であるとして (OECD, 1999)。

375

380

除草剤グルホシネートは、ホスフィノトリシンの D 体及び L 体のラセミ混合物である。グルホシネートの L-ホスフィノトリシンがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が不活性化され、植物体内でアンモニアが蓄積することにより、植物体は枯死する (Wild and Manderscheid, 1984, Manderscheid and Wild, 1986, OECD, 1999, OECD, 2002)。

385

PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの L-ホスフィノトリシンの遊離アミン基をアセチル化し、除草活性のない N-アセチルグルホシネートを産生する。N-アセチルグルホシネートは、グルタミン合成酵素を阻害しないため、

アンモニアが蓄積されず、植物体は除草剤グルホシネートに対する耐性を示す。

#### (5) 純度に関する事項

390 塩基配列解析により、T-DNA 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している (参考資料 2)。

#### (6) コピー数に関する事項

395 MON88701 ワタに導入された遺伝子のコピー数及び挿入箇所数を決定し、T-DNA 領域及び導入用プラスミド由来の外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、MON88701 ワタはゲノム中の 1 ヶ所に 1 コピーの T-DNA 領域を持ち、導入用プラスミドの外側骨格配列が存在しないことが確認された (参考資料 8)。

400 また、導入遺伝子の構成を確認し、導入遺伝子とその近傍配列の塩基配列を決定するため、塩基配列解析を行った。その結果、導入遺伝子と導入用プラスミド PV-GHHT6997 の T-DNA の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された (参考資料 8)。

405 さらに、MON88701 ワタの導入遺伝子の挿入部位の近傍配列を対照の非組み換えワタ中の塩基配列と比較した結果、MON88701 ワタの導入遺伝子の挿入部位において、ワタ内在性配列に 123 bp の欠損が認められた (参考資料 8)。しかし、近傍及び欠損配列の BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、導入遺伝子の挿入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた (参考資料 9)。

#### (7) 安定性に関する事項

410 MON88701 ワタ中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON88701 ワタから得られた DNA を用いて、サザンブロット分析を実施したところ、導入遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された (参考資料 10)。

415 また、改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質の発現の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON88701 ワタの葉組織サンプルを用いて改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質のウエスタンブロット分析を実施したところ、改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質が複数世代にわたり安定して発現していることが確認された (参考資料 10)。

#### (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

420 MON88701 ワタにおける改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA 法により測定した (参考資料 11)。試験には米国の 8 ヶ所のほ場から採取した MON88701 ワタの葉、根、花粉及び綿実を供試した。測定の結果、供試した全ての組織サンプルから改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質の発現が確認された。

425

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

430 導入用プラスミド PV-GHHT6997 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子 (Fling *et al.*, 1985) が T-DNA 領域の外側に存在しているが、MON88701 ワタ中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている (参考資料 8)。

(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

435 MON88701 ワタの導入遺伝子とその 5' 及び 3' 末端近傍配列の両境界領域におけるオープンリーディングフレーム (ORF) の形成の有無を調べるため、6 つの読み枠でストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンまでの連続する 8 アミノ酸以上の ORF 検索を行った結果、9 個の ORF が検出された (参考資料 12)、これら 9 個の ORF について、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

440 また、MON88701 ワタ中の導入遺伝子において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想定し、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性検索を行った (参考資料 13)。その結果、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性は確認されなかった。

445

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

450 MON88701 ワタに導入されているのは改変 *dmo* 遺伝子発現カセットと *bar* 遺伝子発現カセットのみである。MON88701 ワタは、改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質の発現により、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。この点を除けば、MON88701 ワタは非組換えワタとその形態及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

455 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

460 改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質が既知の毒素たん白質と相同性を有するか確認するため、「毒素」として登録されている既知のたん白質からなるデータベース中の相同性を示す配列の有無を検索した。その結果、改変 MON88701 DMO たん白質及び PAT たん白質は既知の毒素たん白質及びその他のヒトや家畜等に有害なたん白質との間に相同性は認められなかった (参考資料 5、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 改変 MON88701 DMO たん白質

465 改変 MON88701 DMO たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、*E. coli* で発現させた改変 MON88701 DMO たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*E. coli* で発現させた改変 MON88701 DMO たん白質と

470 MON88701 ワタ中で発現する改変 MON88701 DMO たん白質は同じアミノ酸配列を有し、分子量 (SDS-PAGE 分析)、免疫反応性 (ウエスタンブロット分析)、機能活性の解析 (ジカンバ代謝試験) 及びグリコシル化の有無により同等性が確認されている (参考資料 4)。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

475 改変 MON88701 DMO たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工胃液中で反応開始 30 秒後には改変 MON88701 DMO たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、改変 MON88701 DMO たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認された (参考資料 14)。

480 イ 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

改変 MON88701 DMO たん白質の人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工腸液中で反応開始 5 分後には改変 MON88701 DMO たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、改変 MON88701 DMO たん白質は人工腸液中で速やかに消化されることが確認された (参考資料 14)。

485

ウ 加熱処理

490 改変 MON88701 DMO たん白質の加熱処理に対する熱感受性を、ELISA 分析により評価した。その結果、改変 MON88701 DMO たん白質の免疫学的反応性は非加熱時と比べ、15 分加熱処理した場合、55°C で 36%、75°C で 11% まで減少し、95°C では定量限界 (0.313 ng/mL) 以下であった。また、30 分加熱処理した場合、55°C で 28%、75°C で 11% まで減少し、95°C では定量限界 (0.313 ng/mL) 以下であった。これらの結果から、改変 MON88701 DMO たん白質は、加熱処理に対して不安定であることが確認された (参考資料 15)。

495

① PAT たん白質

500 PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、*E. coli* で発現させた PAT たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*E. coli* で発現させた PAT たん白質と MON88701 ワタ中で発現する PAT たん白質は、分子量 (SDS-PAGE 分析)、免疫反応性 (ウエスタンブロット分析)、機能活性の解析 (グルホシネート代謝試験) 及びグリコシル化の有無により同等性が確認されている (参考資料 6)。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

505 PAT たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工胃液中で反応開始 30 秒後には PAT たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、PAT たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認された (参考資料 16)。

510 イ 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  
PAT たん白質の人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工腸液中で反応開始 5 分後には PAT たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、PAT たん白質は人工腸液中で速やかに消化されることが確認された（参考資料 16）。

515 ウ 加熱処理  
PAT たん白質の加熱処理に対する熱感受性を、ELISA 分析により評価した。その結果、PAT たん白質の免疫学的反応性は非加熱時と比べ、15 分加熱処理した場合、55℃で 59%まで減少し、75℃及び 95℃では定量限界（0.625 ng/mL）以下であった。また、30 分加熱処理した場合、55℃で 25%まで減少し、75℃及び 95℃では定量限界（0.625 ng/mL）以下であった。これらの結果から、PAT たん白質は、加熱処理に対して不安定であることが確認された（参考資料 17）。

#### 525 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

##### ① 改変 MON88701 DMO たん白質

530 改変 MON88701 DMO たん白質が内在性の植物基質を代謝する可能性を評価するため、N 末端側にヒスチジンタグが付加された *E. coli* 由来の DMO たん白質（図 1、p11）を用い、*in vitro* 試験を行った。ワタに存在し、構造的にジカンバに類似する化合物として特定された  $\sigma$  アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸及びシナピン酸を供試し、LC-UV 及び LC-MS 分析により、DMO たん白質を含む反応溶液中で供試した化合物の減少や、供試された化合物の酸化物の生成の有無を確認した。その結果、ジカンバのみ代謝され、他の化合物は DMO たん白質により代謝されなかった（参考資料 18）。

535 次に、実際に、改変 MON88701 DMO たん白質が *in vitro* 試験に用いられた DMO たん白質と同じ特異性を有するかどうかを確認するために、*E. coli* で発現させた改変 MON88701 DMO たん白質を、最もジカンバと構造的類似性を有する  $\sigma$  アニス酸と反応させたところ、 $\sigma$  アニス酸は代謝されなかった（参考資料 19）。なお、本試験に用いられた *E. coli* で発現させた改変 MON88701 DMO たん白質と MON88701 ワタ中で発現する改変 MON88701 DMO たん白質は同じアミノ酸配列を有し、分子量（SDS-PAGE 分析）、免疫反応性（ウエスタンブロット分析）、機能活性の解析（ジカンバ代謝試験）及びグリコシル化の有無により同等性が確認されている（参考資料 4）。

540 以上のことから、MON88701 ワタに導入された改変 *dmo* 遺伝子から発現される改変 MON88701 DMO たん白質は、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。

##### ② PAT たん白質

PAT たん白質は、アセチル-CoA の存在下において除草剤グルホシネートに高

550 い特異性を有することが知られている (Thompson *et al.*, 1987、Wehrmann *et al.*, 1996)。

555 グルホシネートの除草剤活性は L 体のホスフィノトリシンによるものであるが、その他の L 体のアミノ酸は PAT たん白質によりアセチル化されることはない。実際に、グルホシネート、高濃度のアミノ酸及び PAT たん白質を供試した競合アッセイでは、PAT たん白質によるグルホシネートのアセチル化の阻害は認められていない (Wehrmann *et al.*, 1996)。また、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸は競合アッセイにおいて、PAT たん白質によるグルホシネートのアセチル化を阻害しないことが示されている (Wehrmann *et al.*, 1996)。さらに、PAT たん白質は、植物体内の類似体と比較して、グルホシネートの L-ホスフィノトリシンに対し 30 倍以上と高い親和性を有している (Thompson *et al.*, 1987)。

560 以上のことから、PAT たん白質はグルホシネート対し高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。

#### 565 (5) 宿主との差異に関する事項

MON88701 ワタ及び対照の非組換えワタとの構成成分の同等性を評価するため、米国の 8 カ所のほ場において栽培した MON88701 ワタ及び対照の非組換えワタの綿実について、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ミネラル類、⑤ビタミン類及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 20)。また、各ほ場  
570 で 4 品種ずつ合計 9 種の非組換え自社商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。MON88701 ワタに関しては、3~4 葉期に最大散布薬量である 0.56 kg active ingredient/ha で除草剤グルホシネート処理を行い、6~10 葉期に最大散布薬量である 0.56 kg acid equivalent/ha で除草剤ジカンバ処理を行った。

#### 575 ① 主要構成成分

綿実中の水分、粗たん白質、粗脂肪、灰分、熱量、炭水化物、粗繊維、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について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えワタと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

580

#### ② 脂肪酸組成

綿実中の脂肪酸組成について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えワタと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

#### 585 ③ アミノ酸組成

綿実中のアミノ酸組成について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えワタと同等、自社商業品種から得られた分析値の範囲内又は文献に記載された分析値 (ILSI, 2011) の範囲内であった。

590

④ ミネラル類

綿実中のミネラル類について分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えダイズと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

595

⑤ ビタミン類

綿実中のビタミン E について分析した結果、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められたが、自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

600

⑥ 有害生理活性物質

有害生理活性物質として、シクロプロペノイド脂肪酸（ジヒドロステルクリン酸、マルバリン酸及びステルクリン酸）及びゴシポール（遊離ゴシポール及び総ゴシポール）について分析した結果、いずれの有害生理活性物質も対照の非組換えワタと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

605

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

2007 年~2012 年の間に、米国の延べ 434 ヶ所で行われたほ場試験において、MON88701 ワタの生存及び増殖能力は対照の非組換えワタと同等であることが確認されている。

610

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

MON88701 ワタの生存・増殖能力は非組換えワタと同等であり、生存・増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

615

(8) 不活化法に関する事項

MON88701 ワタは、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）など、ワタを枯死させる従来の方法で不活化される。

620

(9) 外国における認可等に関する事項

2012 年 6 月にカナダ保健省（Health Canada）において食品としての、また、カナダ食品検査庁（CFIA）において環境・飼料としての安全性審査の申請を行った。

2013 年 2 月に欧州食品安全局（EFSA）へ食品、飼料及び輸入のための安全性審査の申請を行った。

625

2013 年 4 月に米国食品医薬局（FDA）において食品・飼料としての安全性審査が終了した。

2014 年 1 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準局（FSANZ）において食品の輸入のための安全性審査が終了した。

630

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON88701 ワタの栽培方法は、生育期に雑草防除のために除草剤ジカンバ及び

グルホシネートを使用できることを除いて、非組換えワタと同様である。

635 MON88701 ワタへの使用が想定される除草剤ジカンバ、グルホシネート及びそれらの代謝物について MON88701 ワタへの残留及びそれらの摂取が家畜等の健康に及ぼす影響を検証した結果、安全上の問題は認められなかった(参考資料 21、22)。

#### (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

640 MON88701 ワタの種子の製法及び管理方法は非組換えワタと同様である。また、MON88701 ワタの各世代の種子は保管されている。

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。

645

#### IV 審議結果

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 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、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

650

#### V 参考文献及び参考資料

##### 参考文献

1. Abou-Donia, M.B. 1976. Physiological effects and metabolism of gossypol. Pages 126-160 in Residue Reviews: Residues of Pesticides and Other Contaminants in the Total Environment. Volume 61. F.A. Gunther and J.D. Gunther (eds.). Springer-Verlag, New York, New York.
2. Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.
3. Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327-336.
4. Bell, A.A. 1999. Diseases of cotton. Pages 553-593 in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
5. Berardi, L.C. and L.A. Goldblatt. 1980. Gossypol. Pages 184-237 in Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Second Edition. I.E. Liener (ed.). Academic Press, Inc., New York, New York.
6. Berg, G., P. Marten and G. Ballin. 1996. *Stenotrophomonas maltophilia* in the rhizosphere of oilseed rape - Occurrence, characterization and interaction with phytopathogenic fungi. Microbiological Research 151: 19-27.
7. Berg, G., N. Roskot and K. Smalla. 1999. Genotypic and phenotypic relationships between

- clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 3594-3600.
8. Berg, G., N. Roskot, A. Steidle, L. Eberl, A. Zock and K. Smalla. 2002. Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3328-3338.
  9. Berg, R.D. 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4: 430-435.
  10. Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
  11. Brubaker, C.L., F.M. Bourland and J.F. Wendel. 1999. The origin and domestication of cotton. Pages 3-31 in *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
  12. Cao, J., J.-P. Blond and J. Bézard. 1993. Inhibition of fatty acid  $\Delta^6$ - and  $\Delta^5$ -desaturation by cyclopropene fatty acids in rat liver microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1210: 27-34.
  13. Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
  14. Cunha, B.A. 2010. *Stenotrophomonas maltophilia*. WebMD, LLC, New York, New York. <http://www.emedicine.com/med/topic3457.htm> [Accessed January 2, 2010].
  15. D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
  16. Denton, M., N.J. Todd, K.G. Kerr, P.M. Hawkey and J.M. Littlewood. 1998. Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1953-1958.
  17. Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
  18. Echemendia, Y. 2010. Microorganism of the month: *Stenotrophomonas maltophilia*. Environmental Microbiology Laboratory, Inc., Cherry Hill, New Jersey. <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-07-2007.html> [Accessed August 10, 2010].
  19. Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn 7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
  20. Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 80: 4803-4807.

21. Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
22. Harris, W.D. 1981. Cottonseed. Pages 375-391 in *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. Volume 12. J.J. McKetta and W.A. Cunningham (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, New York.
23. Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.
24. Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
25. Hughes, H.D. and E.R. Henson. 1957. *Crop production, principles and practices*. The MacMillan Company, New York.
26. ILSI. 2011. *Crop Composition Database, Version 4.2*. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed July 16, 2012].
27. John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular Biology* 30: 297-306.
28. Juhnke, M.E. and E. des Jardin. 1989. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 747-750.
29. Juhnke, M.E., D.E. Mathre and D.C. Sands. 1987. Identification and characterization of rhizosphere-competent bacteria of wheat. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 2793-2799.
30. Kämpfer, P. 2006. The family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. Pages 538-604 in *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Archaea, Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. Volume 3. M.Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt (eds.). Springer+ Business Media, LLC., New York, New York.
31. Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV *35S* promoter
32. Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium* L. Pages 139-150 in *Plant Resources of South-East Asia No 17: Fibre Plants*. M. Brink and R.P. Escobin (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.
33. Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
34. Krueger, J.P., R.G. Butz and D.J. Cork. 1991. Aerobic and anaerobic soil metabolism of dicamba. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 995-999.
35. Kutzner, H.J. 1981. The family streptomycetaceae. Pages 2028-2090 in *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Volume 2. M.P. Starr, H.

- Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, and H.G. Schlegel (eds.). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
36. Lambert, B., F. Leyns, L. Van Rooyen, F. Gosselé, Y. Papon and J. Swings. 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 1866-1871.
  37. Locci, R. 1989. Streptomycetes and related genera. Pages 2451-2508 in *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 4. S.T. Williams and M.E. Sharpe (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland.
  38. Lordelo, M.M., M.C. Calhoun, N.M. Dale, M.K. Dowd and A.J. Davis. 2007. Relative toxicity of gossypol enantiomers in laying and broiler breeder hens. *Poultry Science* 86: 582-590.
  39. Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
  40. Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142.
  41. NCPA. 1993. Cottonseed oil. L.A. Jones and C.C. King (eds.). National Cottonseed Products Association, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, Tennessee.
  42. Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73: 9080-9088.
  43. Nunes, F.V. and I.S. de Melo. 2006. Isolation and characterization of endophytic bacteria of coffee plants and their potential in caffeine degradation. *Environmental Toxicology* 10: 293-297.
  44. Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
  45. OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
  46. OECD. 2002. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
  47. OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
  48. OECD. 2009. 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. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
49. OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia.
  50. Percival, A.E., J.F. Wendel and J.M. Stewart. 1999. Taxonomy and germplasm resources. Pages 33-63 in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
  51. Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.
  52. Rolph, C.E., R.S. Moreton and J.L. Harwood. 1990. Control of acyl lipid desaturation in the yeast *Rhodotorula gracilis* via the use of the cyclopropanoid fatty acid, sterculate. *Applied Microbiology and Biotechnology* 34: 91-96.
  53. Ryan, R.P., S. Monchy, M. Cardinale, S. Taghavi, L. Crossman, M.B. Avison, G. Berg, D. van der Lelie and J.M. Dow. 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology* 7: 514-525.
  54. Scheffler, J.A. and G.B. Romano. 2008. Modifying gossypol in cotton (*Gossypium hirsutum* L.): A cost effective method for small seed samples. *Journal of Cotton Science* 12: 202-209.
  55. Smith, A.E. 1973. Transformation of dicamba in Regina heavy clay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 21: 708-710.
  56. Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
  57. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.
  58. Swings, J., P. De Vos, M. Van den Mooter and J. De Ley. 1983. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 33: 409-413.
  59. Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6: 2519-2523.
  60. Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1623-1626.
  61. Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.
  62. Wendel, J.F., C.L. Brubaker and T. Seelanan. 2010. The origin and evolution of *Gossypium*. Pages 1-18 in Physiology of Cotton. J.M. Stewart, D.M. Oosterhuis, J.J. Heitholt, and J.R. Mauney (eds.). Springer Science+Business Media B.V., New York, New

York.

63. Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C* 39: 500-504.
64. Winter, J., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley and D. Shah. 1988. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl<sub>2</sub> stress. *Molecular and General Genetics* 211: 315-319.
65. Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
66. 亀岡暄一(編). 1998. 綿実 綿実粕. 新編 飼料 ハンドブック. 社団法人 日本科学飼料協会. 東京. pp.323-324.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Information on Vector B
2. Sequence of Genetic Elements in PV-GHHT6997
3. PV-GHHT6997 Plasmid Lineage
4. Characterization of Dicamba Mono-oxygenase (DMO) Protein Purified from the Cottonseed of MON 88701 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli*-Produced DMO Proteins. (MSL0023517)
5. Bioinformatics Evaluation of the DMO Protein in MON 88701 Utilizing the AD\_2011, TOX\_2011 and PRT\_2011 Databases (MSL0023516)
6. Characterization of Phosphinothricin *N*-Acetyltransferase (*bar*) Protein Purified from the Cottonseed of MON 88701 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli*-Produced PAT (*bar*) Proteins. (MSL0023428)
7. Bioinformatics Evaluation of the PAT (*bar*) Protein in MON 88701 Utilizing the AD\_2011, TOX\_2011 and PRT\_2011 Databases (MSL0023528)
8. Molecular Characterization of Dicamba Glufosinate-Tolerant Cotton MON 88701 (MSL0023280)
9. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 88701: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0024148)
10. Stability of the DNA Insert and Expression of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Proteins in MON 88701 (MSL0023322)
11. Amended Report for MSL0024006: Assessment of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Protein Levels in Tissues from Dicamba Glufosinate Tolerant Cotton (MON 88701) Produced in U.S. Field Trials during 2010 (MSL0024523)
12. Amended Report for MSL0023585: Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 88701: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0024371)
13. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 88701 Utilizing the

AD\_2011, TOX\_2011 and PRT\_2011 Databases (MSL0023565)

14. Assessment of the *in vitro* Digestibility of *Escherichia coli* (*E.coli*)-produced MON 88701 Dicamba Mono-oxygenase (DMO) Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0023579)
15. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced MON 88701 DMO Protein (MSL0023605)
16. Assessment of the *in vitro* Digestibility of Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*) Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0023567)
17. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli* (*E. coli*)-Produced Phosphinothricin N-acetyltransferase (*bar*) Protein (MSL0023583)
18. Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates (RPN-10-365)
19. Amended Report: Specificity of *E. coli*-produced MON 88701 Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme Using *o*-Anisic Acid as a Substrate (RPN-2011-0079)
20. Amended Report for MSL0024393: Compositional Analyses of Cottonseed Collected from MON 88701 treated with Dicamba and Glufosinate Grown in the United States during 2010 (MSL0024606)
21. Summary of the Magnitude of Residues of Dicamba in Undelinted Cotton Seed after Application to MON 88701 (MSL0024066)
22. Metabolism of Dicamba in Dicamba-Tolerant Cotton (MSL0021858)