

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤アリルオキシアルカノエート系及び
グルホシネート耐性ワタ 1910 系統**

**平成 27 年 8 月 31 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	4
	(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	4
	(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	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	5
	(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	6
	(1) 名称及び由来に関する事項	6
	(2) 性質に関する事項	6
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	6
	(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
30	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.....	7
	(3) 構造に関する事項.....	8
	(4) 性質に関する事項.....	8
35	(5) 純度に関する事項.....	1 0
	(6) コピー数に関する事項.....	1 0
	(7) 安定性に関する事項.....	1 1
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	1 1
	(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 1
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 1
	6 組換え体に関する事項.....	1 1
	(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 1
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 2
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 2
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	1 3
	(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 5
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	1 5
50	(8) 不活化法に関する事項.....	1 5
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	1 5
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	1 5
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 5
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 6
	IV 審議結果.....	1 6
	V 参考文献及び参考資料.....	1 6

「除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 系統」 に係る安全性確認

60

I はじめに

65 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 系統（以下「1910 ワタ」という。）について、平成 26 年 11 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 : 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 系統
性 質 : 除草剤（アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート）耐性
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社

70

1910ワタは、グラム陰性桿菌*Delftia acidovorans* MC1株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12遺伝子（以下「改変*aad-12*遺伝子」という。）及びグラム陽性放線菌*Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（以下「改変*pat*遺伝子」という。）が導入されたワタである。

75

1910ワタは、改変*aad-12*遺伝子から発現される改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12たん白質（以下「改変AAD-12たん白質」という。）がアリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換することにより、同除草剤の影響を受けずに生育できる。

80

また、改変*pat*遺伝子から発現されるホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼたん白質（以下「PATたん白質」という。）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、グルホシネートの影響を受けずに生育できる。

85

1910ワタと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の性質を除き、差異は認められなかった。このため、1910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、飼料として安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、1910ワタは、飼料として摂取する家畜等の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、ワタは主に綿実油かすの形態で主に乳牛用飼料の原料として使用されている。

III 審議内容

90

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

1910 ワタの宿主は、アオイ科（Malvaceae）ワタ属（*Gossypium*）アップラン

ドワタ (*G. hirsutum* L.) の非組換え商業品種 Coker310 である。

95 1910 ワタには *D. acidovorans* MC1 株に由来する改変 *aad-12* 遺伝子及び *S. viridochromogenes* に由来する改変 *pat* 遺伝子が導入されている。

改変 *aad-12* 遺伝子は、改変 AAD-12 たん白質を発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性を付与する。

100 改変 *pat* 遺伝子は、PAT たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。この性質は、1910 ワタ作出時の選抜マーカーとして利用されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

105 ワタは、一般的に繊維料作物として栽培され、綿糸が取り除かれた綿実から綿実油を抽出した綿実油かすの形態で、主に乳牛用飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2013)。また、綿実そのものが乳牛用飼料の原料として利用されることもある(OECD, 2004)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

110 1910 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り、比較が可能である (ILSI, 2010、参考資料 16)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

115 1910 ワタは、改変 AAD-12 たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤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、1910 ワタは非組換えワタと差異はなく、①収穫時期 (成熟程度)、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非組換えワタとの相違はない。

120 (1) ~ (4) により、1910 ワタの飼料としての安全性評価においては、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

125 1910 ワタは、アリルオキシアルカノエート系除草剤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。1910 ワタが非組換えワタと異なる点は、これらの除草剤に対する耐性を持つことのみであり、その飼料としての利用目的及び利用方法に関して非組換えワタとの差異はない。なお、栽培時に使用が想定されている除草剤はアリルオキシアルカノエート系除草剤の 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (以下「2,4-D」という。) であり、グルホシネートは作出の際に形質転換体を選抜するためのみに使用される。2,4-D は、オーキシン様作用を示し、植物ホルモンの作用をかく乱することにより広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こし、除草活性を示す。

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

135 1910 ワタの宿主は、アオイ科 (Malvaceae) ワタ属 (*Gossypium*) アップランドワタ (*G. hirsutum* L.) の非組換え商業品種 Coker310 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

140 ワタの栽培は、メソアメリカから始まり、メキシコのテワカン谷において、紀元前 3,500～2,300 年頃のワタの栽培化の形跡が確認されている。今日、栽培されているワタの起源は、グアテマラ国境付近のメキシコと考えられており、18 世紀に米国南東部に広まり、その後、世界の熱帯・亜熱帯の諸国に広がったとされている (OECD, 2008)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

145 ワタには、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が含まれている。

150 ゴシポールには遊離型と結合型があり、遊離型ゴシポールがより強い生理活性を有する。ゴシポールは、非反芻動物、鳥類等に対して毒性を示し、哺乳類に対して、食欲減退、体重減少等を引き起こすことが知られている。一方、反芻動物は、反芻胃中で遊離型を結合型に変換することができるため、ゴシポールの影響を受けにくい。また、綿実油かすの加工段階において、ほとんどのゴシポールはたん白質と結合するため、綿実油かすではゴシポールの毒性は低下する (OECD, 2008)。

155 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) は、飽和脂肪酸の代謝を阻害することが知られている (OECD, 2008)。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより、鶏卵の卵黄の脱色やふ化率低下を引き起こすため、綿実油かす及び綿実油の家きん飼料への使用が制限されている (OECD, 2004)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

160 ワタは種子植物であり、ワタが家畜等に寄生又は定着することはない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

165 ワタには、糸状菌による立枯病や半身萎ちょう病等の病害が発生するが、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない (OECD, 2008)。

(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、雑草化するとの報告はない (OGTR, 2008)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

170 ワタは、多年生植物で低木にもなるが、商業的には一年生植物として栽培される。ワタは、基本的には自殖性であるが、虫媒等で他家受粉が生じることが知られている (OECD, 2008)。ワタとの交雑が可能な近縁野生種は、我が国には自生し

ていない。

175

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

ワタは、一般的に繊維料作物として栽培され、綿糸が取り除かれた綿実から綿実油を抽出した綿実油かすの形態で、主に乳牛用飼料の原料として利用されてきた。我が国においても、主に乳牛用の配合飼料や混合飼料の原料として利用されている(農林水産省, 2013)。

180

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

ワタの種子には、有害生理活性物質として、ゴシポール等が含まれているが、主に、ゴシポールの影響を受けにくい反芻動物である乳牛用の飼料原料として利用されている。

185

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

ワタの種子は 2~3 か月の休眠性を持つが、栽培種においては、育種により休眠性が失われている、又は最小限に抑えられている。ワタの生存及び増殖能力は、温度、湿度、土壌等の各条件により制限される(OECD, 2008)。

190

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタの近縁種であるピマワタ(*G. barbadense*)は、ワタと同様にゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸を含むことが知られている。

195

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

1910 ワタの作出に用いられた導入用プラスミド pDAB4468 は、*Agrobacterium tumefaciens* 及び *Escherichia coli* に由来するプラスミド pDAB2407 等を基に作成されている。

200

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド pDAB4468 の塩基数は 12,145 bp である。また、導入用プラスミド pDAB4468 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 20)、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。

205

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pDAB4468 にはスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼを産生しスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が含まれており、導入用プラスミド pDAB4468 の作成時に各プラスミドの選択に用いられた。*specR* 遺伝子は導入用プラスミド pDAB4468 における T-DNA 領域の外側に位置するため、1910 ワタ中には含まれていない。

210

215 なお、1910 ワタ中に *specR* 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 1）。

（４）伝達性に関する事項

220 導入用プラスミド pDAB4468 は、プラスミドの伝達を可能とする配列を含まない。

（５）宿主依存性に関する事項

225 導入用プラスミド pDAB4468 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、植物や家畜等で増殖を可能とする配列は含まれていない。

（６）発現ベクターの作成方法に関する事項

230 改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子を、プラスミド pDAB2407 を基に構築した中間プラスミドに組み込み、導入用プラスミド pDAB4468 を作成している。

（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

235 導入用プラスミド pDAB4468 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。

５ 挿入遺伝子に関する事項

（１）供与体に関する事項

240 ① 名称、由来及び分類に関する事項

245 改変 *aad-12* 遺伝子は、土壌や淡水中等に存在するグラム陰性桿菌である *D. acidovorans* MC1 株に由来する (Müller *et al.*, 1999)。

250 また、改変 *pat* 遺伝子は、土壌中に存在するグラム陽性放線菌である *S. viridochromogenes* に由来する (OECD, 1999)。

255 ② 安全性に関する事項

260 改変 *aad-12* 遺伝子の供与体である *D. acidovorans* は、食品産業において、フェルラ酸を香料成分であるバニリンに変換する際に利用されている (Toms and Wood, 1970、Labuda *et al.*, 1994)。また、医療用の生体材料として応用可能であるポリヒドロキシアルカノエート（プラスチックの一種）を生成することが報告されている (Sudesh, 2004)。

265 なお、*D. acidovorans* による日和見感染や角膜感染についての報告がこれまでに数例あるが (Horowitz *et al.*, 1990、Brinser and Torczynski, 1977)、健康なヒトや家畜等に対して病原性を示すことは稀である。

270 また、改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* が、ヒトや家畜等に対して病原性を有するという報告はない (OECD, 1999)。

（２）遺伝子の挿入方法に関する事項

挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド pDAB4468 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主である Coker310 の種子を発芽させ、単離した胚軸に、導入用プラスミド pDAB4468 を有する *A. tumefaciens* LBA4404 株を感染させ、カルス形成を誘導した。培地に抗生物質（カルベニシリン）添加により、*A. tumefaciens* の除菌を行うとともに、グルホシネート添加により、形質転換個体の選抜を行った。

その後、選抜した個体を発根させ、植物体を鉢上げして馴化した。再分化後の植物体において、グルホシネート塗布及び導入遺伝子解析を行い、目的の遺伝子が導入されていることを確認した。さらに、一般的なワタの育成プロセスに従って、ワタ 1910 系統を育成した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

1910 ワタに導入された改変 *aad-12* 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のポリユビキチン 10 プロモーター (*AtUbi10*) により発現が制御されている。

改変 *pat* 遺伝子は、キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来の *CsVMV* プロモーター (*CsVMV*) 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

改変 *aad-12* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF23 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF23 3' UTR*) により転写が終結する。

改変 *pat* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF1 3' UTR*) により転写が終結する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

挿入 DNA 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

挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>RB7 MAR</i>	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来の核マトリックス結合領域 (Hall <i>et al.</i> , 1991)。改変 AAD-12 たん白質の発現を安定させる。
改変 <i>aad-12</i> 遺伝子発現カセット	
<i>AtUbi10</i> プロモーター	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来のポリユビキチン 10 (<i>UBQ10</i>) プロモーター。イントロン及び 5' 末端非翻訳領域を含む (Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>aad-12</i> 遺伝子	グラム陰性桿菌である <i>D. acidovorans</i> MC1 株由来の <i>aad-12</i> 遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変 AAD-12 たん白質を発現させる。クローニングサイト導入のため、アミノ酸配列の N-末端から 2 番目にアラニンが追加されている (参考資料 21、Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。
改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>CsVMV</i> プロモーター	キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>pat</i> 遺伝子	グラム陽性放線菌である <i>S. viridochromogenes</i> 由来の <i>pat</i> 遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT たん白質を発現させる。アミノ酸配列は改変されていない (参考資料 22)。
<i>AtuORF1</i> 3' UTR ターミネーター	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。

295

① 改変 *aad-12* 遺伝子の機能

改変 *aad-12* 遺伝子によって発現する改変 AAD-12 たん白質は、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である (参考資料 23、Wright *et al.*, 2007)。

300

ワタ 1910 系統は、改変 AAD-12 たん白質の作用により、光学異性体を持たないアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入することにより、除草活性のない化合物に変換し、除草剤耐性を示す。例えば、改変 AAD-12 たん白質は除草剤 2,4-D に酸素を導入し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノー

ルとグリオキシル酸に変換する。

305

なお、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、除草活性を持つ化合物は光学異性体のないもの及び光学異性体である R 体のみであり、光学異性体である S 体の化合物は除草活性を持たない。改変 AAD-12 たん白質は、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的であるため、ワタ 1910 系統が耐性を示すのは、光学異性体のないアリルオキシアルカノエート系除草剤である。

310

改変 AAD-12 たん白質が活性を示す除草剤のうち、現在、ワタへの除草剤登録がされているものはないが、米国における 1910 ワタへの除草剤 2,4-D の使用について、現在、登録申請中である。

315

② 改変 *pat* 遺伝子の機能

改変 *pat* 遺伝子によって発現する PAT たん白質は、グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない代謝物である *N*-アセチル-L-グルホシネート (2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコ-ブタン酸) に迅速に変換する。

320

グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量の毒性アンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、*N*-アセチル-L-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、PAT たん白質を発現する遺伝子組換え植物では植物毒素の生理学的影響を受けず、除草剤グルホシネートへの耐性を示す(OECD, 2002)。

325

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pDAB4468 に含まれる遺伝子は、その性質が明らかになっており、塩基配列解析により、挿入領域に目的以外の遺伝子は含まれていないことを確認している。

330

(6) コピー数に関する事項

1910 ワタに導入された遺伝子のコピー数を決定し、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、1910 ワタはゲノム中に 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 1)。

335

また、挿入 DNA の構成を確認し、挿入 DNA 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、導入遺伝子領域は完全な形でワタゲノム中に挿入されており、その近傍配列はワタゲノム由来であることが確認された。一方で、ワタゲノムから 159bp が欠失していることが明らかになった。(参考資料 2,3、参考資料 24)。しかし、挿入 DNA の両末端の近傍配列及び宿主であるワタのゲノムにおける挿入箇所の近傍配列について、GenBank non-redundant protein データベースを用いた BLASTx 及び BLASTp 解析の結果、挿入 DNA の

340

345 導入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないことが確認された（参考資料 4）。

（7）安定性に関する事項

1910 ワタに導入された改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 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 1910 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、改変 *aad-12* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子が
350 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 1）。

（8）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

1910 ワタにおける改変 AAD-12 たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA
355 分析により測定した。試験には米国の 6 か所のほ場から異なる生育時期に採取した 1910 ワタの葉、花、根、種子等を供試した。測定の結果、供試したすべての組織サンプルから改変 AAD-12 たん白質及び PAT たん白質の発現が確認された（参考資料 5）。

360 （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 pDAB4468 にはスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が T-DNA 領域の外側に含まれているが、1910 ワタ中に *specR* 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 1）。

365 （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

1910 ワタにおける挿入 DNA とその両末端の近傍配列について、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。30 アミノ酸以上からなる ORF の存在を、6
370 つの読み枠について、ストップコドンからストップコドンで検索した結果、41 個の ORF が検出された。このうち目的とする挿入遺伝子の配列からなる 2 個を除く 39 個の ORF について、既知の毒素たん白質等と相同性を有するか確認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん白質等を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて相同性検索を行った。その結果、既知の毒素たん白質等との相同性は確認されなかった（参考資料 4）。
375

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

1910 ワタは、改変 *aad-12* 遺伝子が導入されており、改変 AAD-12 たん白質が発現することによりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。また、改変 *pat* 遺伝子が導入されており、PAT たん白質が発現することにより除草剤グルホシネート耐性が付与されている。これらの点を除けば、
380 1910 ワタは非組換えワタとその形態及び生育特性において差異は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

1910 ワタで発現する改変 AAD-12 たん白質及び PAT たん白質が既知の毒素たん白質等と相同性を有するか確認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん白質等を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて相同性検索を行った。その結果、改変 AAD-12 たん白質及び PAT たん白質と既知の毒素たん白質等との間に相同性は認められなかった（参考資料 6、7、8、9）。

(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 AAD-12 たん白質

改変 AAD-12 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、*Pseudomonas fluorescens* で発現させた改変 AAD-12 たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*P. fluorescens* で発現させた改変 AAD-12 たん白質と 1910 ワタ中で発現する同たん白質は、SDS-PAGE 分析、ウエスタンブロット分析、グリコシル化の有無、MALDI-TOF MS 及び ESI-LC/MS によるアミノ酸配列解析、N-末端及び C-末端配列の解析により同等性が確認されている（参考資料 10）。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

改変 AAD-12 たん白質の人工胃液中での消化性を、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 AAD-12 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 AAD-12 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 11）。

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 AAD-12 たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、SDS-PAGE 分析では、反応開始 240 分後においても改変 AAD-12 たん白質の分子量（約 32kDa）とほぼ同じ位置にバンドの存在が認められた。一方、ウエスタンブロット分析においては、反応開始 5 分以降、改変 AAD-12 たん白質のバンドは検出されなかったため、SDS-PAGE 分析で検出されたバンドは改変 AAD-12 たん白質とほぼ同じ分子量の異なるたん白質であると考えられた。よって、改変 AAD-12 たん白質は、人工腸液中で速やかに消化されることが考えられた（参考資料 12）。

ウ 加熱処理

改変 AAD-12 たん白質の加熱処理に対する安定性を、SDS-PAGE 分析、ELISA 分析及び酵素活性測定により評価した。その結果、95℃、30 分の加熱に対しても分子量の変化は生じないものの、免疫反応性及び酵素活性は 50℃、

425 30 分の加熱により失われたことから、改変 AAD-12 たん白質は熱に不安定であると考えられた（参考資料 13）。

② PAT たん白質

430 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、以下のア～ウについて検討した結果が報告されている。なお、試験には 1910 ワタで産生される PAT たん白質と同一のアミノ酸配列である *E.coli* より産生した PAT たん白質が用いられている。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

435 PAT たん白質は人工胃液中で 30 秒以内に消化されることが SDS-PAGE 分析によって確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

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

440 PAT たん白質は人工腸液中で 30 秒以内に消化されることがウエスタンブロット分析によって確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

ウ 加熱処理

445 PAT たん白質を用いた加熱処理による変性試験において、SDS-PAGE 分析の結果、90℃、60 分の加熱処理でも分子量に変化がなかったことが報告されているが（Hérouet *et al.*, 2005）、50℃、10 分の加熱処理により酵素活性が失われることが確認されている（Wehrmann *et al.*, 1996）。

（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 改変 AAD-12 たん白質の代謝経路への影響

450 改変 AAD-12 たん白質は、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である（参考資料 14、Wright *et al.*, 2007）。植物の代謝経路においてアリルオキシアルカノエート基を持つ化合物の存在は知られていないが、植物体中に存在するアリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物と構造的、生理機能的に似通った化合物（インドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(エチレン前駆体)、桂皮酸、クマル酸及びシナピン酸）及び植物の代謝経路において重要な役割を果たしているアミノ酸について、改変 AAD-12 たん白質の作用の有無を確認した（参考資料 15）。その結果、高濃度の改変 AAD-12 たん白質を作用させた場合に、インドール-3-酢酸と桂皮酸から基質の酸化を示す酸化物が検出されたが、その反応速度は非常に遅いことが確認された。

455

460

 以上のことから、改変 AAD-12 たん白質が宿主の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。

465 ②PAT たん白質の代謝経路への影響

PAT たん白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他の L 型アミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない。また、PAT たん白質は L 型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、L-グルホシネートをアセチル化するそれ自身の活性に影響を受けることはない (OECD, 1999)。したがって、PAT たん白質が植物体の他の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

1910 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 10 か所のほ場において栽培した 1910 ワタ及び対照の非組換えワタの種子について、①主要構成成分、②脂肪酸、③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミン及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 16)。また、参考品種として、1910 ワタ及び対照の非組換えワタと成熟期が同程度である 6 種の非組換え商業品種を供試した。1910 ワタについては、除草剤無散布区及び除草剤(2,4-D 及びグルホシネート)散布区を設定した。1910 ワタへの除草剤散布については、3 節期及び 6 節期の 2 回、最大散布量の 2,4-D (1,120g ae/ha)及びグルホシネート(596g ai/ha)を散布した。

① 主要構成成分

種子中の水分、粗たん白質、粗脂肪、粗灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF)、粗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非組換え商業品種の分析値の範囲内であった。

② 脂肪酸

種子中の各脂肪酸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であった。

③ アミノ酸

種子中の各アミノ酸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又は非組換え商業品種の分析値の範囲内であった。

④ ミネラル

種子中の各ミネラル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ワタと同等又は非組換え商業品種の分析値の範囲内であった。

⑤ ビタミン

種子中の各ビタミンについて分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えワタと同等であった。

505

⑥ 有害生理活性物質

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（マルバリ
ン酸、ステルクリン酸、ジヒドロステルクリン酸）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非組換え商業品種の
分析値の範囲内であった。

510

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国及びカナダで行われたほ場試験の結果、1910 ワタの外界におけ
る生存及び増殖能力は、非組換えワタと相違ないことが確認されている。

515

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

これまでに米国及びカナダで行われたほ場試験の結果、1910 ワタの生存・増殖
能力は非組換えワタと相違ないことが確認されている。

520

(8) 不活化法に関する事項

1910 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散布）等
の非組換えワタを枯死させる従来の方法で不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

525

2014 年 10 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に
おいて食品としての安全性確認が終了した。

2014 年 11 月に米国食品医薬局（FDA）において食品及び飼料としての安全性確
認が終了した。

530

2015 年 3 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確認が終了した。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

535

1910 ワタの栽培方法は、生育期の雑草防除にアリルオキシアルカノエート系除
草剤を使用できることを除いて、非組換えワタと同様である。なお、1910 ワタに
は除草剤グルホシネート耐性の形質も付与されているが、その目的は形質転換体
選抜の際にマーカーとして利用することであり、栽培時に使用が想定されるのは
アリルオキシアルカノエート系除草剤の 2,4-D のみである。

そこで、2,4-D 及びその代謝物について、ワタ 1910 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 17、18、19、OECD, 2004、北海道農政部, 2009)。

540

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

1910 ワタの種子の製法及び管理方法については、非組換えワタとの相違はない。

545 7 2 から 6 までは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

550 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ 1910 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への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

555 参考文献

1. Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 2(6), p.335-350.
2. Brinser, J.H.; Torczynski, E. 1977. Unusual *Pseudomonas* corneal ulcers. *American Journal of Ophthalmology*. 84(4), p. 462-466.
3. Hall, G., Jr.; Allen, G. C.; Loer, D. S.; Thompson, W. F.; Spiker, S. 1991. Nuclear Scaffolds and Scaffold-Attachment Regions in Higher-Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(20), p. 9320-9324.
4. Hérouet, Corinne; Esdaile, David J.; Mallyon, Bryan A.; Debruyne, Eric; Schulz, Arno; Currier, Thomas; Hendrickx, Koen; Klis, Robert-Jan van der; Rouan, Dominique. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 41(2), p.134-149.
5. Horowitz, H.; Gilroy, S.; Feinstein, S.; Gilardi, G. 1990. Endocarditis Associated with *Comamonas acidovorans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(1), p. 143-145.
6. ILSI. 2010. ILSI Crop Composition Database. Version 4.2.
<https://www.cropcomposition.org/query/index.html>, (参照 2013-3-20).
7. Labuda, Ivica M.; Goers, Steven K.; Keon, Kathleen A. 1994. Bioconversion process for the production of vanillin. U.S. Patent 5, 279, 950. 1994-01-18.
8. Müller, Roland H; Jorks Siegfried; Kleinsteuber, Sabine; Babel, Wolfgang. 1999. *Comamonas acidovorans* strain MC1: a new isolate capable of degrading the chiral herbicides dichlorprop and mecoprop and the herbicides 2,4-D and MCPA. *Microbiological Research*. 154(3), p.241-246.
9. Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. 1993. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 21(5), p.895-906.
10. OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. 26p. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11).
<http://www.oecd.org/dataoecd/16/52/46815628.pdf>, (参照 2012-4-10).

11. OECD. 2002. Module II : Phosphinothricin. 22p. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25).
<http://www.oecd.org/dataoecd/17/39/46815748.pdf>, (参照 2012-4-10).
12. OECD. 2004. Consensus document on compositional considerations for new varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and Anti-nutrients. 32p. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.11).
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815236.pdf>, (参照 2013-7-29).
13. OECD. 2008. Consensus document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.). 64p. (Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45).
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815918.pdf>, (参照 2013-7-29).
14. OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). 87p.
15. Sudesh, K. 2004. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs) : An emerging biomaterial for tissue engineering and therapeutic applications. Med J Malaysia. 59(Suppl B), p.55-56.
16. Toms, Anne; Wood, J. M. 1970. The degradation of *trans*-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. Biochemistry. 9(2), p.337-343.
17. Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. Plant Molecular Biology. 31(6), p.1129-1139.
18. Wehrmann, Axel; Vliet, Adri Van; Opsomer, Chris; Botterman Johan, Schulz, Arno. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology. 14(10), p. 1274-1278.
19. Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Anthony; Merlo, Donald J.; Jayakumar, Pon, samuel; Lin, Gaofeng. 2007. Novel herbicide resistance genes. WO 2007/053482 A2. 2007-05-10.
20. 農林水産省. 2013. “流通飼料価格等実態調査＜速報版＞ 配合・混合飼料の原料・流通状況 2-(1)原料使用量” . 飼料月報 (概要)、平成 24 年度 4 月～3 月.
http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/cyosa/pdf/h24.pdf, (参照 2014-4-8).
21. 北海道農政部. 2009 “自然循環型酪農（放牧）取組指針”

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. Mo, J.; Ring, S; Cruse J.K. 2014. Molecular Characterization of DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 120456, 55p.
2. Mo, J.; Cruse J. 2013. Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 110752, 26p.
3. Gao, Z.; Ring, S.; Guttikonda, S.; Cruse J.K. 2013. Cloning and Analysis of the DNA Sequence from the DAS-81910-7 Cotton Insertion Site in Coker 310 Cotton. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 130924, 31p.
4. Richey, K.A. 2013. Bioinformatics Analysis of Insert and Its Flanking Border Sequences in DAS-81910-7 Cotton. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 131238, 27p.

5. Fast, B.J.; Hill, R.C. 2013. Protein Expression of a Transformed Cotton Line Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase (AAD-12) and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) – Event DAS-81910-7. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 120040.07, 149p.
6. Richey, K.A. 2013. Sequence Similarity Assessment of AAD-12 Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 131201, 14p.
7. Song, P. 2013. Sequence Similarity Assessment of AAD-12 Protein to Known Allergens by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 130068, 17p.
8. Richey, K.A. 2013. Similarity Assessment of PAT Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 130615, 14p.
9. Song, P. 2013. Sequence Similarity Assessment of the PAT Protein to Known Allergens by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 130069, 19p.
10. Clement, J.M.; Oman, T.J.; Juba, A.N.; Singletary, L. 2013. Characterization of the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) protein derived from transgenic cotton event DAS-81910-7. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 110819, 63p.
11. Embrey, S.K.; Schafer, B.W. 2008. *In vitro* Simulated Gastric Fluid Digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (abbreviation AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID: 080064, 21p.
12. Embrey, S.K.; Cruse, J.K.; Korjagin, V.A. 2008. *In vitro* Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID: 080065, 22p.
13. Schafer, B.W. 2012. Summary of the Effect of Heat Treatment on a Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 Protein. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 120595, 20p.
14. Cicchillo, R.M. 2011. Substrate Scope and Kinetic Analyses of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID: 110576, 20p.
15. Cicchillo, Robert M.; Godbey, Jeff; Wright, Terry. 2010. Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID: 101617, 26p.
16. Fast, B.J.; Johnson, T.Y. 2013. Nutrient Composition of a Cotton Cultivar Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT): Event DAS-81910-7. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 120040.01, 458p.
17. Vespestad, D. 2014. Magnitude of 2,4-D Residue in/on Transgenic Cotton Containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (*aad-12*) Gene - Residue and Decline Study. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 120430, 333p.
18. Rasoulpour, R.J. 2014. Comparative Toxicity Profile of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D) to 2,4-Dichlorophenol (2,4-DCP). Dow AgroSciences LLC, 8p.
19. Gesell, J.T.; Xespestad, D. Analytical Summary for the Magnitude of Residue of 2,4-D in/on Transgenic Cotton Containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (*aad-12*) Gene, Processing Study. Dow AgroSciences LLC, 2013, Study ID: 120431, 163p.
20. プラスミド pDAB4468 及び T-DNA 領域の塩基配列
21. 改変 *aad-12* と *aad-12* の塩基配列及びアミノ酸配列比較
22. 改変 *pat* と *pat* の塩基配列及びアミノ酸配列比較

23. 改変 AAD-12 たん白質が活性を示す除草剤
24. ワタ 1910 系統の挿入遺伝子配列及び隣接領域配列