

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目
害虫抵抗性ワタ MON88702 系統

平成30年9月18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	4
	(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	5
	(9) 飼料の安全な利用に関する事項	5
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	6
	(5) 宿主依存性に関する事項	6
	(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	7
	(4) 性質に関する事項	8
35	(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	11
	(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
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	11
	6 組換え体に関する事項	12
	(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	12
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	12
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	12
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	13
	(5) 宿主との差異に関する事項	13
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	13
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	13
50	(8) 不活化法に関する事項	13
	(9) 外国における認可等に関する事項	13
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	14
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	14
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	14
	IV 審議結果	14
	V 参考文献及び参考資料	14

「カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 系統」
に係る安全性確認

60

I はじめに

65 カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 系統（以下「88702 ワタ」という。）について、平成 30 年 3 月 9 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 : カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ
MON88702 系統
性質 : カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

70

88702ワタには、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与するため、グラム陰性桿菌*Bacillus thuringiensis* EG2934株に由来する改変 *cry51Aa2* 遺伝子が導入されている。

75

88702ワタにおいては、改変 *cry51Aa2* 遺伝子から発現する改変 Cry51Aa2 たん白質が88702ワタを摂取したカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に消化された後、活性をもつコアたん白質となって標的昆虫の中腸上皮細胞を破壊することで殺虫活性を示し、植物にカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫への抵抗性を付与する。

80

88702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、88702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、88702ワタは、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。

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。

85 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

88702 ワタを作出するのに用いた宿主は、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 DP393 である。

88702 ワタには *B. thuringiensis* EG2934 株に由来する改変 *cry51Aa2* 遺伝子が導入されている。改変 *cry51Aa2* 遺伝子は、改変 Cry51Aa2 たん白質をコ

ードする。

95 88702 ワタは、改変 Cry51Aa2 たん白質を発現することにより、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を持つ。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

100 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

105 88702 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, 2014、参考資料 14)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

110 88702 ワタは、改変 Cry51Aa2 たん白質を発現することにより、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に対する抵抗性を持つ。この点を除けば、88702 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。

115 (1)～(4)により、88702 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

120 88702 ワタは、導入された改変 *cry51Aa2* 遺伝子によって特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対する抵抗性を示す。これにより 88702 ワタは、害虫による被害が深刻な地域において、効果的な害虫防除方法を農家に提供することが期待される。

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

125 88702 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 DP393 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

130 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)。

135 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

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。

140 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)。

145 シクロプロペン脂肪酸（マルバリニン酸、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、鶏卵の卵白の変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)。

150

(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。

(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

155 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)。

160

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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。

165

(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)。

170

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

175 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。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

180 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)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

185 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。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

190 88702 ワタの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GHIR508523 は、
Agrobacterium rhizogenes に由来するプラスミド pRi 及び *Escherichia coli* に由
来するプラスミド pBR322 を基に作成されている。

(2) 性質に関する事項

195 導入用プラスミド PV-GHIR508523 の塩基数は 14,620bp である。また、導入用
プラスミド PV-GHIR508523 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

200 導入用プラスミド PV-GHIR508523 にはネオマイシン、カナマイシン耐性を付
与する *nptII* 遺伝子が含まれており、導入用プラスミド PV-GHIR508523 の作成
時に選択マーカーに用いられた。*nptII* 遺伝子(Fraley *et al.*, 1983)は導入用プラス
ミド PV-GHIR508523 における T-DNA 領域の外側に位置するため、88702 ワタ
中には含まれていない。

205 なお、88702 ワタ中に *nptII* 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。

(4) 伝達性に関する事項

210 導入用プラスミド PV-GHIR508523 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

 導入用プラスミド PV-GHIR508523 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。

215

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

プラスミドpBR322及びpRiを基に構築した導入用プラスミドPV-GHIR508523に、改変*cry51Aa2*遺伝子カセットを含むT-DNA I 領域及び*aadA*遺伝子カセットを含むT-DNA II 領域を組み込むことで、発現ベクターを作成している。

220

(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

88702 ワタは、改変 *cry51Aa2* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域及び *aadA* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域をアグロバクテリウム法により非組換えワタ品種 DB393 に導入することで作出された。挿入位置は導入用プラスミド PV-GHIR508523 の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域を含む右側境界配列から左側境界配列までである。なお T-DNA II 領域については形質転換体の選抜マーカーとしてのみ使用され、88702 ワタの作出過程において取り除かれる。

225

5 挿入遺伝子に関する事項

230

(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 *cry51Aa2* 遺伝子は、土壤中に存在するグラム陽性桿菌である *B. thuringiensis* EG2934 株に由来する (Baum *et al.*, 2012)。

235

② 安全性に関する事項

改変 *cry51Aa2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は、土壤中に一般的に存在するグラム陽性細菌であり、人や家畜等への病原性やアレルギー性は報告されていない。

240

(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 PV-GHIR508523 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主である非組換えワタ品種 DB393 の胚の茎頂組織を、導入用プラスミド PV-GHIR508523 を有するアグロバクテリウムと共置培養することで、形質転換を行なった後、抗生物質 (スペクチノマイシン、カルベニシリン及びセフトキシム) を添加した培地により、*A. tumefaciens* の除菌を行うとともに、形質転換体の選抜を行った。

245

その後、選抜した個体を再分化、発根させ、再分化個体 (R0) を得た。この R0 を自殖させ R1 世代を作出し、このうち T-DNA II 領域を持たず、T-DNA I 領域をホモで有する個体を、定量 PCR 分析を用いて選抜した。このように選抜された個体から、最終的に 88702 ワタを育成した。

250

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

255

改変 *cry51Aa2* 遺伝子発現カセットは、*Hsp81-2* プロモーターによりその発現が制御されている。*Hsp81-2* プロモーターはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の熱ショックたん白質 (HSP81-2 たん白質) のプロモーター配列及び 5'末端非翻訳リーダー配列で (Yabe *et al.*, 1994)、植物細胞内で転写を誘導する。

260

aadA 遺伝子発現カセットは、*EF-1a* プロモーターによりその発現を制御されている。*EF-1a* プロモーターはシロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の伸長因子 *EF-1 alpha* 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで (Axelos *et al.*, 1989)、植物細胞内で、転写を誘導する。

② ターミネーターに関する事項

265

改変 *cry51Aa2* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35SRNA の 3'末端非翻訳領域 (Mogen *et al.*, 1990) で、転写を終結させポリアダニル化を誘導する。

270

aadA 遺伝子発現カセットのターミネーターは、エンドウ (*Pisum sativum*) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする *rbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi *et al.*, 1984) で、転写を終結させポリアダニル化を誘導する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

275

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

280

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 *cry51Aa2* 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
改変 <i>cry51Aa2</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA I 領域)	
B-Right Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
E-FMVエンハンサー	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35SRNA 由来のエンハンサー (Richins <i>et al.</i> , 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers,

	2000)。
P- <i>Hsp81-2</i> プロモーター	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来の熱ショックたん白質(HSP81-2たん白質)のプロモーター及び5'末端非翻訳リーダー配列(Yabe <i>et al.</i> , 1994)。目的遺伝子を恒常的に発現させる。
改変 <i>cry51Aa2</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> 株由来の改変 <i>cry51Aa2</i> 遺伝子で、改変 <i>Cry51Aa2</i> たん白質を発現させる (Anderson <i>et al.</i> , 2015; Baum <i>et al.</i> , 2012)。殺虫活性を高めるため、アミノ酸配列に9カ所の改変が加えられている(Gowda <i>et al.</i> , 2016)。
35Sターミネーター	カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35S RNA由来の3'末端非翻訳領域(Mogen <i>et al.</i> , 1990)。ポリアデニル化によりmRNAの転写を終結させる。
Left Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外骨格領域	
<i>nptII</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンホストトランスフェラーゼ II(NPTII)をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列(Beck <i>et al.</i> , 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する(Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
<i>rrn</i> プロモーター	<i>A. tumefaciens</i> のリボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta <i>et al.</i> , 2002)。細菌細胞内での転写を誘導する。
<i>ori-pBR322</i>	pBR322由来の複製開始領域(Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
<i>rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマーたん白質のリプレッサーのコード配列で、 <i>E. coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する(Giza and Huang, 1989)。
<i>ori-pRi</i>	プラスミド pRi に由来する複製開始領域(Ye <i>et al.</i> , 2011)。アグロバクテリウム中においてベクターに自律増殖能を付与する。
<i>aadA</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA II 領域)	
Left Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
<i>E9</i> ターミネーター	エンドウ(<i>P. sativum</i>)のリブロー-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>rbcS2</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域(Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)由来のターミネーター。ポリアデニル化によりmRNAの転写を終結させる。
<i>aadA</i> 遺伝子	トランスポゾン Tn7 由来の3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター、コード配列及び3'末端非翻訳領域(Fling <i>et al.</i> , 1985)。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。

<i>CTP2</i>	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)の葉緑体輸送ペプチド領域をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列(Herrmann, 1995; Klee <i>et al.</i> , 1987)。目的たん白質を葉緑体へ輸送する。
<i>EF-la</i> プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-lalpha</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン(Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子を恒常的に発現させる。
<i>FMV</i> エンハンサー	Figwort Mosaic Virus(FMV) 35SRNA 由来のエンハンサー (Richins <i>et al.</i> , 1987)。植物細胞内での転写活性を高める (Rogers, 2000)。
Right Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む(Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。

285

○ 改変 *cry51Aa2* 遺伝子の機能

88702 ワタに導入された改変 *cry51Aa2* 遺伝子から発現される改変 *Cry51Aa2* たん白質は、植物に特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を付与する。改変 *Cry51Aa2* たん白質は、*B. thuringiensis* 由来の野生型 *Cry51Aa2* たん白質のアミノ酸配列に、殺虫活性を増強する目的で 9 ヲ所の改変が加えられたもの(Gowda *et al.*, 2016)。*Cry* たん白質は、標的昆虫が摂取して消化すると、活性を持つコアたん白質となって標的昆虫の中腸上皮細胞の受容体に結合し、小孔を形成して細胞を破壊することで殺虫活性を示す (OECD, 2007)。

290

295

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド PV-GHIR508523 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 (参考資料 1)。

300

(6) コピー数に関する事項

88702 ワタに導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数及び外側骨格配列の有無を確認するため、次世代シーケンサー及び PCR 解析を行った結果、88702 ワタ中の導入用プラスミド PV-GHIR508523 の T-DNA I 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されていること、また導入用プラスミド PV-GHIR508523 の T-DNA II 領域及び外側骨格配列が存在しないことが確認された(参考資料 3)。

305

また、挿入 DNA とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、挿入 DNA 及び近傍領域の塩基配列解析を行った。合わせて導入遺伝子の塩基配列が導入用プラスミド PV-GHIR508523 中の対応する塩基配列と同一であるか確認した。その結果、88702 ワタ中の挿入塩基配列は、T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列と同一

310

であることが確認された(参考資料 2)。

315 さらに、88702 ワタにおいて、挿入 DNA が既知内在性の遺伝子を破壊していかについて確認するため、DNA の挿入部位を対照の非組換えワタ中の塩基配列と比較した結果、88702 ワタの導入遺伝子の挿入部位においてワタゲノム内在性配列に 244bp の欠損及び 4bp の付加が認められた(参考資料 3)。しかし、近傍配列の BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、挿入 DNA の導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 4)。

320 (7) 安定性に関する事項

88702 ワタに導入された改変 *cry51Aa2* 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 88702 ワタから得られた DNA を用いた次世代シーケンサーによる解析及び葉を用いた改変 *Cry51Aa2* たん白質についてのウエスタンブロット分析を実施したところ、改変 *cry51Aa2* 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 5)。

325 また、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の 88702 ワタを用いて PCR 分析により T-DNA I 領域の有無を確認した結果、3 世代における 88702 ワタにおける分離比の観測値と期待値との間に、統計学的な有意差は認められなかったことから、88702 ワタ中の T-DNA I 領域はメンデルの法則に従って後代に遺伝していると考えられた(参考資料 6)。

330 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

88702 ワタにおける改変 *Cry51Aa2* たん白質の発現量を ELISA 分析により測定した。試験には米国の 5 か所のほ場から異なる生育時期に採取した 88702 ワタの葉、根、花粉、種子を供試した。測定の結果、供試したすべての組織サンプルから改変 *Cry51Aa2* たん白質の発現が確認された(参考資料 7)。

340 (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 PV-GHIR508523 には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* 遺伝子が T-DNA 領域の外側に含まれているが、88702 ワタ中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、次世代シーケンサーによる解析によって確認されている。

345 (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

88702 ワタの導入遺伝子とその両末端近傍配列の境界領域について、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。8 アミノ酸以上からなる ORF の存在を、6 つの読み枠についてストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンで検索した結果、10 個の ORF が確認された。それらについて、既知の毒性たん白質等との相同性の有無を確認するために、FASTA 検索アルゴリズムを利用して

350

TOX_2017、PRT_2017 及び AD_2017 データベースとの相同性検索を行った結果、有意な相同性は認められなかった(参考資料 8)。

6 組換え体に関する事項

355 (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

88702 ワタは、改変 *cry51Aa2* 遺伝子が導入されており、改変 Cry51Aa2 たん白質が発現することによりカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に対する抵抗性を持つ。これらの点を除けば、88702 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。

360

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

88702 ワタで発現する改変 Cry51Aa2 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、TOX_2017 データベースに登録されているたん白質のアミノ酸配列を対象に、FASTA 検索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 Cry51Aa2 たん白質と、毒素たん白質に類似したたん白質 1 個との間に相同性が認められたものの、毒性を示すにあたって重要となるアミノ酸配列に関しては相同性が低く、改変 Cry51Aa2 たん白質が毒性を示す可能性はないと考えられた(参考資料 2)。

365

370 (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

88702 ワタで発現している改変 Cry51Aa2 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～ウについて検討を行なった。なお、実際の処理は *B. thuringiensis* で発現させた改変 Cry51Aa2 たん白質を供試しており、これら *B. thuringiensis* 由来のたん白質と 88702 ワタ中で発現するたん白質は、SDS-PAGE 分析、ウエスタンブロット分析、グリコシル化の有無及び機能活性により同等性が確認されている(参考資料 11)。

375

ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

改変 Cry51Aa2 たん白質の人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により検討した結果、人工胃液中での試験開始 0.5 分後には消化されることが確認された(参考資料 12)。

380

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 Cry51Aa2 たん白質の人工腸液中での消化性について、ウエスタンブロット分析により検討した結果、処理時間の経過とともにバンド濃度が減少したものの、24 時間処理後も完全長の改変 Cry51Aa2 たん白質のバンドの残存が確認された(参考資料 12)。一部の Cry たん白質は、パンクレアチン等の酵素では完全に消化されないことが知られている(Barlow *et al.*, 2013; Bonner *et al.*, 2003; Goertz *et al.*, 2008)。

385

390

ウ 加熱処理

改変 Cry51Aa2 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討した結果、55℃以上の条件下では 15 分以上の加熱処理により免疫応答性を失うことが確認された（参考資料 13）。

395

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry51Aa2 たん白質は、特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示す Cry たん白質の一種であるが、Cry たん白質が酵素活性を持つとは考えられていない。したがって、88702 ワタにおける改変 Cry51Aa2 たん白質の発現が宿主の代謝経路へ影響を及ぼすことはないと考えられる。

400

(5) 宿主との差異に関する事項

88702 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 5 か所のほ場において栽培した 88702 ワタ及び対照の非組換えワタのリンターを除いた種子について、①粗たん白質及びアミノ酸、②粗脂肪及び脂肪酸、③炭水化物及び繊維質、④灰分及び無機質、⑤ビタミン、⑥有害生理活性物質の分析を行った（参考資料 14）。また参考として ILSI 及び Codex よって報告されているワタあるいは綿実油の各種構成成分との比較も行なった。

405

410

その結果、88702 ワタの各種構成成分は、対照の非組換えワタあるいは従来ワタと同程度であることが確認された。また、ワタに含まれる有害生理活性物質であるゴシポール（総ゴシポール及び遊離型ゴシポール）及びシクロプロペン脂肪酸（マルバリニン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）についても、対照の非組換えワタあるいは従来ワタと同等であることが確認された。

415

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国を中心として行われたほ場試験の結果、88702 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。

420

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

これまでに米国を中心として行われたほ場試験の結果、88702 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。

425

(8) 不活化法に関する事項

88702 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。

430

(9) 外国における認可等に関する事項

2017 年 3 月に米国食品医薬局（FDA）に対して食品及び飼料としての安全性確認を申請している。

また 2017 年 7 月にカナダ保健省 (Health Canada) に対して食品としての、カナダ食品検査庁 (CFIA) に対して環境・飼料としての安全性確認を申請している。

435 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

88702 ワタの栽培方法は、特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫に抵抗性を付与されており、これらの害虫への防除方法を除いて、非組換えワタと同様である。

440 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

88702 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。

445 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

450 カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタ MON88702 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

参考文献

1. Anderson, H.M., D.J. Bowen, C.A. Chay, S. Flasiniski, U.R. Kesanapalli, J.S. Milligan, R.N. Slightom and Y. Yin. 2015. Pesticidal toxin active against Coleopteran and/or Hemipteran insects. Patent 20150047076, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
2. Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the Arabidopsis thaliana translation elongation factor EF-1 α : Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219:106-112.
3. 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.
4. Barlow, R., R. Wang and R. Hernan. 2013. Assessment of the in vitro Digestibility of Cry1A.105 Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids. Monsanto Technical Report MSL0024977. St. Louis, Missouri. (社外秘)
5. Baum, J.A., U.R. Sukuru, S.R. Penn, S.E. Meyer, S. Subbarao, X. Shi, S. Flasiniski, G.R.Heck, R.S. Brown and T.L. Clark. 2012. Cotton plants expressing a hemipteran-active *Bacillus thuringiensis* crystal protein impact the development and survival of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphs. *Journal of Economic Entomology* 105:616-624.
6. Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotidesequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5.

- Gene 19:327-336.
7. Bonner, H.K.S., A.P. Vaughn and R.E. Hileman. 2003. Assessment of the in vitro Digestibility in Simulated Gastric and Intestinal Fluids of the Cry3Bb1.pvzmir39 Protein. Monsanto Technical Report MSL-18662. St. Louis, Missouri. (社外秘)
 8. Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3:1671-1679.
 9. Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1:561-573.
 10. Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13:7095-7106.
 11. 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.
 12. Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78:73-84.
 13. Goertz, B.E., E. Bell and E.A. Rice. 2008. Assessment of the In Vitro Digestibility of the Cry1Ac Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids. Monsanto Technical Report MSL0021376. St. Louis, Missouri.
 14. Gowda, A., T.J. Rydel, A.M. Wollacott, R.S. Brown, W. Akbar, T.L. Clark, S. Flasiniski, J.R. Nageotte, A.C. Read, X. Shi, B.J. Werner, M.J. Pleau and J.A. Baum. 2016. A transgenic approach for controlling Lygus in cotton. *Nat Commun* 7:12213. (社外秘)
 15. Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7:907-919.
 16. ILSI. 2014. Crop Composition Database, Version 5.0. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed July 27, 2016].
 17. 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.
 18. Mogen, B.D., M.H. MacDonald, R. Graybosch and A.G. Hunt. 1990. Upstream sequences other than AAUAAA are required for efficient messenger RNA 3'-end formation in plants. *The Plant Cell* 2:1261-1272.
 19. 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).
 20. OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing Bacillus thuringiensis-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. (Series on

Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42).

21. OECD. 2008. Consensus document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.). 64p. (Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45).
22. OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). 87p.
23. Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15:8451-8466.
24. Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
25. Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 43:77-90.
26. Yabe, N., T. Takahashi and Y. Komeda. 1994. Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* HSP90-family gene HSP81. *Plant and Cell Physiology* 35:1207-1219.
27. Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 20:773-786.
28. Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1:361-370.
29. 農林水産省. 2018. “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 29 年度 12 月.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Sequence of Genetic Elements in PV-GHIR508523
2. Bioinformatics Evaluation of the mCry51Aa2 Protein in MON88702 Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028423)
3. Amended Report for MSL0027259: Molecular Characterization of Insect Protected Cotton MON88702 (MSL0028391)
4. Amended Report for MSL0028695: Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 88702: BLASTn and BLASTx Analyses Utilizing the EST_2017, NT_2017, and NR_2017 Databases (MSL0029048)
5. Demonstration of the Presence of Cry51Aa2.834_16 Protein in Lygus Cotton Leaf Samples across Multiple Generations of MON 88702 (MSL0027352)
6. Amended Report for MSL0026822: Segregation Analysis of the T-DNA Insert in Insect-protected Cotton MON 88702 Across Three Generations (MSL0027485)
7. Assessment of Cry51Aa2.834_16 Protein Levels in Cotton Tissues Collected from MON 88702 Produced in United States Field Trials During 2015 (MSL0027766)
8. Amended Report for MSL0028693: Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the MON 88702 Insert: Assessment of Putative Polypeptides Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028798)

9. COMPARE Allergen Database: process development, design and use.
10. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 88702 Utilizing the AD_2017, TOX_2017, and PRT_2017 Databases (MSL0028694)
11. Characterization of the Cry51Aa2.834_16 Protein Purified from the Cotton Seed of MON 88702 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant Produced and Bt Produced Cry51Aa2.834_16 Proteins (MSL0027791)
12. Amended Report for MSL0027977: Assessment of the in vitro Digestibility of Cry51Aa2.834_16 Protein by Pepsin and Pancreatin (MSL0028885)
13. Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of Bacillus thuringiensis-produced MON 88702 Cry51Aa2.834_16 Protein (MSL0028437).
14. Amended Report for MSL0029033: Compositional Analyses of Cottonseed from MON 88702 Grown in the United States During the 2015 Season (MSL0029119)