「ワタ２８１」及び「ワタ３００６」に係る安全性確認

Ⅰ　はじめに

ワタ 281 及びワタ 3006 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　　:ワタ 281、ワタ 3006
性　　質　　:チョウ目害虫抵抗性
申 請 者　　:ダウ・ケミカル日本株式会社
開 発 者　　:マイコジェン・シード／ダウ・アグロサイエンス社

ワタ 281 は、チョウ目害虫抵抗性を付与する Cry1F(synpro)たん白質を発現する遺伝子(*cry1F* (synpro)) を、ワタ 3006 は、チョウ目害虫抵抗性を付与する Cry1Ac(synpro)たん白質を発現する遺伝子(*cry1Ac* (synpro))を導入したものであり、いずれもチョウ目害虫抵抗性の性質が付与されている。

ワタ 281 及びワタ 3006 には、除草剤グルホシネートをアセチル化する改変 *pat* 遺伝子が導入されているが、選抜マーカーとして利用しており、既存のワタとの相違は、チョウ目害虫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。

なお、ワタ 281 及びワタ 3006 を従来の育種手法を用いて掛け合わせた品種(商品名:WideStrike ™)を商品化する予定である。

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

宿主として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 *cry1F*(synpro) 遺伝子は *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* に、*cry1Ac*(synpro) 遺伝子は *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* に、改変 *pat* 遺伝子は *Streptomyces viridochromogenes* 由来する。*cry1F*(synpro)と *cry1Ac*(synpro)遺伝子はチョウ目害虫を防除するたん白質を発現し、改変 *pat* 遺伝子は除草剤グルホシネートへの耐性を付与するもので、選択マーカーとして利用した。

2　家畜等の安全な飼養経験に関する事項

ワタは、主に繊維作物として栽培され、繰り綿が除かれたワタの綿実が油または粉に分離される。その綿実油かすが飼料原料として使用される。また、乳脂肪率を向上させる目的で、乳牛の飼料として綿実を添加することが行われている。

また、綿実にはゴシポールが含まれているため、乳牛に与える場合には、ゴシポールとして 18mg／日が摂取許容量とされている(参考文献②)。

3　飼料の構成成分等に関する事項

＜ワタ 281＞

種子の主要組成（乾物重%）は、たん白質 27.2%、脂質 21.9%、灰分 3.94%、水分 10.5%、炭水化物 47.0%、綿実油かすの主要組成（乾物重%）は、たん白質 49.3%、脂質 4.44%、灰分 6.30%、水分 4.85%、炭水化物 39.9%であった。また、ワタ種子に含まれる天然栄養阻害物質のシクロプロペノイド脂肪酸は、ステルクリン酸 0.153%、マルバリン酸 0.263%、ジヒドロステルクリン酸 0.160%であり、総ゴシポール量は 0.857%であった。

＜ワタ 3006＞

種子の主要組成（乾物重%）は、たん白質 27.2%、脂質 23.0%、灰分 4.05%、水分 10.6%、炭水化物 45.8%、綿実油かすの主要組成（乾物重%）は、たん白質 49.6%、脂質 4.60%、灰分 6.34%、水分 4.90%、炭水化物 39.5%であった。また、ワタ種子に含まれる天然栄養阻害物質のシクロプロペノイド脂肪酸は、ステルクリン酸 0.151%、マルバリン酸 0.278%、ジヒドロステルクリン酸 0.168%であり、総ゴシポール量は 0.916%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

ワタ 281 及びワタ 3006 と既存のワタとの主な相違点は、組換えワタではこれらのたん白質が害虫を防除するため、生育期に用いられる殺虫剤の使用量が減少するということだけである。その他の使用方法については同じである。

① 収穫時期と貯蔵方法

ワタ 281 及びワタ 3006 の生育、形態上の特質及び貯蔵方法は既存のワタとの相違はない。

② 家畜等の摂取部位

家畜等の摂取(可食)部位は種子(綿実油かす)であり、既存のワタとの相違はない。

③ 家畜等の摂取量

わが国におけるワタ種子の輸入量(2002 年)は、約 15 万トンであり、そのうち約 12 万トンが飼料用として使用されている(参考文献③)。また、2002 年における粗粒穀物の輸入量は約 2,000 万トン(参考文献④)であることから、輸入ワタ種子の比率は 0.75%である。

④ 調製及び加工方法

既存のワタの加工と綿実油かすの生産の方法には変わりがない。

以上 1.1～1.4 により、ワタ 281 及びワタ 3006 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

Cry1F(synpro)たん白質を発現するワタ 281 はワタを加害するチョウ目害虫であるコットンボールワーム、タバコバッドワーム等に抵抗性を示す。一方、Cry1Ac(synpro)たん白質を発現するワタ 3006 は、コットンボールワーム、タバコバッドワーム、ピンクボールワーム等に抵抗性を示す。

ワタ 281 及びワタ 3006 を従来の育種手法を用いて掛け合わせた品種の商品化により、ワタ栽培者は、新たな害虫防除法が使用できるワタ品種を栽培することが出来る。

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

宿主は、*Malvaceae* 科、*Gossypium* 属、*hirsutum* 種の GC510 系統である。

2 遺伝的先祖に関する事項

今日、一般に栽培されているワタは、*Gossypium* 属の 50 種の内 4 種であり、*G.hirsutum* L.が最も広く栽培されている。

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及びシクロプロペノイド脂肪酸といった有害物質が含まれている。ワタの種子に含まれるゴシポールは、綿実油かすの加工過程の加熱及びアルカリ処理により取り除かれる。また、シクロプロペノイド脂肪酸は、油の脱臭、漂白精製過程により、その含有量は大幅に減少する。

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、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

ワタに感染する植物ウイルスは存在するが、それらのうち家畜等に感染する能力があるものは知られていない。

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、何世紀にも渡り世界中で栽培されてきたが、雑草害となった例は報告されていない。

7 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

G. hirsutum 種は自家受粉で繁殖する。ワタの花粉は、重く粘り気があるので、普通の環境下では風媒による繁殖はない。また、栽培ワタと交雑するワタ以外の植物は確認されていない。

8 飼料に利用された歴史に関する事項

ワタは主に繊維作物として栽培されている。ワタの綿実は刈り取られ、種子についた繰り綿の繊維が綿繰り機にかけられ取り除かれる。ワタの種子はさらに処理され、残った細かい繰り綿が除かれた後、油または粉に分離される。その綿実油かすを飼料原料として使用する。また、乳脂肪率を向上させる目的で、乳牛の飼料として綿実を添加することが行われている。歴史的には、1980 年半ばまでは輸入ワタ種子のほとんどが飼料として使用されていなかったが、1985 年頃から飼料用として使われる比率が増え始め、1990 年以降は、輸入ワタ種子の 80%が飼料用として使用されるようになっている(参考文献③)。

9 飼料の安全な利用に関する事項

綿実油かすの製造工程中、搾油工程の 100～115℃、60 分間処理及び「圧搾ケーキ」にて 150～200℃、2～3 分間処理することによりゴシポール等の家畜等への有害物質は変成を受け、飼料として安全が確保されている。また、綿実にはゴシポールが含まれているため、乳牛に与える場合には、ゴシポールとして 18mg／日が摂取許容量とされている(参考文献②)。

10 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

日本の環境では、気候条件がワタの生存に適していないため、ワタは増殖することはない。

11　近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

有害生理活性物質を生産するワタの近縁種は存在しない。

4　ベクターに関する事項

1　名称及び由来に関する事項

ワタ 281 の作出に用いた発現ベクターpAGM281 及びワタ 3006 の作出に用いた発現ベクターpMYC3006 の基となったベクターは、RK2 由来の pDAS1 である。本ベクターについては、RK2 プラスミド由来のテトラサイクリン耐性遺伝子の代わりに *Streptococcus faecalis* プラスミド pAM beta（参考文献⑤）由来のエリスロマイシン耐性遺伝子のコード配列が挿入されている他、RK2 由来の複製起点 *ori* 遺伝子と転写抑制遺伝子 *trfA* 及び *R. radiobactor*（*A. tumefaciens*)由来の pTi15955(参考文献⑥)の T-DNA の境界配列が含まれている。

2　性質に関する事項

発現ベクターpAGM281 及び pMYC3006 の塩基数は 14,950bp 及び 15,337bp である。それぞれのベクターに含まれる遺伝子の性質は明らかにされており、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

発現ベクターpAGM281 及び pMYC3006 には、抗生物質(エリスロマイシン)耐性マーカーである *ery*^{R} 遺伝子が T-DNA 領域外に含まれているが、サザンブロット分析により、*ery*^{R} 遺伝子は宿主には導入されていないことが確認されている。

4　伝達性に関する事項

発現ベクターpAGM281 及び pMYC3006 は、自ら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

発現ベクターpAGM281 及び pMYC3006 は、他の植物あるいは家畜等では増えず、伝達ベクターとしての使用と安全性は確立されている。

6　発現ベクターの作成方法に関する事項

挿入遺伝子である *cry1F*（synpro)及び改変 *pat* 遺伝子を DNA クローニング法で pDAS1 に組み込み、発現ベクターpAGM281 を作成した。同様に *cry1Ac*（synpro)及び改変 *pat* 遺伝子を DNA クローニング法で pDAS1 に組み込み、発現ベクターpMYC3006 を作成した。

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

発現ベクターの宿主への挿入は、アグロバクテリウム法により行った。また、発現ベクター内における挿入遺伝子の位置は明らかになっている。

5　挿入遺伝子に関する事項

1　供与体に関する事項

(1)名称、由来及び分類に関する事項

ワタ 281 に導入した *cry1F*(synpro) 遺伝子は *Bacillus thuringiensis*. var. *aizawai* に、

ワタ3006に導入した*cry1Ac*(synpro)遺伝子は*Bacillus thuringiensis*. var. *kurstaki*に由来する。また、改変*pat*遺伝子は*Streptomyces viridochromogenes*に由来する。

(2)安全性に関する事項

Cry1F(synpro)及び*Cry1Ac*(synpro)遺伝子の供与体である*B.t.*について、WHOの化学安全国際プログラム(IPCS)による *B.t.*菌の環境健康基準報告書は、'飲料水または食品に存在する *B.t.*菌がヒトの健康に対する有害性の原因となる記録はない' と結論している。また、哺乳類の腸細胞表面には*B.t.* の産生するδ-エンドトキシンとの結合部位はないことから、家畜等やヒトはこのたん白質の影響を受けることはない。改変 *pat* 遺伝子の供与体である*Streptomyces viridochromogenes*は、ごく普通にみられる土壌に偏在する放線菌であり、ごく僅かのストレプトマイシン対する感受性を持つが、ヒトや動物、植物に対する不都合な影響が報告されたことはない。また、家畜等に対する病原性は知られておらず、毒素の産生のような家畜等に対する健康上の影響を与えることは知られていない。

2 遺伝子の挿入方法に関する事項

ア ベクターへの挿入遺伝子の組込方法

発現ベクターpAGM281は、pDAS1のT-DNA境界配列間に、改変*pat*遺伝子を発現するための配列([UbiZm1]-[改変 *pat*])配列を挿入し、さらに、改変 *pat* 遺伝子と T-DNA領域境界 B との間に、*cry1F*(synpro)遺伝子を発現するための配列([ORF25Poly-A]-[*cry1F*(synpro)]-[(4ocs)Delta-Mas2'])を挿入して構築された。

発現ベクターpMYC3006は、pDAS1 の T-DNA 境界配列間に、改変 *pat* 遺伝子を発現するための配列([(4ocs)Delta-Mas2']-[改変 *pat*]-[ORF25Poly-A])配列を挿入し、さらにORF25Poly-A 配列と T-DNA 領域境界 B との間に、*cry1Ac*(synpro)遺伝子を発現するための配列([*cry1Ac*(synpro)]-[UbiZm1])を挿入して構築された。

イ 挿入遺伝子の宿主への導入方法

ワタ281は発現ベクターpAGM281を用い、ワタ3006は発現ベクターpMYC3006を用い、アグロバクテリウム法によって形質転換した。

3 構造に関する事項

＜ワタ281＞

ア プロモーター

cry1F(synpro)遺伝子のプロモーターは、*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*)のマンノピン合成酵素及びオクタピン合成酵素プロモーター由来の合成プロモーターである(4ocs)Delta-Mas2'プロモーターである。また、改変 *pat* 遺伝子のプロモーターはトウモロコシのユビキチンプロモーターである。

イ ターミネーター

cry1F(synpro) 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子のターミネーターは、*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*) のオープンリーディングフレーム 25(ORF25)の両方向性ポリ A 化シグナルである

ウ 既知の有害塩基配列を含まないこと

ワタ 281 に挿入される DNA の塩基配列はすべて明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

＜ワタ3006＞

ア プロモーター

cry1Ac(synpro) 遺伝子のプロモーターは、トウモロコシのユビキチンプロモーターである。また、改変 *pat* 遺伝子のプロモーターは *R. radiobactor (A. tumefaciens)* 由来の(4ocs)Delta-Mas2'プロモーターである。

イ ターミネーター

cry1Ac(synpro) 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子のプロモーターは、*R. radiobactor (A. tumefaciens)* の ORF25 の両方向性ポリ A 化シグナルである。

ウ 既知の有害塩基配列を含まないこと

ワタ 3006 に挿入される DNA の塩基配列はすべて明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

4 性質に関する事項

ア 挿入 DNA の機能

ワタ 281 及びワタ 3006 に導入された遺伝子の各構成要素、由来及び機能を表1及び表2に示した。

イ DNA の分子量

ワタ 281 に導入された目的の遺伝子とその調節遺伝子を含む T-DNA の挿入部分の塩基数は 8,014bp であり、そのうち *cry1F*(synpro) 遺伝子の塩基数は 3,447bp で、改変 *pat* 遺伝子の塩基数は 552bp である。また、ワタ 3006 に導入された目的の遺伝子とその調節遺伝子を含む T-DNA の挿入部分の塩基数は 8,421bp であり、そのうち、*cry1Ac* (synpro) 遺伝子の塩基数は 3,471bp で、改変 *pat* 遺伝子の塩基数は 552bp である。

ウ 制限酵素による切断地図

制限酵素による切断地図は明らかにされている。

表1 ワタ 281 への挿入 DNA

遺伝要素	詳細
(4ocs)Delta-Mas 2'	pTiAch5 (参考文献⑦)由来のオクトピン合成酵素 (OCS) のエンハンサー4コピーを含む pTi15955 (参考文献⑧) 由来のマンノピン合成酵素のプロモーター
cry1F(synpro)	*Bacillus thuringiensis.* var. *aizawai* 由来の、植物用に最適化された遺伝子で、コアトキシン Cry1F(core)、Cry1Ca3 と Cry1Ab をコードする。
ORF25 Poly-A	*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*)pTi15955 (参考文献⑧) 由来の双方向ターミネーター
改変 *pat*	*Streptomyces viridochromogenes* 由来のフォスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子 (参考文献⑨)
UbiZm1(intron 1)	トウモロコシ *Zea mays* のユビキチン 1 プロモーター (参考文献⑩)

表2 ワタ 3006 への挿入 DNA

遺伝要素	詳細
UbiZm1 (intron 1)	トウモロコシ *Zea mays* のユビキチン 1 プロモーター(参考文献⑩)
cry1Ac (synpro)	*Bacillus thuringiensis.* var. *kurstaki* 由来の、植物用に最適化された 遺伝子で、コアトキシン Cry1Ac(core)、Cry1Ca3 と Cry1Ab をコードする。
ORF25 Poly- A	*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*)pTi15955 (参考文献⑧)由来の双方向ターミネーター
改変 *pat*	*Streptomyces viridochromogenes* 由来のフォスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子(参考文献⑨)
(4ocs)Delta-Mas 2'	pTiAch5(参考文献⑦)由来のオクトピン合成酵素(OCS)のエンハンサー4コピーを含む pTi15955(参考文献⑧)由来のマンノピン合成酵素のプロモーター

5 純度に関する事項

発現ベクターpAGM281 及び発現ベクターpMYC3006 は、遺伝子組換え過程で他の DNA の混入がないように純化して用いた。

6 安定性に関する事項

＜ワタ 281＞

ワタ 281 の *cry1F*(synpro) 遺伝子と改変 *pat* 遺伝子の世代間における安定性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、2世代における遺伝子の同一性が示された。また、サザンブロット分析と免疫化学的手法の組み合わせによって、ワタ 281 に導入した *cry1F* (synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の同一世代内形質分離を調べところ、供試世代における *cry1F*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の分離比の実測値は 3.06：0.94 となり、予想比と実測比には二項比例検定による有意差は認められなかった(P>0.05)。また、たん白質発現データとサザンブロット分析の間には、100%の相関関係が認められた。ワタ 281 の分離及び安定性データから、Cry1F(synpro)及び PAT たん白質発現カセットは同じ遺伝子座に挿入されていることが示唆された。

＜ワタ 3006＞

ワタ 3006 の *cry1Ac*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の世代間における安定性を確認するために、サザンブロット分析を行った結果、2世代における遺伝子の同一性が示された。また、ワタ 3006 に導入された *cry1Ac*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の世代内での形質分離を、サザンブロット分析と免疫化学手法を組み合わせによって調べたところ、供試世代における *cry1Ac*(synpro) 及び改変 *pat* 遺伝子の分離比の実測値は、3.36:0.64 となり、予想比と実測比には二項比例検定による有意差は認められなかった(P>0.05)。また、たん白質発現データとサザンブロット分析の間には 100%の相関関係があった。ワタ 3006 の分離及び安定性データから、Cry1Ac(synpro)及び PAT たん白質発現カセットは同じ遺伝子座に挿入されていることが示唆された。

7 コピー数に関する事項

＜ワタ281＞

導入遺伝子のコピー数の解明、各 DNA 配列と挿入を確認するために、サザンブロット分析と挿入 DNA のクローニング及び塩基配列の決定を行った結果、ワタ 281 には、Cry1F(synpro)及び PAT たん白質を発現する遺伝子カセットの完全な1コピーと改変 *pat* 遺伝子の一部分のコピー1断片(部分的 *pat* 遺伝子)がワタゲノム中に存在することが示唆された。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

＜ワタ3006＞

導入遺伝子のコピー数の解明、各 DNA 配列と挿入を確認するために、サザンブロット分析と挿入 DNA のクローニング及び塩基配列の決定を行った結果、ワタ 3006 には、Cry1Ac(synpro)及び PAT たん白質を発現する遺伝子カセットの完全な1コピーがワタゲノム中に存在することが示唆された。なお、挿入近傍配列も明らかとなっている。

8 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

＜ワタ281＞

発現部位と発現量については、Cry1F(synpro)たん白質の平均濃度は、花粉中の極微量(0.09ng/mg)から全植物の 22.8ng/mg 以上までと幅が広く、種子中の平均発現量は、5.13ng/mg であった。PAT たん白質の発現量のレベルは未検出(ND)から蕾の 0.51ng/mg の範囲であり、種子中の平均発現量は、0.47ng/mg であった。発現時期と発現量については、Cry1F(synpro)及び PAT たん白質とも、すべての生育時期における葉、花及び綿実さや中で検出された。また、Cry1F(synpro)及び PAT たん白質は、加工により綿実油かすにおいては検出不可能なレベルにまで減少していた。

＜ワタ3006＞

発現部位と発現量については、Cry1Ac(synpro)たん白質の平均濃度は、落葉時期の根の極微量(0.05ng/mg)から葉及び花の 1.92ng/mg の範囲であり、種子中の平均発現量は 0.57ng/mg であった。PAT たん白質の発現のレベルは未検出(ND)から 0.11ng/mg の範囲であり、種子中の平均発現量は極微量(0.06 ng/mg)であった。Cry1Ac(synpro)たん白質の発現時期と発現量については、すべての生育時期の葉、花及び綿実さや中で検出されたが、PAT たん白質は葉においてのみ検出された。また、Cry1Ac(synpro)及び PAT たん白質は、加工により綿実油かすにおいては検出不可能なレベルにまで減少した。

9 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

発現ベクター pAGM281 及び pMYC3006 の T-DNA 領域には、抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない。エリスロマイシン耐性遺伝子は、このプラスミドの T-DNA 領域の外に含まれているため、ワタ 281 及びワタ 3006 のゲノム内には存在しない。

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

＜ワタ281＞

挿入 DNA 及び隣接境界領域の塩基配列分析により、UbiZm1 プロモーターと改変 *pat* 遺伝子の断片配列(231bp)は、完全な PAT たん白質発現カセットとは逆方向に位置することが確認された。また、実際に挿入された T-DNA 領域の塩基配列は、UbiZm1 プロモーター領

域内で2つの塩基が変化していた以外は一致し、この他には、目的とする以外のたん白質を発現する可能性のある新しいオープンリーディングフレームは同定されなかった。

なお、*pat* 配列の断片が 255bp オープンリーディングフレームの一部を構成しており、改変 *pat* 遺伝子由来の 231bp(N-ターミナル 77aa)及び隣接する 3'T-DNA 境界領域由来の 24bp(C-ターミナル 8aa)からなる 85 アミノ酸ポリペプチドをエンコードしている可能性がある。

UbiZm1 プロモーターが存在することから、ワタ 281 内でこの改変 *pat* 遺伝子断片のオープンリーディングフレームの *in vivo* 転写が起こり、分子量 9.7kDa の部分的 PAT たん白質が産生されている可能性が考えられた。また、RT-PCR 解析の分析の結果、改変 *pat* 遺伝子断片のオープンリーディングフレームの転写量は、全長の8分の1であることが分かった。さらに、ワタ 281 の組織のウエスタンブロット分析の結果、分子量 9.7kDa の部分的 PAT たん白質は検出されなかった。以上の結果から、仮に、ワタ組織中で部分的 PAT たん白質が発現したとしても、完全長の改変 *pat* 遺伝子より発現する PAT たん白質(分子量 20.7kDa)に比べ僅かであること、また、飼料として利用される綿実油かすからはたん白質は検出されないこと等から、安全性に問題はないと判断された。

＜ワタ 3006＞

挿入 DNA 及び隣接境界領域の塩基配列分析により、目的とする以外のたん白質を発現する可能性のある新しいオープンリーディングフレームは同定されなかった。また、実際に挿入された T-DNA 領域の塩基配列は完全に一致することが確認された。

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

ワタ 281 は組換え DNA 操作により Cry1F(synpro)及び PAT たん白質を発現し、ワタを加害するチョウ目害虫であるコットンボールワーム、タバコバッドワーム等に抵抗性を示す。一方、ワタ 3006 は組換え DNA 操作により Cry1Ac(synpro)及び PAT たん白質を発現し、ワタを加害するチョウ目害虫であるコットンボールワーム、タバコバッドワーム、ピンクボールワーム等に抵抗性を示す。

2 遺伝子産物の毒性に関する事項

既知のたん白質毒素と導入されたたん白質のアミノ酸配列の相同性を検討した。配列分析は NCBI web site(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)にある BLASTP プログラムを用いて行い、ペプチドデータベースの GenPept に対し、Cry1Ac(synpro)及び Cry1F(synpro)たん白質のアミノ酸配列を比較した結果、Cry1Ac(synpro)及び Cry1F(synpro)たん白質と既知のたん白質毒素の間に、相同性がないことが判明した。同様に、PAT たん白質を BLASTP 分析した結果、PAT たん白質と既知または推定上のたん白質毒素との間に顕著な相同性がないことが判明した。

ワタ 281 の組換え挿入部位及び隣接している境界の配列決定により、部分的 PAT たん白質(以下 pPAT と表記)のオープンリーディングフレームの存在が示された。完全な PAT たん白質とたん白質配列データベース中の既知のたん白質毒素との比較においては、PAT たん白質に毒性の懸念がなかったものの、pPAT と既知のたん白質毒素間の相同性を検討するために pPAT のアミノ酸配列に焦点を当てた検索を行った。その結果、pPAT に成り得るたん白質と既知あるいは推定上のたん白質毒素との間には、有意な相同性は見つからなかった。

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

＜ワタ 281＞

遺伝子組換え *Pseudomonas fluorescens* (DR1647)由来の Cry1F(synpro)たん白質及び *Escherichia coli* 発現システムにより産生された PAT たん白質を用いて以下の試験が行われた。なお、DR1647 由来の Cry1F(synpro)たん白質は、ワタ 281 で発現するたん白質と同一のアミノ酸配列であり、生化学的、構造的及び機能的に同等であることが確認されている。

1) 人工胃液による消化性

Cry1F(synpro)たん白質をペプシンを含む人工胃液(SGF)に加え、0～30 分間処理したところ、Cry1F(synpro)たん白質は SGF 内で 1 分以内に検出限界以下に消化され、ウエスタンブロットにおいて免疫反応性ポリペプチドは検出されなかった。また、PAT たん白質を SGF に加え、0～60 分間処理したところ、PAT たん白質は 30 秒以内に検出限界以下に消化された。

2) 人工腸液による消化性

Cry1F(synpro)たん白質を約 1%(w/v)のパンクレアチンを含む人工腸液(SIF)に加えたところ、Cry1F(synpro)たん白質は SIF の中で耐トリプシンのコアトキシンへ急速に消化されたが、コアトキシンは4時間後でも消化されなかった。また、PAT たん白質は、パンクレアチンを含む SIF で 0.5 分以内に消化されることが明らかにされている（参考文献⑫)。

3) 加熱処理による変性

90℃、30 分間の加熱処理により、Cry1F(synpro)たん白質は分子量が変化しなかったが、免疫反応性が 98%以上失われていることが確認された。また、PAT たん白質は、90℃で 60 分間加熱処理しても分子量に変化がないことが明らかにされているが（参考文献⑫)、50℃、10 分間の加熱処理により失活することが確認されている（参考文献⑬)。

＜ワタ 3006＞

遺伝子組換え *Pseudomonas fluorescens* (MR1620) 由来の Cry1Ac(synpro)たん白質及び *Escherichia coli* 発現システムにより産生された PAT たん白質を用いて以下の試験が行われた。MR1620 由来の Cry1Ac(synpro)たん白質は、ワタ 3006 で発現するたん白質と同一のアミノ酸配列であり、生化学的、構造的及び機能的に同等であることが確認されている。

1) 人工胃液による消化性

Cry1Ac(synpro)たん白質をペプシンを含む人工胃液(SGF)に加え、0～30 分間処理したところ、Cry1Ac(synpro)たん白質は SGF により 1 分以内に検出限界以下に消化され、ウエスタンブロットにおいて免疫反応性ポリペプチドは検出されなかった。また、PAT たん白質を SGF に加え、0～60 分間処理したところ、PAT たん白質は 30 秒以内に検出限界以下に消化された。

2) 人工腸液による消化性

Cry1Ac(synpro)たん白質を約 1%(w/v)のパンクレアチンを含む人工腸液(SIF)に加えたところ、Cry1Ac(synpro)たん白質は SIF 中で耐トリプシンのコアトキシンへ急速に消化されたが、コアトキシンは 4 時間後でも消化されなかった。また、PAT たん白質は、パンクレアチンを含む SIF で 0.5 分以内に消化されることが明らかにされている（参考文献⑫)。

3) 加熱処理による変性

90℃、30 分間の加熱処理により、Cry1Ac(synpro)たん白質は分子量が変化しなかったが、免疫反応性が 99%以上失われていることが確認された。また、PAT たん白質は、90℃

で 60 分間加熱処理しても分子量に変化がないことが明らかにされているが（参考文献⑫）、50℃、10 分間の加熱処理により失活することが確認されている（参考文献⑬）。

4 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

昆虫防除に有効な Cry1F 及び Cry1Ac たん白質は、植物の代謝経路に影響する酵素ではない。PAT 酵素は基質特異性が極めて高い(参考文献⑭)。フォスフィノトリシン関連物質の親和性は極めて低く、また他の基質はこれまでに報告されていないので、ワタが天然に有する物質が PAT たん白質に反応し、ワタの代謝経路に影響を与えることはないと考えられる。

5 宿主との差異に関する事項

＜ワタ 281＞

ワタ 281 と対照の非組換えワタについて、種子及び綿実油かすの主要組成、無機成分及びアミノ酸組成(18 種類)、種子の脂肪酸組成(22 種類)及びビタミン E(α-、β-、γ-及びδ-トコフェロール)を分析し比較した。その結果、綿実油かすの銅、鉄、トレオニン、リシン及び種子のパルミトオレイン酸で有意差が認められたが、それらの分析値は文献値の範囲にあった。その他の分析値については有意差が認められなかった。

また、ワタに含まれる 2 つの天然栄養阻害物質であるシクロプロペノイド脂肪酸(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)とゴシポールについて、ワタ 281 及び対照ワタの種子及び綿実油かすにおけるそれらの含有量を分析した。その結果、種子に含まれる総ゴシポール量は、ワタ 281 と対照ワタとの間に有意差が認められたが、ワタ 281 の分析値は文献値の範囲にあった。その他の分析値については、対照ワタとの間に有意差は認められなかった。

＜ワタ 3006＞

ワタ 3006 と対照の非組換えワタについて、種子及び綿実油かすの主要組成、無機成分及びアミノ酸組成(18 種類)、種子の脂肪酸組成(22 種類)及びビタミン E(α-、β-、γ-及びδ-トコフェロール)を分析し比較した。その結果、種子の硫黄、パルミトオレイン酸及び綿実油かすの鉄、マンガン、カリウムで有意差が認められたが、それらの分析値は文献値の範囲にあった。その他の分析値については有意差が認められなかった。

また、種子及び綿実油かすにおけるシクロプロペノイド脂肪酸(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)とゴシポールについて、ワタ 3006 及び対照ワタの種子及び綿実油かすにおけるそれらの含有量を分析した。その結果、対照ワタとの間に有意差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

ワタは亜熱帯性の植物で、平均越冬気温が最も寒い月で 18℃以下になると生存できず、また、乾期に水が著しく不足すると生存がかなり制限されることから、害虫抵抗性 *cry* 遺伝子の発現は、日本におけるワタの生存能力に影響することはない。

7 生存及び増殖能力の制限に関する事項

ワタ 281 及びワタ 3006 で産生される殺虫性たん白質は、多くのワタの害虫の存在下でワタの生存を助けるものであるため、生存及び増殖能力の制限に関し、既存のワタとの相違はないと考えられる。

8 不活化法に関する事項

該当しない。

9 外国における認可等に関する事項

米国農務省は、2004 年 7 月 15 日、ワタ 281、ワタ 3006 及び WideStrike™ が栽培規制の対象から除外されることを決定した。

米国食品医薬品局では、2004 年 5 月 5 日にワタ 281、2004 年 8 月 3 日にワタ 3006 の安全性の評価が終了した。ダウ・アグロサイエンス社は、その審議会の中でそれぞれの品種を掛け合わせた品種のみ使用する事を明らかにした。

米国環境保護局は、2004 年 9 月 30 日に WideStrike™ の登録を許可した。

メキシコ保健省は、2004 年 9 月 8 日に WideStrike™ の登録を許可した。

10 作出、育種及び栽培方法に関する事項

タバコバットワーム、コットンボールワーム等の害虫を防除するための殺虫剤使用の必要性が少なくなることを除いては、ワタ 281 及びワタ 3006 の栽培方法は既存のワタと同一である。また、作出、育種方法についても同一である。

11 種子の製法及び管理方法に関する事項

ワタ 281 及びワタ 3006 の種子の製法は、既存のワタと同一である。また、ワタ 281 及びワタ 3006 の種子は、ダウ・アグロサイエンス社において冷暗所で他の種子と区別して管理している。

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

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

ワタ 281 及びワタ 3006 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 PA (1979) 'The natural history of the cotton tribe (Malvaceae, tribe Gossypieae).' (Texas A&M Press: College Station, USA)

② OECD (2003) ‘Draft Consensus Deocument on Compositional Considerations for New

Varieties of Cotton (Gossipium Hirsutum and Gossypium Barbadense): Key Food And Feed Nutrients and anti-Nutrients'. '
③ Food and Agriculture Organization 2004. Food Balance Sheet.
④ 農水省、2005、「飼料をめぐる情勢」、生産局畜産振興課
⑤ Brehm J, Salmond G, Minton N. Sequence of the adenine methylase gene of the Streptococcus faecalis plasmid pAM beta 1. *Nucleic Acid Res.* (1987) 15: 3177.
⑥ Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* (1983) 2: 335-350.
⑦ Ellis JG, Llewellyn DJ, Walker JC, Dennis ES, Peacock WJ (1987) The OCS element: a 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. *EMBO J.* 6, 3203-3208.
⑧ Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2, 335-350.
⑨ Eckes P, Vijtewaal B, Donn G (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. *Journal of Cell Biochemistry* 13D, 334.
⑩ Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18, 675-689.
⑪ IPCS. *Bacillus thuringiensis*. Environmental Health Criteria of the International Programme on Chemical Safety, No 217. 2000.
⑫ Hérouet C, et al.(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, 134-149.
⑬ Wehrman A, Vliet A, Opsomer J, Schulz A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology.* (1996)
14: 1274-1278.*et al.* 1996
⑭ Thompson CJ, Rao Movva N, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwerys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus. EMBO J.* **6,** 2519-2523.