

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グルホシネート耐性及び
チョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統**

**平成 24 年 7 月 5 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	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
(1)	遺伝的素材に関する事項	4
(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
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	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
(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
(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	7
(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	7
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	8
(3)	構造に関する事項	8
(4)	性質に関する事項	9
(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

(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 2
(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 2
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	1 2
(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 4
(5) 宿主との差異に関する事項	1 5
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	1 6
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	1 6
(8) 不活化法に関する事項	1 6
(9) 外国における認可等に関する事項	1 6
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	1 6
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	1 7
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 7
IV 審議結果	1 7
V 参考文献及び参考資料	1 7

「除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統」に係る 安全性確認

I はじめに

5 除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統（以下「GHB119 ワタ」という。）について、平成 23 年 2 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。

10

II 確認対象飼料の概要

飼料名：除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統

性質：除草剤グルホシネート耐性、チョウ目害虫抵抗性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

15

開発者：Bayer CropScience（ドイツ）

GHB119 ワタは、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* に由来する *bar* 遺伝子の塩基配列を一部改変した改変 *bar* 遺伝子及び土壌細菌 *Bacillus thuringiensis* subsp. *dakota* に由来する *cry2Ae* 遺伝子を導入したワタである。

20

改変 *bar* 遺伝子により発現する改変ホスフィノトリシンアセチル基転移酵素（以下「改変 PAT たん白質」とする。）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で、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性が付与される。また、*cry2Ae* 遺伝子により発現する Cry2Ae たん白質が、ワタ栽培で発生するニセアメリカタバコガ、アメリカタバコガ、オオタバコガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与させる。なお、チョウ目以外の昆虫や動物が Cry2Ae たん白質を摂食しても影響はない。

25

GHB119 ワタの作出に用いた導入用プラスミドには、導入遺伝子配列領域とは別の領域にストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子（以下「*aadA* 遺伝子」とする。）が存在する。*aadA* 遺伝子により、導入用プラスミドを有するアグロバクテリウムのみをストレプトマイシン等の添加された培地上で選抜することができる。また、導入用プラスミドの導入遺伝子配列領域外には、ネオマイシンリン酸基転移酵素 I 遺伝子（以下「*nptI* 遺伝子」とする。）の断片も存在する。これらの遺伝子が GHB119 ワタに導入されていないことは確認されている。

30

GHB119 ワタと既存の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、差異が認められなかった。そこで、遺伝子組換え操作により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。

35

一般に、ワタは綿実及び綿実油かすが家畜等の飼料に使用されている。

40

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

45 宿主に用いられた植物は、アオイ科 (Malvaceae)、ワタ連 (*Gossypieae*)、
ワタ属 (*Gossypium*) に属するワタ (*Gossypium hirsutum* L.) である。

GHB119 ワタには、放線菌 *S. hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子及び土壌細菌 *B. thuringiensis* subsp. *dakota* 由来の *cry2Ae* 遺伝子が導入されている。

50 改変 *bar* 遺伝子産物である改変 PAT たん白質は、除草剤グルホシネート耐性を付与する。また、*cry2Ae* 遺伝子産物である Cry2Ae たん白質は、チョウ目害虫抵抗性を付与する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

55 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安全に利用された歴史を有することが明らかとなっている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

60 宿主植物であるワタ及び GHB119 ワタの構成成分等の量は明らかになっており、比較が可能である (Amann and Eickhoff, 1999; Berberich *et al.*, 1996; Bertrand *et al.*, 2005; Calhoun *et al.*, 1995; ILSI, 2007; Lundquist, 1995; Nida *et al.*, 1996; OECD, 2004; USCA, 1982)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

65 GHB119 ワタと既存のワタとの使用方法について、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取 (可食) 部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法を確認した結果、相違は認められない。

(1) ~ (4) より、GHB119 ワタの飼料としての安全性評価においては、既存の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

75 GHB119 ワタは、改変 *bar* 遺伝子産物の発現する改変 PAT たん白質により、除草剤グルホシネート耐性が付与されており、除草剤グルホシネートを散布されても影響を受けずに生育することができる。そのため、生育時期を問わず、農作物への付着を避けるための措置を講ずることなく除草剤グルホシネートを散布することができ、効率的な雑草防除が可能になる。また、*cry2Ae* 遺伝子の発現する Cry2Ae たん白質により、ワタ栽培の主要チョウ目害虫に対して抵抗性を示す。よって、害虫防除のための殺虫剤散布量を軽減することが可能となる。

80 なお、GHB119 ワタ系統の飼料としての利用目的及び利用方法は従来のワタと相違ない。

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

GHB119 ワタの宿主は、アオイ科ワタ属のワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の商業品種 Coker312 である。

85

(2) 遺伝的先祖に関する事項

現在、ワタ属植物種は 2 倍体種と 4 倍体種から成り、およそ 50 種が分布している (Fryxell, 1992; Wendel and Cronn, 2003)。栽培種は 2 倍体種(2n=26)の *G. herbaceum* 及び *G. arboreum*、並びに、4 倍体種(2n=52)の *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* の 4 種のみである。今日生産されるワタの 90%以上を *G. hirsutum* が占めている (OECD, 2008)。

90

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ワタは、有害生理活性物質として、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸 (ステルクリン酸、マルバリン酸及びジヒドロステルクリン酸の総称) を含むことが知られている。

95

ゴシポールは多くのワタ属で認められるテルペン類化合物であり、種子を含む植物の腺組織に局在しており (Abou-Donia,1989)、草食動物や害虫に対して抵抗性を持つために重要な物質であるとされている (Bell,1986)。結合型と遊離型があり、結合型は有害性を示さないが、遊離型のゴシポールは単胃動物に対する毒性が強い。従って、綿実由来の食品及び飼料では、ゴシポール濃度を最小限に抑える必要がある (Berardi and Goldblatt,1980 ; 唐澤, 2004)。

100

ステルクリン酸 (C-19) やマルバリン酸 (C-18) 等のシクロプロペン脂肪酸は、ワタ特有の脂肪酸である。ステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害することにより、鶏卵の卵黄膜の脆弱化や変色を引き起こすことから (Gunstone *et al.*,1994)、産卵鶏に不給与とされる等、家畜により綿実等の給餌量が制限されている (田先, 1996 ; 唐澤, 2004)。これらの脂肪酸は、製油工程を経た後では著しく減少する (新谷,1989; Gunstone *et al.*,1994)。

105

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

ワタの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

110

(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 (Munro,1987)、それら病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

115

(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

栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできず、雑草化しないことが知られている (OECD, 2008)。なお、我が国においても栽培種のワタが自生したという報告はなされていない。

120

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

125 ワタは一年生、短日性、両性花の植物であり、主に自家受粉により種子が作られる（Niles and Feaster, 1984）。他家受粉の場合、ワタの花粉は重く粘性があるため、通常的环境下では風媒ではなく虫媒により行われることもある。また、同一倍数体のワタ属との間では交雑する可能性があるが、異なる倍数体のワタ属との間では交雑しない（OECD, 2008）。我が国において宿主に用いられたワタと交雑可能な近縁野生種の存在は知られていない。

130 **（８）飼料に利用された歴史に関する事項**

135 綿実収穫された後、綿繰り機で綿毛（長繊維綿毛：リント）を取り除いて脱綿毛綿実となり、洗浄後、短い繊維（リントー）を除去する撚摺機により綿実殻と種子に分離される。種子は粉碎・搾油され、綿実油かすが得られる。綿実油かすは、成牛や成羊等に対して配合飼料の原料として利用されている。また、豚及び鶏の飼料には、適切な量で配合される。綿実殻は栄養価が少なくかさの多い成分であるものの、乾牧草と同等の価値があり、牧草の補充供給物として利用されている（NCPA, 1999）。

140 **（９）飼料の安全な利用に関する事項**

140 上記（３）のとおり、ワタにはゴシポール等の有害生理活性物質が存在することが知られているが、上記（８）のとおり、綿実及び綿実油かす等を適切に取り扱うことにより飼料として安全に利用されている。

145 **（10）生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項**

145 栽培種として人為的に改良されたワタは、自然環境下では人の介入なしに生存することはできないことが報告されている。

150 ワタは、種子の発芽最低温度が12℃、最適温度が27～36℃で、日照を好む植物である。ワタの生育のためには、年平均気温が15℃以上、無霜期間が180～200日以上、晴天日が生育期間の40%以上あることが必要とされる。我が国のように、ワタの播種期・幼苗期に低温・多湿な環境では、種子は地中で腐敗し、幼苗は種々の病原菌により立枯れ・腰折れ等を引き起こすことが多い。また、結実期・開絮期には、多雨・多湿のため、さくが病気に侵されることが多い（原田, 1987）。

155 **（11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項**

 ワタ連（*Gossypieae*）にはゴシポール腺があり、有害物質であるゴシポールが含まれる。ワタ連に分類されるワタ属（*Gossypium*）の近縁種には、8つの属がある（Fryxell, 1968）。

160 **4 ベクターに関する事項**

（１）名称及び由来に関する事項

 GHB119 ワタの作出には、発現ベクターpTEM12 が用いられた。本ベクターは、pGSC1700 由来の pTYG50 を用いて作成された（参考資料 1）。ベクター

の作成に用いられたプラスミドの家畜等に対する有害性は知られていない。

165

(2) 性質に関する事項

pTEM12 の塩基数は 12,266bp である。その塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている。pTEM12 に存在する全ての遺伝子の特性は明らかとなっており、既知の有害な塩基配列を含まない (参考資料 2)

170

(3) 薬剤耐性に関する事項

pTEM12 は、大腸菌 (*E. coli*) 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) において、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子 (*aadA* 遺伝子) を有する。本遺伝子は pTEM12 を構築するためにプラスミドが挿入された大腸菌を選抜するマーカーとして用いられた。また、完全な遺伝子ではないが、pTEM12 は、カナマイシンやネオマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質に対して耐性を付与する選択マーカー遺伝子 (*np1* 遺伝子) の断片を有する。

175

180

(4) 伝達性に関する事項

pTEM12 には伝達性因子は含まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

pTEM12 の宿主域は、*E. coli* 及び *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) など数種のグラム陰性細菌に限られており、他の植物あるいは家畜等が宿主となることはない。

185

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

GHB119 ワタの作出に用いた pTEM12 は、pTYG50 (参考資料 1) の T-DNA 反復配列 (LB と RB) の間に、後述の改変 *bar* 遺伝子発現カセットと *cry2Ae* 遺伝子発現カセットを含む領域を挿入して作出された。

190

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

アグロバクテリウム法 (Deblaere *et al.*, 1987) により、pTEM12 の T-DNA 領域をワタゲノム中に導入した。

195

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

- ・改変 *bar* 遺伝子は、*S. hygrosopicus* に由来し、野生型 *bar* 遺伝子がコードする野生型 PAT たん白質の N-末端の 2 つのコドン、植物で使用頻度の高いコドン及び翻訳の効率を高めるコドンにそれぞれ置換したものである。
- ・*cry2Ae* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *dakota* に由来し、ワタにおける

200

205 発現に適するようコドンを変更したが（参考資料 3）、コードされるアミノ酸には変更による変化はない（Arnaut *et al.*, 2005）。

② 安全性に関する事項

210 *Streptomyces* 属は、土壌、飼料、堆肥等に存在し、古くより身近な存在であった。家畜等の動物による直接的な食経験はないが、実際に家畜等の動物との長い接触の歴史があり、病原性等の問題は報告されていない。また、*B. thuringiensis* は、家畜など動物による直接的な食経験はないが、微生物農薬として、長期にわたり、穀物、飼料、果実、野菜、繊維作物等に安全に利用されている（OECD, 2007）。

215 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

pTYG50 の LB と RB の間に、変更 *bar* 遺伝子発現カセット及び *cry2Ae* 遺伝子発現カセットを挿入し、導入用プラスミド pTEM12 を得ている。

220 アグロバクテリウム法（Deblaere *et al.*, 1987）により、組換え遺伝子をワタゲノムに導入している。再生した植物体を、グルホシネートを含む再生培地を用いて培養することにより、グルホシネート耐性株を選抜している。ほ場において選抜を繰り返した後、優良系統を選抜し GHB119 ワタを得ている。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

225 変更 *bar* 遺伝子のプロモーターには、Cassava Vein Mosaic Virus 由来のプロモーターPcsmv XYZ が用いられている（Verdaguer *et al.*, 1996）。

cry2Ae 遺伝子のプロモーターには、Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA のプロモーターP35S2 が用いられている（Odell *et al.*, 1985）。

② ターミネーターに関する事項

230 変更 *bar* 遺伝子のターミネーターには、*A. tumefaciens* 由来のプラスミド pTiT37 の T-DNA より得たノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域由来である 3'nos が用いられている（Depicker *et al.*, 1982）。

235 *cry2Ae* 遺伝子のターミネーターには、Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA の 3'非翻訳領域由来である 3'35S が用いられている（Sanfaçon *et al.*, 1991）。

③ その他

240 *cry2Ae* 遺伝子上流には、*cry2Ae* 遺伝子の発現レベルを増加させるため、*P. hybrida* 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダー配列である、5'cab22L が配置されている（Harpster *et al.*, 1988）。また、成熟した *Cry2Ae* たん白質が色素体に移行できるようにするために、*A. thaliana* 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子 *ats1A* の輸送ペプチドのコード領域である、TPssuAt が配置されている（De Almeida *et al.*, 1989）。

以上、挿入 DNA の構成要素は、いずれもその由来及び機能等は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

挿入 DNA の構成要素の由来及び機能等について、表 1 にまとめた。改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子の機能の詳細は表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び性質等

構成要素	由来及び機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット	
3'nos	<i>A. tumefaciens</i> 由来のターミネーター領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>bar</i> (改変 <i>bar</i>)	<i>S. hygrosopicus</i> に由来する改変 PAT たん白質をコードし (Thompson <i>et al.</i> , 1987)、除草剤グルホシネート耐性を付与する。
Pcsmv XYZ	Cassava Vein Mosaic Virus 由来のプロモーター領域 (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。
<i>cry2Ae</i> 遺伝子発現カセット	
P35S2	Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA 由来のプロモーター領域 (Odell <i>et al.</i> , 1985)。
5'cab22L	<i>Petunia hybrida</i> 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダー配列領域 (Harpster <i>et al.</i> , 1988)。
TPssuAt	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子 <i>ats1A</i> の輸送ペプチドのコード領域 (De Almeida <i>et al.</i> , 1989)。
<i>cry2Ae</i>	<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> 由来する <i>Cry2Ae</i> たん白質をコードし、チョウ目害虫抵抗性を付与する (Arnaut <i>et al.</i> , 2005)。
3'35S	Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA 由来のターミネーター領域 (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991)。

① 改変 *bar* 遺伝子の機能

植物の窒素代謝の過程で生成されるアンモニアの無毒化には、グルタミン合成酵素が中心的役割を果たしており、グルホシネートはグルタミン合成酵素の働きを阻害することでアンモニアを蓄積させ、除草活性を発揮する。改変 *bar* 遺伝子により発現した改変 PAT たん白質がグルホシネートを N-アセチルグルホシネートに変換することにより、グルホシネートを不活化させる。その結果、植物はグルホシネートの影響を受けずに生育できる。

② *cry2Ae* 遺伝子の機能

cry2Ae 遺伝子によって産生される *Cry2Ae* たん白質は、チョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ、アメリカタバコガ、オオタバコガ、ワタアカミムシ、ツマジロクサヨトウ及びシロイチモジヨトウ等に殺虫活性を示す。

265 *Cry2Ae* たん白質を含む *Bt* たん白質は、標的昆虫の中腸で分泌されるプロテアーゼにより部分消化され、活性型のコアたん白質となる。コアたん白質は、中腸上皮上に存在する、コアたん白質に特異的な受容体と結合することにより、中腸上皮細胞膜にイオンチャネルを形成する。その結果、消化プロセスが阻害された標的昆虫は、飢餓状態に陥る、又は、敗血症を引き起こすことで死に至る (Knowles and Dow, 1993; Broderick *et al.*, 2006)。

270 *Cry2Ae* たん白質は、我が国において既に安全性が確認された遺伝子組換え作物に導入されている *Cry2Ab* たん白質と 86.4%のアミノ酸配列の相同性を有し (添付資料 34)、標的昆虫の消化管内の同じ受容体に結合することが確認されている (Hernandez-Rodriguez *et al.*, 2008)。なお、標的昆虫に対する殺虫活性は、*Cry2Ae* たん白質の方がやや高いことが報告されている (Arnaut *et al.*, 2005)。一方、標的としない動物に対する毒性は認められていない (添付資料 35)。

(5) 純度に関する事項

280 挿入された DNA の構成要素はすべてクローニングされ、その塩基配列が解明されており (参考資料 4)、目的外の遺伝子の混入はなく純化されている。

(6) コピー数に関する事項

285 1 世代の GHB119 ワタの葉からゲノム DNA を抽出し、T-DNA 領域及び各構成要素をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、1 コピーの T-DNA 領域が GHB119 ワタに移入されたことが確認された (参考資料 5)。GHB119 ワタに導入された DNA の塩基配列及び近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、挿入 DNA の左側境界領域の 20bp と右側境界領域の 23bp の欠損を除き、導入用プラスミド pTEM12 上の T-DNA 領域の塩基配列と完全に一致することが確認された (参考資料 4)。

290 また、導入用プラスミド pTEM12 上の T-DNA 領域以外の配列がワタゲノムに移入されていないことを確認するため、T-DNA 領域外配列をプローブとして同様にサザンブロット分析を行った。その結果、T-DNA 領域外配列は GHB119 ワタに移入されていないことが確認された (参考資料 6)。

295 更に、GHB119 ワタにおける T-DNA 領域の挿入箇所の近傍配列と宿主ワタ Coker312 の配列を比較した。その結果、挿入箇所の 8bp の欠損を除き、宿主ワタゲノムと一致していることが確認された (参考資料 7)。挿入箇所に内在性遺伝子が存在した可能性を、BLASTx によりデータベース (Dad, Genpept, Uniprot) に登録されている既知たん白質との相同性を確認した。その結果、
300 GHB119 ワタの挿入箇所を含めた近傍領域に既知たん白質と相同性を示す配列は確認されず、内在性遺伝子が存在した可能性は低いと考えられた (参考資料 8)。

(7) 安定性に関する事項

305 挿入遺伝子が複数の後代世代において安定して遺伝していることを確認するため、4 世代の GHB119 ワタを用いて、サザンブロット分析を行った。その結果、GHB119 ワタの挿入遺伝子が複数世代に安定して遺伝していることが確認された（参考資料 5、9）。

310 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

GHB119 の各生長期（4-6 葉期、開花期及び開花終了後）の各組織（葉、茎及び根(4-6 葉期及び開花期)、花粉、頂端、花蕾及び花(開花期)並びにさく(開花終了後))における改変 *bar* 遺伝子及び *cry2Ae* 遺伝子の発現を、それぞれの遺伝子の転写産物に対して相補的な RNA をプローブとして、ノーザンブロット分析により確認した。その結果、検出限界値以下であった花粉中の改変 *bar* 遺伝子を除き、全ての組織で導入遺伝子の発現が確認された（参考資料 10）。

315 次に、各組織（根、茎、葉、花蕾、頂端、さく、全地上部、花粉、蜜、花及び種子）、未加工種子（穀実、地毛外皮）、加工種子（脱地毛綿実、綿実油かす、加熱処理綿実油かす、種子外皮、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油）における改変 PAT たん白質及び Cry2Ae たん白質の発現量を、ELISA 分析により確認した。その結果、改変 PAT たん白質については、検出限界値を下回った粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油を除く全ての試料において発現が確認された。また、Cry2Ae たん白質については、検出限界又は定量限界値を下回った蜜、粗綿実油及び精製・脱色・脱臭綿実油を除く全ての試料において発現が確認された（参考資料 11、12、13）。

325 (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 pTEM12 の T-DNA 領域外には、ストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性 (*aadA*) 遺伝子及びネオマイシンリン酸基転移酵素 I (*nptII*) 遺伝子の断片 (*nptII*-fragment) が存在する。上記 (7) コピー数に関する事項に記載したとおり、これらの遺伝子が GHB119 ワタに挿入されていないことは、サザンブロット分析により確認されている（参考資料 6）。

335 (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

340 遺伝子導入により生じた、導入遺伝子とワタゲノムの境界領域（5'側及び 3'側）において新たなオープンリーディングフレーム（ORF）が作られた可能性をバイオインフォマティクス解析により確認した。ORF は、終止コドン（TAA、TAG 又は TGA）に挟まれ、3 アミノ酸以上の長さを持つ領域と定義し、GetORF（EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suite）を用い、6 つの読み枠（センス鎖 3 つ及びアンチセンス鎖 3 つの読み枠）で ORF を検索した。その結果、11 個の ORF が検出された（参考資料 8）。検出された 11 個の ORF のうち、8 アミノ酸以上の長さを持つ 10 個の ORF について、

345 BLASTP アルゴリズムを用い、データベース (Uniprot-Swissprot, Uniprot-
TrEMBL, DAD, PDB, GenPept) 中の既知の毒素たん白質との相同性検索を行
った。その結果、登録されているたん白質との間に相同性は認められなかつた
(参考資料 14)。よって、仮にこれらの ORF により新たなたん白質が作られ
たととしても、毒性を示す可能性は低いと考えられる。

350 次に、検出された 11 個の ORF の発現の可能性を確認するため、GHB119 ワ
タ及び非組換え体の各組織について、5'側境界領域及び 3'側境界領域の RNA プ
ローブを用いて、ノーザンブロット分析を行った (参考資料 10)。その結果、
いずれの組織においても新たな ORF による転写産物は認められなかつた。よつ
て、遺伝子導入により新たに作られた ORF からたん白質が生ずる可能性は低い
と考えられる。

355

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

GHB119 ワタは、改変 PAT たん白質により除草剤グルホシネート耐性を、
Cry2Ae たん白質によりチョウ目害虫抵抗性を付与されている。

360

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① 改変 PAT たん白質

365 改変 PAT たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用
い、データベース (Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PDB, DAD
及び GenPept) 中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行つ
た。また、BLOSUM62 を用い、類似性を評価した。その結果、改変 PAT
たん白質と既知の毒素たん白質との相同性は認められなかつた (参考資料
15)。

370

② Cry2Ae たん白質

375 Cry2Ae たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用
い、データベース (Uniprot_Swissprot, Uniprot_TrEMBL, PDB, DAD
及び GenPept) 中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行つ
た。また、BLOSUM62 を用い、類似性を評価した。その結果、Cry2Ae た
ん白質と既知の毒素たん白質との相同性は認められなかつた (参考資料
17)。

380 次に、マウスを用いた Cry2Ae たん白質の急性経口毒性試験(最大投与量
2000 mg/kg 生体重)を実施したところ、15 日の観察期間を通して Cry2Ae
たん白質の毒性影響は認められなかつた (添付資料 36)。なお、最大投与
量の 2000 mg/kg 生体重は、730 kg の肉牛(飼料摂取量約 14 kgDW/day)が
GHB119 ワタに由来する綿実(Cry2Ae たん白質含有量約 5.5 µg/g)のみを約
270 トン摂取することに相当する。このことから、実際の飼料摂取量が
2000 mg/kg 生体重を上回ることは考えにくい。したがって、Cry2Ae たん
白質がそれを飼料から摂取した家畜の健康に影響を及ぼすことはないと思

(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

試験には、*E. coli*で生産した改変 PAT たん白質及び *B. thuringiensis* で生産した Cry2Ae たん白質がそれぞれ用いられている。これらのたん白質及びワタ植物体内で発現している各たん白質については、a) 分子量 (SDS-PAGE)、b) 免疫反応性 (ウェスタンブロット分析)、c) 糖たん白質染色分析 (GlycoProfile™ III fluorescent kit; Sigma-Aldrich)、d) ペプチド分析 (LC/MS)、e) 活性 (改変 PAT: 比色定量, Cry2Ae: 生物検定)、f) N-末端配列の決定 (エドマン分解) により、同一性が確認されている (参考資料 19, 20)。

① 人工胃液に対する感受性

(7) 改変 PAT たん白質

改変 PAT たん白質の人工胃液 (pH 1.2、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 0.5 分以内に 90%以上が分解され、2 分以内に検出不可能な程度にまで分解されることが確認された (参考資料 21)。

(4) Cry2Ae たん白質

Cry2Ae たん白質の人工胃液 (pH 1.2、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 2 分以内に 90%以上が分解され、5 分以内に検出不可能な程度にまで分解されることが確認された (参考資料 22)。

② 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

(7) 改変 PAT たん白質

改変 PAT たん白質の人工腸液 (pH7.5、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。その結果、反応開始から 2 分以内に完全に分解されることが確認された (参考資料 23)。

(4) Cry2Ae たん白質

Cry2Ae たん白質の人工腸液 (pH 7.5、37°C) 中での消化性を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。その結果、人工腸液中で、60 分処理を行ってもほとんど分解されないことが確認された (参考資料 24)。

③ 加熱処理

(7) 改変 PAT たん白質

a. 熱処理による影響

改変 PAT たん白質の熱安定性 (60、75、90°Cでそれぞれ 10、30、60 分間処理) を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。その結果、90°Cで 60 分処理を行っても安定であった。また、

ウェスタンブロット分析の結果から、抗体との反応性に対する熱処理の影響も認められなかった（参考資料 25）。

b. 酵素活性に対する熱処理の影響

PAT たん白質の反応速度と温度（10℃～55℃）の関係を測定した。その結果、45℃まで酵素活性が増加し、45℃以上では増加は認められなかった。また、35℃以上の温度で 15 分間保温した後に酵素活性を測定すると、PAT たん白質の失活が認められた（Botterman *et al.*, 1991）。

以上のことから、改変 PAT たん白質は、熱に対し構造的には安定であるが、酵素活性は不安定であると考えられた。

(イ) Cry2Ae たん白質

a. 熱処理による影響

Cry2Ae たん白質の熱安定性（60、75、90℃でそれぞれ 10、30、60 分間処理）を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により確認した。SDS-PAGE 分析の結果、90℃・60 分処理により Cry2Ae たん白質を示すバンドは消失することが確認された。ウェスタンブロット分析の結果からも同様の結果が得られた。また、60℃・10 分以上の処理では Cry2Ae たん白質の移動度の低下が認められ、加熱処理による凝集が生じている可能性が考えられた（参考資料 26、27）。

b. 殺虫活性に対する熱処理の影響

Cry2Ae たん白質に熱処理（45℃及び 60℃、それぞれ 0、5、10、30、60、120、240 分及び一晩）を施し、これらの混入した餌を標的昆虫であるアメリカタバコガに与え、1 週間後の死亡率を測定して半数致死濃度（LC₅₀）を決定し、殺虫活性を評価した。その結果、Cry2Ae たん白質は 45℃では処理時間にかかわらず同程度の LC₅₀ 値を示した。60℃では処理時間が長くなるしたがって徐々に LC₅₀ 値が上昇し、240 分以上の処理により LC₅₀ 値は約 6 倍にとなった。これらの結果から、60℃処理により殺虫活性が低下することが確認された（参考資料 28）。

以上のことから、Cry2Ae たん白質は、60℃以上の熱に対し不安定であると考えられた。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 改変 PAT たん白質

PAT たん白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L-グルホシネートをアセチル化し、これを不活化する。PAT たん白質は非常に高い基質特異性を有し、L-グルホシネート以外に GHB119 ワタ中で基質となる物質は考えられず、ワタが持っている本来の代謝経路に影響を与える可能性は極めて低いと考えられる（Thompson, *et al.*, 1987; Droge *et al.*, 1992; Wehrmann *et al.*, 1996）。

② Cry2Ae たん白質

Cry2Ae たん白質については、*Bt* たん白質が酵素活性を持つという報告は

なく、また、宿主の代謝系から独立して機能するため、宿主の代謝系に影響し、新たに有害生理活性物質を産生するおそれはないと考えられる。

470 (5) 宿主との差異に関する事項

475 GHB119 ワタと従来ワタとの差異を評価するため、2007年及び2008年にスペインの16箇所のは場においてGHB119ワタ及び宿主品種Coker312を栽培した（GHBワタ区（グルホシネート処理区及び未処理区）及びCoker312区（グルホシネート未処理区）の3処理区を設置）。有毛種子の栄養成分及び有害生理活性物質の分析を行い、宿主品種Coker312及び商業栽培品種の文献値との比較を行った（FAO/WHO; 2001; 参考資料29、30、31）。

① 主要構成成分

480 水分、粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、中性デタージェント繊維及び酸性デタージェント繊維について分析を行った。その結果、GHB119ワタの分析値は、いずれも宿主品種Coker312の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

② 脂肪酸組成

485 脂肪酸（カプリン酸(C10:0)、ラウリン酸(C12:0)、ミリスチン酸(C14:0)、ペンタデカン酸(C15:0)、パルミチン酸(C16:0)、マルガリン酸(C17:0)、ステアリン酸(C18:0)、アラキジン酸(C20:0)、ベヘン酸(C22:0)、トリコサン酸(C23:0)、リグノセリン酸(C24:0)、パルミトオレイン酸(C16:1)、オレイン酸(C18:0)、エイコセン酸(C20:1)、リノール酸(C18:2)、トランスリノール酸(C18:2)及びアルファリノレン酸(C18:3))について分析を行った。その結果、GHB119ワタの分析値は、いずれも宿主品種Coker312の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

③ アミノ酸組成

495 アミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、シスチン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリン）について分析を行った。その結果、GHB119ワタの分析値は、いずれも宿主品種Coker312の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

④ 主要無機塩類及び総トコフェロール

505 主要無機塩類（カルシウム、リン、カリウム、マグネシウム、鉄及び亜鉛）及び総トコフェロールについて分析を行った。その結果、GHB119ワタの分析値は、いずれも宿主品種Coker312の分析値、又は、商業栽培品種の文献

値との間に差異は認められなかった。

⑤ 有害生理活性物質

510

ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸及びジヒドロステルクリン酸）について分析を行った。その結果、GHB119 ワタの分析値は、いずれも宿主品種 Coker312 の分析値、又は、商業栽培品種の文献値との間に差異は認められなかった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

515

生存及び増殖能力について、GHB119 ワタと非組換え品種との間に差異は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

520

生存及び増殖能力の制限要因について、GHB119 ワタと非組換え品種との間に相違はないと考えられた。

(8) 不活化法に関する事項

525

物理学的防除（耕耘）や化学的防除（グルホシネート以外の除草剤散布）など、ワタを枯死させる従来の方法によって GHB119 ワタは不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

530

米国において、米国食品医薬品庁（FDA）より 2011 年 8 月に GHB119 ワタと T304-40 ワタを掛け合わせた品種の食品・飼料としての安全性が確認された。
カナダにおいて、カナダ食品検査庁(CFIA)より 2012 年 1 月に GHB119 ワタと T304-40 ワタを掛け合わせた品種の飼料・環境としての安全性が確認された。
オーストラリア及びニュージーランドにおいて、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)より 2011 年 1 月に GHB119 ワタの食品としての安全性が確認された。

535

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

GHB119 ワタと従来のワタとの栽培方法の違いは、GHB119 ワタでは生育時期を問わず除草剤グルホシネートを使用することができ、チョウ害虫に対する殺虫剤の使用を軽減若しくは廃止することができる点である。それ以外の点は、従来の作出、育種及び栽培方法と相違はない。

540

GHB119 ワタには、除草剤グルホシネートが直接散布されるため、グルホシネート及びその主要代謝産物である N-アセチルグルホシネート及び 3-メチルホスフィニコ-プロピオン酸が残留することになる。同じく改変 *bar* 遺伝子を有する遺伝子組換えワタ「除草剤グルホシネート耐性ワタ LLCotton25 系統」の綿実におけるグルホシネート及びその代謝産物の残留値を測定した結果、最大総残留量は 3.4ppm であった（参考資料 32）。我が国において、綿実は飼料中にお

545

ける残留農薬の基準値の対象として設定されていない。食品としての綿実におけるグルホシネートの残留基準値はグルホシネート及びその代謝産物の総和として4ppm に設定されている（日本食品化学研究振興財団）。以上のことから、除草剤グルホシネート耐性ワタに残留するグルホシネート及びその代謝産物の量は、
550 飼料として問題となる量ではないと考えられた。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

GHB119 ワタにおける種子の製法及び管理方法については、既存のワタと相違はない。また、PCR 法により、GHB119 ワタを特異的に識別する方法を確立
555 している（参考資料 33）。

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。

560

IV 審議結果

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、同第3条第1項による確認を行って差し支えないと判断された。

565

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Amann, Mary M.; Eickhoff, Jane C. Identification of nutrients and antinutrients to analyze in cotton-derived foods for human and animal consumption. Environ. 1999, p.1-5, 41.
- 2 Abou-Donia, Mohamed B. "Gossypol". Toxicants of Plant Origin. Volume IV Phenolics Cheeke, Peter.R. ed., CRC Press, Inc., 1989, p.1-22.
- 3 Arnaut, Greta.; Boets, Annemie.; Vanneste, Stijin.; Van Rie, Jeroen.; Van Houdt, Sara. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. US2005/0216971A1
- 4 Bell, Alois A. "Physiology of secondary products". Cotton Physiology . Mauney, Jack R.; Steward, James McD. eds. The cotton foundation reference book series, 1986, p.597- 621.
- 5 Berardi, Leah C.; Goldblatt, Leo A. "Gossypol". Toxic constituents of plant foodstuffs 2nd ed. Liener, I. E. ed. Academic Press, 1980, p.183-237, ISBN 0-12-449960-0.
- 6 Berberich, Sharon A.; Ream, Joel E.; Jackson, Teri L.; Wood, Randall.; Stipanovic, Robert; Harvey, Patricia.; Patzer, Shari.; Fuchs, Roy L. The composition of insect-protected cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. Journal of agricultural and food chemistry. 1996, 44(1), p.365-371.
- 7 Bertrand, J A.; Sudduth, T Q.; Condon, A.; Jenkins, T C.; Calhoun, M C.

- Nutrient content of whole cottonseed. *Journal of Dairy Science*. 2005, 88(4), p.1470-1477.
- 8 Botterman, Johan.; Gossele, Veronique.; Thoen, Chris.; Lauwereys, Mark. Characterization of phosphinothricin acetyltransferase and C-terminal enzymatically active fusion proteins. *Gene*. 1991, (102), p.33-37.
 - 9 Broderick, Nichole A.; Raffa Kenneth F.; Handelsman, Jo. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *PNAS*. 2006, 103(41), p.15196 -15199.
 - 10 Calhoun, Millard C.; Kuhlmann, S.W.; Baldwin, B.C. Cotton Feed product composition and gossypol availability and toxicity. *Proceedings of the 2nd National Alternative Feeds Symposium*. 1995, p.125-145.
 - 11 De Almeida, Elionor R. P.; Gossele, Veronique.; Muller, Christianne G.; Dockx, Jan.; Reynaerts, Arlette.; Botterman, Johan.; Krebbers, Enno.; Timko, Michael P. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Mol. Gen.Genet*. 1989, 218, p.78-86.
 - 12 Deblaere, R.; Reynaerts, A.; Höfte, H.; Hernalsteens, J.-P.; Leemans, J.; Van Montagu, M. Vectors for cloning in plant cells. *Methods in Enzymology*. 1987, 153, p.277-292.
 - 13 Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H. M. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics*. 1982, 1(6), p.561-573.
 - 14 Droge, W.; Broer, I.; Puhler, A. Transgenic plants containing the phosphinothricin-*N*-acetyltransferase gene metabolize the herbicide *L*-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*. 1992, 187, p.142-151.
 - 15 FAO/WHO Food Standards. Named vegetable oils. *Codex Stan. 210, Codex Alimentarius*, 2001, 15p.
 - 16 Fryxell, Paul A. A redefinition of the tribe *Gossypieae*. *Bot.Gaz*. 1968, 129(4), p.296-308.
 - 17 Fryxell, Paul A.; Craven, Lyn A.; Stewart, J. McD. A revision of *Gossypium* sect. *Grandicalyx* (Malvaceae), including the description of six new species. *Systematic Botany*. 1992, 17(1), p.91-114.
 - 18 Gunstone, Frank D.; Harwood, John L.; Padley, Fred B. "Cyclic acids". *The Lipid Handbook*. 2nd ed., Chapman & Hall, 1994, p.13-14.
 - 19 Harpster, Mark H.; Townsend, Jeffrey A.; Jones, Jonathan, D.G.; Bedbrook, John.; Dunsmuir, Pamela. Relative strenghts of the 35S cauliflower mosaic virus, 1', 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics*. 1988, 212, p.182-190.
 - 20 ILSI.Crop composition database Search results, ver.3.0. ILSI Crop compositional

- database-search, 2007.
- 21 Knowles, Barbara H.; Dow, Julian A.T. The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 1993, 15(7), p.469-476.
 - 22 Lundquist, Richard.; Current uses of traditional γ -products. *Dairy nutrition consultant*. 1995, p.656-665.
 - 23 Munro, John .M. "Disease" Cotton. 2nd ed, Longman Scientific & Technical, 1987, p.210-230.
 - 24 National Cottonseed Products Association (NCPA) . Cottonseed and its Products. CSIP 10th Edition Digital ed., 1999.
 - 25 Nida, Debbie L.; Patzer, Shari.; Harvey, Patricia.; Stipanovic, Robert.; Randall,.; Fuchs, Roy L. Glyphosate-tolerant cotton: The composition of the cottonseed is equivalent to that of conventional cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 1996, 44(7), p.1967-1974.
 - 26 Niles, G. A.; Feaster, C. V. "Breeding". *Cotton*. Agronomy No.24. Kohel, R. J.; Lewis C. F. eds. American Society of Agronomy, 1984, p.201-231.
 - 27 Odell, Joan T.; Nagy, Ferenc.; Chua, Nam-Hai. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*. 1985, 313(28), p.810-812.
 - 28 OECD. 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, 2004.
 - 29 OECD. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control protein. ENV/JM/MONO(2007)14, 2007.
 - 30 OECD. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33, 2008.
 - 31 Sanfaçon, Helene.; Brodmann, Peter.; Hohn, Thomas. A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes and Development*. 1991, 5, p.141-149.
 - 32 Thompson, Charles J.; Movva, N. Rao. ; Tizard, Richard.; Crameri, Reto.; Davies, Julian E.; Lauwereys, Marc.; Botterman, Johan. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* . 1987, 6(9), p.2519-2523.
 - 33 USCA.United states-Canadian tables of feed composition. 3rd revision. National academy press, 1982, 42p.
 - 34 Verdaguer, Bertrand.; De Kochko, Alexandre.; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1996, 31, 1129-1139.
 - 35 Wendel, Jonathan F.; Cronn, Richard C. Polyploidy and the evolutionary history

- of cotton. *Advances in Agronomy*. 2003, 78, p.139-186.
- 36 Wehrmann, Axel.; Van Vliet, Adri.; Opsomer, Chris.; Botterman, Johan.; Schulz, Arno. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 1996, 14, p.1274-1278.
- 37 唐澤豊. “飼料資源”. 動物の飼料. 文永堂出版, 2004, p.78.
- 38 新谷勲. “食用植物油脂のけん化物”. 食品油脂の科学. 幸書房, 1989, p.31-32.
- 39 田先威和夫. “飼料と配合・給与”. 新編 畜産大事典. 養賢堂, 1996, p.977.
- 40 日本食品化学研究振興財団. 農薬等の基準値“グルホシネート”, <http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/search.html> (accessed 2009-11-19)
- 41 原田重雄. “繊維料” 工芸作物学. 栗原浩編. 農文社, 1987, p.26-42.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 M.Lecleir, 2007 : Origin of vector pTEM2 and map of the parent vector (ベクター pTEM2 の起源及びその親となるベクターのマップ)
- 2 M.Lecleir, 2007 : Description of vector pTEM12 (ベクターpTEM12 の解説)
- 3 K.Hendrickx *et al*, 2010 : Cry2Ae description and characterization (Cry2Ae の説明及び特徴)
- 4 S.Verhaeghe and V.Habex, 2008 : Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (*Gossypium hirsutum* の組換え体 GHB119 系統に挿入された全 DNA 塩基配列及び組み込み部位)
- 5 V.Habex and S.Verhaeghe, 2008 : Detailed insert characterization of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 by Southern blot analysis (サザンブロット分析による *Gossypium hirsutum* の組換え体 GHB119 系統の挿入部位の詳細な解析)
- 6 S.Moens, 2008 : Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (*Gossypium hirsutum* の組換え体 GHB119 においてベクター由来の配列が存在するかの確認)
- 7 S.Moens, 2009 : Determination of additional flanking sequences and the corresponding pre-insertion locus of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (*Gossypium hirsutum* 組換え体 GHB119 系統の近傍配列の決定と挿入前遺伝子座との対応)
- 8 S.Moens, 2009 : Bioinformatics analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 (*Gossypium hirsutum* 組換え体 GHB119 系統のバイオインフォマティクス解析)
- 9 S.Verhaeghe and I.Criel, 2008 : Structural stability analysis of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments (異なる世代、異なる遺伝的背景、異なる環境で栽培した *Gossypium hirsutum* の組換え体 GHB119 系統の構造的安定性の解析)
- 10 S.Moens, 2010 : Full expression analysis of the trait genes and newly created ORFs of cotton event GHB119 (GHB119 系統の形質遺伝子及び新しく作られた ORF における全発現分析)
- 11 T.Currier, 2010 : Protein expression analysis of cotton event GHB119, expressing

- Cry2Ae and Pat/*bar* proteins, USA, 2007 (Cry2Ae、Pat/*bar*たん白質を発現した GHB119 ワタにおけるたん白質の発現分析)
- 12 A.Matone, 2010 : Analyses of raw agricultural commodity (fuzzy seed)of Cry2Ae cotton event GHB119 for PAT/*bar* and Cry2Ae and its non-transgenic counterpart for PAT/*bar* and Cry2Ae proteins. (Cry2Ae ワタ GHB119 と非組換え体の未加工農産物 (有毛種子) の PAT/*bar* 及び Cry2Ae たん白質の分析)
 - 13 S.J.W.Mackie, 2009 : Analysis of processed commodities from transgenic event GHB119 cotton for Cry2Ae and PAT/*bar* Protein. USA. 2009 (USA、2009 年における組換えワタ GHB119 系統から得た加工農産物における Cry2Ae 及び PAT/*bar* たん白質の分析)
 - 14 A.Capt, 2009 : Cotton transformation event GHB119 : *In silico* analysis of additional putative Open Reading Frame (ORF) sequences for identifying potential homologies to known toxins and allergens (ワタ組換え体 GHB119 : 追加の推定オープンリーディングフレームにおける既知毒素たん白及びアレルゲンとの相同性の有無を確認するための *In silico* 分析)
 - 15 A.Capt, 2009 : PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known toxins (PAT/*bar*たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
 - 16 A.Capt, 2009 : PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known allergens (PAT/*bar*たん白質におけるアミノ酸配列の既知アレルゲンとの相同性検索)
 - 17 A.Capt, 2009 : Cry2Ae protein amino acid sequence homology search with known toxins (Cry2Ae たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
 - 18 A.Capt, 2009 : Cry2Ae protein amino acid sequence homology search with known allergens (Cry2Ae たん白質におけるアミノ酸配列の既知アレルゲンとの相同性検索)
 - 19 A.Martone, 2008 : Structural and functional equivalence of Cry1Ab, Cry2Ae and PAT/*bar* proteins produced in *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) and *Escherichia coli* to Cry1Ab,Cry2Ae and PAT/*bar* in TwiinLink™ cotton *Gossypium hirsutum*, USA, 2007 (*Bacillus thuringiensis* 及び *Escherichia coli* で作られた Cry1Ab,Cry2Ae, PAT/*bar*たん白質と、TwinLink™ワタで作られた Cry1Ab,Cry2Ae, PAT/*bar*たん白質の構造的、機能的同等性)
 - 20 A.Martone, 2010 : Structural and functional equivalence of batch NB170907 Cry2Ae protein to batch NB210806P25 Cry2Ae protein (NB170907Cry2Ae たん白質と NB210806P25Cry2Ae たん白質の構造的、機能的同等性)
 - 21 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/ *bar* protein *in vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid (PAT/*bar*たん白質 人工胃液における消化性試験)
 - 22 J.B.Rasclé, 2009 : Cry2Ae protein *in vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid (Cry2Ae たん白質 人工胃液における消化性試験)
 - 23 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/ *bar* protein *in vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (PAT/*bar*たん白質 人工腸液における消化性試験)
 - 24 D.Rouquie, 2008 : Cry2Ae protein *in vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (Cry2Ae たん白質 人工腸液における消化性試験)
 - 25 J.B.Rasclé, 2009 : PAT/ *bar* protein heat stability study (PAT/*bar*たん白質 熱安定

- 性試験)
- 26 D.Rouquie, 2008 : Cry2Ae protein: heat stability study (Cry2Ae たん白質 熱安定性試験)
 - 27 A.Capt, 2010 : Position paper-Heat stability study with the Cry2Ae protein (Positionpaper-Cry2Ae たん白質の熱安定性試験)
 - 28 K.Hendrickx, 2009 : Heat stability of the Cry1Ab and Cry2Ae protein Bioassay data (Cry1Ab、Cry2Ae たん白質の熱安定性 バイオアッセイデータ)
 - 29 R.Oberdorfer, 2010 : Nutritional impact assessment report for the insect-resistant cotton (transformation eventGHB119) (害虫抵抗性ワタ (GHB119) における栄養影響評価)
 - 30 V.Rattemeyer-Matschurat, 2009 : Analysis of substantial equivalence of transgenic and non-transgenic cotton (組換えワタと非組換えワタの統計学的同源性解析)
 - 31 R.Oberdorfer, 2010 : General information for the nutritional impact assessment of GM cotton traits (GM ワタの栄養影響評価における一般情報)
 - 32 A. Scott and M.Freyssinet, 2004 : Glufosinate-ammonium residues in/on commodities of Liberty herbicide-tolerant cotton (Liberty 耐性ワタ産物におけるグルホシネートアンモニウムの残留試験)
 - 33 S.Haelterman, 2006 : Real-Time PCR (GHB119 の識別方法)
 - 34 A.Capt, 2011 : Position paper-Cry2Ae protein_Composition with other Cry2A proteinswith no acute oral toxicity potential (Position paper Cry2Ae たん白質と他のCry2A たん白質の比較と経口投与による非急性毒性の可能性)
 - 35 A.E.Chalmers, 2008 : Summary of non-target organism testing and assessment of Riskof *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119 expressing Cry2Ae protein (Cry2Ae たん白質を発現した組換えワタ GHB119 系統における、非標的生物を用いた試験及びリスクアセスメントの要約)
 - 36 D.Rouguie. 2006 : GEM2 protein Acute toxicity by oral gavage in mice (マウスを用いた GEM2 たん白質の経口投与急性毒性試験)
 - 37 A.Martone, 2011 : Analyses of Raw Agricultural Commodity (Fuzzy Seed) of GHB119Cotton from Andalusia for Cry2Ae and PAT/*bar* Proteins (Andulsia における GHB119 系統の未加工農産物 (有毛種子) の Cry2Ae たん白質及び PAT たん白質の分析)
 - 38 D.Schouppe, 2011 : Literature survey on enzymatic activity of Cry proteins (Cry たん白質の酵素活性に関する文献調査)