

チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.）
 (COT102, OECD UI: SYN-IR102-7) の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	2
第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	2
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	2
(2) 使用等の歴史及び現状	2
(3) 生理学的及び生態学的特性	4
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	10
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	11
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性	13
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	13
3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報	15
(1) 使用等の内容	15
(2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置	15
(3) 国外における使用等に関する情報	16
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価	17
1. 競合における優位性	17
2. 有害物質の産生性	18
3. 交雑性	19
4. その他の性質	19
第3 生物多様性影響の総合的評価	20
引用文献	22
緊急措置計画書	23

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 5 月 29 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿
環境大臣 鴨下 一郎 殿

氏名 シンジェンタシード株式会社
申請者 代表取締役社長 大伴 秀郎
住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第 4 条第 2 項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 <i>vip3A</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.）（COT102, OECD UI: SYN-IR102-7）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名：ワタ

英名：cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

② 宿主の品種又は系統名

宿主はアオイ科ワタ属に属する4倍体栽培ワタ (*G. hirsutum*) の品種 Coker312 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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種が知られているが、栽培種は2倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* と *G. arboreum* 並びに4倍体種 ($2n=52$) の *G. hirsutum* と *G. barbadense* の4種のみである。今日、栽培されているワタの約91%かそれ以上は *G. hirsutum* 種と考えられている (文献 1)。

ワタ属植物種を自然環境における分布範囲で分類すると、2倍体種はオーストラリア群 (主にオーストラリア北西部に分布)、アフリカ・アラビア群 (主にアフリカからアラビア半島に分布) 及びアメリカ群 (主にメキシコ西部からペルー及びガラパゴス諸島に分布) の3グループに分類される。また、4倍体種は、*G. hirsutum* が中央アメリカ沿岸、*G. barbadense* がペルー及びエクアドル沿岸、*G. tomentosum* がハワイ諸島、*G. mustelinum* がブラジル及び *G. darwinii* がガラパゴス諸島に主に分布している (文献 2、文献 3、文献 4)。我が国におけるワタ属植物種の自生は報告されていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

メキシコの紀元前 5800 年ごろの洞窟から、4 倍体の *G. hirsutum* のさく（果実）が発掘されたといわれており、ワタの栽培利用の歴史は極めて古い。インドは紀元前数百年ごろからワタの生産国として有名であった。ここで作出された *G. arboreum* は、北インドから東は東南アジアに広がり、また、西はアラビアを経て西アフリカに及んだ。中国ではワタは 11 世紀以来主要畑作物の一つになっている。新大陸では紀元前から 4 倍体の *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* が栽培されていた。この当時のワタは永年性の灌木であったが、永年性の *G. barbadense* は各地に広がって 1 年生の種類を生じ、南カロライナの沿岸地帯と島嶼部では今日の世界最長繊維種の「海島綿」となり、さらにこれがエジプトに入って現地の改良種と交雑の結果、長繊維種の「エジプト綿」を生じている。また、中南米で栽培された *G. hirsutum* は 1700 年頃アメリカ合衆国に入り、内陸部で「陸地綿」と呼ばれる 1 年生の早生種が栽培されてアメリカ合衆国の主要作物となったが、南北戦争のためその供給が絶たれたのを機に、世界の熱帯・亜熱帯の諸国に広がった（文献 5）。

日本に初めてワタ作が伝えられたのは 799 年（延暦 18 年）で、三河国に漂着したインド人が、ワタを伝えたことが記録に残っているが、このワタはすぐに消滅したようである。その後、文祿年間（1592～1595）にワタの種子が九州に再び伝えられ、ワタ作は関東以南に広がり明治 15～20 年ごろには 10 万ヘクタール、2 万 4,000 トンの生産をみるにいたったものの、輸入におされて次第に衰微した。第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったが、現在ではわずかに園芸的に観賞用として栽培されるのみである（文献 5）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2006 年におけるワタの世界総栽培面積は約 3,500 万ヘクタールで、インドが約 890 万ヘクタール(25%)、米国が約 560 万ヘクタール(16%)、中国が約 540 万ヘクタール(15%)、パキスタンが約 310 万ヘクタール(9%)であった(文献 6)。ワタの生産量は 2,658 万トンで、世界生産の約 29%を中国が占めており、次いでインド、米国、パキスタンである。ワタの輸出量については、アメリカ、インド、ウズベキスタン、オーストラリアの順である。一方、ワタの輸入量は、中国、トルコ、バングラデシュ、パキスタンの順である(文献 7)。日本における 2007 年の採油用のワタの輸入量は約 14 万 4,000 トンであり、米国（約 10 万トン）やオーストラリア（約 4 万 1,000 トン）から輸入されている（文献 8）。

ワタの生産は国によって原始的農耕が行われているところもあるが、主要な生産国

では高度に機械化されている。すなわち、開発途上国では人手による播種及び除草、手摘みによる収穫が行われているのに対して、先進国では、機械による播種、除草剤及び除草機による除草、摘み取り機による収穫が行われている（文献 9）。

ワタの綿毛には約 94%のセルロースが含まれており、その大部分が紡織用（綿糸、綿織物等）あるいは製綿用（ふとん綿、脱脂綿等）に利用される。地毛は短いため繊維として利用されず、セルロースや紙の原料とされる。種子は 18~24%の油脂と 16~20%の蛋白質を含んでおり、油脂から綿実油が生産される（文献 10、文献 11）。綿実油は、食用油の他マーガリンや石鹼の原料等として用いられており、搾油後の綿実粕は精製して飼料や肥料として用いられる（文献 5）。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

ワタは灌木状で高さ 1~2.5 m である。葉柄の先の葉身は、通常 3~5 裂に深裂した掌状をしている。主茎からは結果枝と発育枝が生じ、発育枝からはさらに結果枝が生じ、結果枝には花が形成される。花芽は 3 枚のほう葉に包まれている。開花は下位の枝から始まり、1 個体の花が咲き終わるのに 1~2 ヶ月を要する。果実であるさくは、直径数 cm であり、内部が 3~5 室に分かれ、各室に 6~9 個の種子ができる。さくの色は緑~暗緑色であり、その後茶色く成熟すると縦に割れて開く（文献 11）。

ロ、生息又は生育可能な環境の条件

ワタは熱帯原産であり、高温・多照で、開じょ期に乾燥するところが望ましい（文献 10）。発芽の最低温度は 12℃であり、通常、年降雨量 1,000~1,500 mm 程度の場所で栽培されるが、灌漑ができれば降雨は少ないほうがよい（文献 5）。ほぼ北緯 40 度から南緯 35 度の間の熱帯から温帯にかけて栽培される（文献 11）。

ワタは酸性に弱い、アルカリに対する適応性が高い。塩分に対しては作物の中で耐性が高く、塩分の多いアルカリ性土壌でも栽培できる（文献 11）。

ハ、繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ワタのさくは成熟するにつれて水分が減り、さく皮が裂けて開じょする（文献 10、文献 11）。種子の表面は、種子の表皮細胞が外部に突出、伸長してできた綿毛に覆わ

れていることから（文献 5）、脱粒性及び自然環境下で種子が散布される可能性は低いと考えられる。休眠性は浅く、土壤中で温度や湿度等の条件が揃えば発芽する（文献 12）。ワタの種子は湿度の影響を非常に受けやすく、高湿度条件下で保存されたワタの種子の寿命は短い（文献 13）。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

ワタは種子によって繁殖し、栄養繁殖による植物体の再生は自然条件下ではおこらない（文献 12）。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

ワタは基本的に自家受粉を行うが、マルハナバチやミツバチ等の花粉媒介昆虫によって他家受粉が生ずる場合もある（文献 14）。近縁種との交雑の可能性は、染色体数、媒介昆虫の有無、開花期の同時性、植物間の距離等に依存する（文献 15）が、我が国においては交雑可能な近縁野生種は報告されていない。また、アポミクシスについての報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタは一花当たり 45,000 を超える花粉粒を生産する（文献 16）。ワタの花粉は他の花粉と比べて重く、粘性が高いため、自然条件下で風に運ばれることはほとんどない。花粉の飛散距離に関してはこれまでにいくつかの報告があるものの、いずれの報告においても 16 メートル以上離れた植物体間での交雑は認められていないことから（文献 12、文献 15）、花粉の飛散距離は短いと考えられる。なお、マルハナバチやミツバチ等の昆虫によって花粉が媒介されることはある。ワタの花粉の寿命は約 12 時間である（文献 17）。

ニ、有害物質の産生性

ワタにおいて、他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ホ、その他の情報

ワタにはゴシポールとシクロプロペン脂肪酸が含まれている（文献 18）。

ゴシポールは腺組織（ピグメントグランド）に存在するテルペノイドである。ゴシポールには遊離型と結合型があるが、遊離型は非反芻動物に対する毒性及び雄の抗受精特性を有する（文献 18）。綿実粕は、綿実中の遊離ゴシポールが搾油工程で蛋白質と結合かつ不溶化して著しく減少し、無害な結合型に変化するために飼料として使用できる。綿実油中の遊離ゴシポールは精製工程で結合型となり、各工程で取り除かれる（文献 19）。

また、綿実油にはシクロプロペン環を有する脂肪酸（ステルクル酸やマルバリン酸）が存在することが知られており、綿実原油中での含量は1%前後である（文献 19）。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ため、鶏卵の脱色や、ふ化率の低下を引き起こす（文献 18）。シクロプロペン脂肪酸は綿実油の精製工程を経るにしたがって著しく減少し、特に活性白土による脱色及び脱臭工程で取り除かれる。また、水素添加反応によってもその特性を失う（文献 19）。

ワタは種子が多量の綿毛に覆われているため、鳥類のような種子を捕食する動物は好まず、哺乳類もゴシポールが含まれていることや種子の形態により、捕食することを避けると思われる。さらに、野生の哺乳動物が綿実を捕食するという例も知られていない。

2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ、構成及び構成要素の由来

チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変*vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.）（COT102, OECD UI: SYN-IR102-7）（以下、「本組換え体」と記す。）の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来は表1に示すとおりである。

表 1 本組換え体作出に用いた供与核酸 pCOT1 の構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
害虫抵抗性遺伝子カセット		
Act2 プロモーター	1,408	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のアクチン遺伝子 (actin-2 遺伝子) の第 1 エクソン及びイントロンを含むプロモーター領域（文献 20）。目的遺伝子（改変 <i>vip3A</i> 遺伝子）を恒常的に発現させる。

改変 <i>vip3A</i> 遺伝子	2,370	一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である <i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88 由来の <i>vip3A</i> 遺伝子 (文献 21) を、植物における発現に適したコドン (文献 22) に改変した遺伝子。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す改変 <i>Vip3A</i> 蛋白質をコードする。改変 <i>Vip3A</i> 蛋白質では、そのアミノ酸配列の 284 番目のアミノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアダニル化により、mRNA の転写を終結させる (文献 23)。
形質転換体選抜マーカー遺伝子カセット		
<i>Ubp3</i> プロモーター	1,721	<i>A. thaliana</i> 由来のポリユビキチン遺伝子 (<i>ubi3</i>) の第 1 イントロンを含むプロモーター領域 (文献 24)。目的遺伝子 (<i>aph4</i>) を恒常的に発現させる。
<i>aph4</i> 遺伝子	1,026	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来のリン酸基転移酵素 (ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素) 遺伝子。ハイグロマイシンといくつかの類縁アミノグリコシドをリン酸化することから (文献 25)、ハイグロマイシン耐性を付与する。本組換え体作出の際の形質転換細胞の選抜マーカー。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列 (文献 23)。ポリアダニル化により、mRNA の転写を終結させる。
その他の領域 (=外骨格領域)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA レフトボーダー領域 (文献 26)。
<i>spec</i>	789	<i>E. coli</i> 由来のトランスポゾン Tn7 のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 (<i>aadA</i>) (文献 27)。エリスロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与するため、ベクターの選抜マーカーとして用いた。
<i>repA</i>	1,074	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミド pVS1 由来のレプリコン (DNA の複製を制御する最小機能複製単位) 領域。 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子 (文献 28)。
VS1 ori	405	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミド pVS1 の複製起点共通配列。 <i>A. tumefaciens</i> における複製起点となる (文献 29)。
ColE1 ori	807	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点 (文献 30)。

RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti-プラスミドの T-DNA ライトボーダー領域 (文献 31)。
----	----	--

ロ、構成要素の機能

- ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカー、その他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換え体作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を表 1 に示した。

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性 (食品としてのアレルギー性を除く。) を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

改変 Vip3A 蛋白質

Bacillus thuringiensis 由来で殺虫活性を示す Cry 蛋白質は、*B. thuringiensis* の芽胞形成期に産生されて細胞内に内在するのに対し、本組換え体において発現する改変 Vip3A 蛋白質が属する Vip 蛋白質は、*B. thuringiensis* の栄養成長期に産生されて細胞外に分泌される殺虫活性蛋白質 (Vegetative Insecticidal Protein) として見出された (文献 21)。このような Vip 蛋白質には、これまでに Vip1、Vip2 及び Vip3 蛋白質が知られており、*Bacillus thuringiensis* nomenclature committee (*Bacillus thuringiensis* 分類委員会) により 3 群、7 節に分類されている。なお、Vip1 及び Vip2 蛋白質はコウチュウ目昆虫に対して殺虫活性を示し、Vip3 蛋白質はチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。

Vip3A 蛋白質の全長は 88kDa であるが、標的チョウ目昆虫の幼虫に摂取されると消化管内で部分消化され、62kDa のコア蛋白質になる。このコア蛋白質が標的昆虫の腸管上皮細胞の受容体に結合し、イオンバランスを乱して腸管上皮細胞を破壊し、その結果、消化プロセスが阻害されて殺虫活性を示すことが示唆されている (文献 32、文献 33)。この作用機作は Cry 蛋白質と同様である。また、Lee ら (文献 33) は、Vip3A 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質が互いに競合せずに中腸上皮刷子縁膜小胞 (brush border membrane vesicles ; BBMV) へ結合することを報告しており、さらに、感受性チョウ目昆虫種であるタバコホーンワーム (タバコスズメガ) (*Manduca sexta*) の BBMV において、Cry1Ab 蛋白質の受容体として知られるアミノペプチダーゼ様及びカドヘリン様分子に、Vip3A 蛋白質が結合しないことも明らかにした (文献 33)。以上のように、Vip3A 蛋白質の作用機作は Cry 蛋白質と同様と考えられるものの、Vip3A 蛋白質と Cry1Ab 蛋白質では受容体が異なることが示されている (文献 33)。

Vip3A 蛋白質は、米国のワタ栽培で発生するチョウ目害虫であるコットンボールワーム（アメリカタバコガ）（*Helicoverpa armigera*）、タバコバッドワーム（ニセアメリカタバコガ）（*Heliothis virescens*）等に殺虫活性を示すことが確認されている。一方、ワタの花粉を媒介することがあるミツバチ（*Apis mellifera*）、さらに、Cry1Ab 蛋白質が殺虫活性を示すチョウ目昆虫のヨーロッパコーンボラー（アワノメイガ）（*Ostrinia nubilalis*）や、オオカバマダラ（*Danaus plexippus*）に対しては殺虫活性を示さないことが確認されている。

また、改変 Vip3A 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒素と有意な相同性を持たないことを、公的に利用可能な蛋白質データベース（SWISS-PROT、FARRP 等）を用いた相同性検索によって確認した。

APH4蛋白質

aph4 遺伝子は *E. coli* 由来で、ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素である APH4 蛋白質をコードしている。APH4 蛋白質はハイグロマイシンをリン酸化して無毒化するため、この蛋白質を有する細胞はハイグロマイシン耐性を示すことから（文献 34）、遺伝子が導入された細胞を選抜するマーカーとして利用した。APH4 蛋白質は基質特異性が高く、アミノグリコシド系抗生物質のハイグロマイシン B、ハイグロマイシン B2、さらに構造が類似したデストマイシン A、デストマイシン B をリン酸化することが知られているが、他のアミノシクリトール系やアミノグリコシド系の抗生物質（ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン、アミカシン等）はリン酸化しない（文献 34、文献 35）。

APH4 蛋白質の安全性に関し、本蛋白質は米国環境保護庁（EPA）により残留基準値の設定の免除が認められている（文献 36）。

また、本蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒素と相同性をもたないことを、公的に利用可能な蛋白質データベース（SWISS-PROT、FARRP 等）を用いた相同性検索によって確認した。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変 *vip3A* 遺伝子によって発現する改変 Vip3A 蛋白質が酵素活性を持つという報告はなく、よって宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられる。また、*aph4* 遺伝子によって発現する APH4 蛋白質は、ハイグロマイシン B と一部の類縁アミノグリコシ

ド系抗生物質をリン酸化する酵素であるが、極めて基質特異性が高く、植物体中に基質となり得る物質が存在することは知られていないことから（文献 38）、植物の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

以上のことから、導入された遺伝子が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

本組換え体の作出に用いたベクターは、ベクターpCOT1である。このベクターは *E.coli*由来のpBluescript II SK(+)を基に構築された。

ロ、特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクターpCOT1の塩基数は11,801 bpであり、その塩基配列は明らかにされている。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

ベクターpCOT1には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、スペクチノマイシン耐性を発現する *spec* 遺伝子が含まれているが、本組換え体中にこれらの遺伝子は導入されていない。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

ベクター中に感染性を示すような配列はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換え体の作出に用いたベクターpCOT1の T-DNA 領域である RB と LB の間の 2 つの遺伝子発現カセット（改変 *vip3A* 遺伝子カセット及び *aph4* 遺伝子カセット）が宿主に移入される。

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法によって、ベクターpCOT1のT-DNA領域をワタの胚軸組織に導入した。

ハ、遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

抗生物質ハイグロマイシンを含む培地で培養することにより、APH4 蛋白質を発現する細胞を選抜した。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

形質転換細胞の選抜培養培地に抗生物質セフトキシシンを添加して、形質転換に用いたアグロバクテリウムを除菌した。その後、セフトキシシンを含まない培地で培養し、菌体の残存の無いことを確認した。

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過及び系統樹

遺伝子導入後に選抜した細胞から植物体を再分化、馴化した後、温室で栽培した。その後、植物体を TaqMan PCR で分析することで、改変 *vip3A* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の存在が確認された植物体を選抜し、自殖あるいは優良ワタ品種との戻し交配を行い、後代を育成した。これら後代を用いて生物多様性影響評価に必要な情報を収集した。

なお、本組換え体については、2007年5月に農林水産省及び環境省によって、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、第一種使用等（隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為）が承認された。また、食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に、順次行う予定である。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

本組換え体の挿入遺伝子はメンデルの法則に従い、複数世代に渡って伝達されることから、染色体上に存在すると考えられる。

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

本組換え体の複数世代から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理により切断し、ベクターpCOT1 の T-DNA 領域及び外骨格領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った。その結果、ベクターpCOT1 の T-DNA 領域をプローブに用いた場合、複数世代で 1 コピーの T-DNA が挿入されたことを示唆する同一のバンドが検出された。そのため、複数世代に渡り 1 コピーの改変 *vip3A* 遺伝子カセット及び *aph4* 遺伝子カセットが安定して伝達されていることが示され、各世代における挿入遺伝子の同一性が確認された。

ベクターpCOT1 の外骨格領域をプローブに用いた場合、いずれの世代においてもバンドは検出されなかった。

以上の結果から、本組換え体には1コピーのベクターpCOT1のT-DNA領域がゲノムの1ヶ所に挿入されており、後代へ安定して伝達していることが確認された。

③ (6) の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

2001年に米国の3ヶ所のほ場で本組換え体をそれぞれ栽培し、生育ステージに応じて各組織別にサンプルを採取し、改変 *Vip3A* 蛋白質及び *APH4* 蛋白質の発現量を ELISA 法により測定した。なお、花粉及び蜜は、温室栽培した植物体より採取した材料を用いた。その結果、改変 *Vip3A* 蛋白質は葉、根、蕾、さく、花粉、種子で検出されたが、綿毛と蜜では検出されなかった。また、2006年に米国シンジェンタ社の温室において栽培した3世代の本組換え体から葉を採取して ELISA 法により改変 *Vip3A* 蛋白質の平均発現量を調査した結果、安定的に発現していることが確認された。*APH4* 蛋白質については、発現量は定量限界値以下であったものの、いずれの世代においても発現が認められた。

以上のことから、本組換え体における改変 *Vip3A* 蛋白質及び *APH4* 蛋白質は、個体間及び世代間で安定的に発現していることが確認された。

- ④ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度
移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換え体の目的遺伝子の存在は、ゲノム DNA を制限酵素で切断後、改変 *vip3A* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析の結果より確認できる。また、挿入遺伝子の塩基配列及びその近傍ゲノムの塩基配列に基づいた本組換え体の特異的検出法を開発している。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- ① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本組換え体に付与された特性は、改変 *vip3A* 遺伝子によって発現する改変 **Vip3A** 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性と、*aph4* 遺伝子によって発現する **APH4** 蛋白質による選抜マーカー特性である。改変 **Vip3A** 蛋白質を発現する本組換え体は、米国のワタ栽培で発生する主要なチョウ目害虫であるコットンボールワーム（アメリカタバコガ）（*Helicoverpa armigera*）、タバコバッドワーム（ニセアメリカタバコガ）（*Heliothis virescens*）等に対して抵抗性を示す。

- ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

本組換え体とその対照となる非組換え体を使用し、シンジェンタ ジャパン株式会社 研究部 中央研究所 神座サイトにて、平成 19 年に隔離ほ場試験を実施した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽経過、発芽率、開花日、花の形状及び花弁色、葉長及び葉幅、さくの長さ及び幅、開じょ期（第 1 さくの開じょ期）、繊維色、収穫期（株の勢いが衰え、落葉が確認された日）、草丈、節数、着蕾数、総分枝数、1 株当たりの収穫さく数、1 株当たりの総さく数、1 さく当たりの室数、1 さく当たりの種子数、種子の色及び形状、1 さく当たりの新鮮重、並びに、収穫期の地上部重及び地下部重について調査を行った。なお、発芽率、葉長及び葉幅、さくの長さ及び幅、草

丈、節数、着蕾数、総分枝数、1株当たりの収穫さく数、1株当たりの総さく数、1さく当たりの種子数、1さく当たりの新鮮重並びに収穫期の地上部重および地下部重については統計処理を行った。その結果、すべての調査項目において、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差や相違は認められなかった。

b 生育初期における低温又は高温耐性

1 葉期の本組換え体と対照の非組換え体の幼苗を、冬季を想定した低温条件下で栽培し、その低温ストレスによる障害程度を比較した。その結果、本組換え体と非組換え体とも完全に枯死し、その枯死程度に両者間で相違は見られなかった。

c 成体の越冬性

隔離ほ場試験において、ほ場で栽培した本組換え体と対照の非組換え体の植物体は冬季の低温及び降霜で落葉・枯死した。以上のことから、本組換え体と対照の非組換え体の成体の越冬性に相違はないと判断した。

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換え体と対照の非組換え体から花粉を採取し、稔性率、形状及びサイズを顕微鏡下で比較観察した。その結果、アセトカーミン溶液染色による花粉稔性率に、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差は認められなかった。また、花粉の形状はともに円形で、その直径に両者間で有意差は認められなかった。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量について、1株当たりの総さく数及びさく当たりの種子数の調査を行ったが、本組換え体と非組換え体間で有意差は認められなかった。

脱粒性について、収穫時に開じょしたさくから自然に脱粒した種子の有無及び脱粒数を調査したが、本組換え体、対照の非組換え体とも脱粒した種子は観察されず、脱粒性に相違は見られなかった。

発芽率については、本組換え体と対照の非組換え体の種子の発芽率はいずれも97%以上で有意差は認められなかった。

ワタの種子は一般的には休眠性が浅いことが知られており（文献12）、休眠性について試験は行っていない。

f 交雑率

我が国には、本組換え体が属する4倍体栽培ワタ (*Gossypium hirsutum*) と交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

本組換え体の有害物質産生性に関して、隔離ほ場において以下のような評価試験を実施した。

鋤込み試験：

各植物体の地上部（葉及び茎）を収穫し、乾燥、粉末化した後に、土壌と混和し、検定植物としてハツカダイコンを播種し、栽培を行った。発芽率と乾燥重を測定した結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった。

後作試験：

植物体栽培後の各土壌に検定植物としてハツカダイコンを播種し、温室で栽培を行った。発芽率と乾燥重を測定した結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった。

土壌微生物相試験：

本組換え体及び対照の非組換え体の収穫時の栽培土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌数、細菌数及び放線菌数を計測した。その結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差は認められなかった。

3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

添付の「緊急措置計画書」を参照。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国では2000年よりほ場試験が実施され、米国農務省（USDA）による無規制裁培の承認、及び、米国食品医薬品庁（FDA）による食品及び飼料安全性の確認が、いずれも2005年7月になされている。

なお、我が国においては、2007年5月に農林水産省及び環境省によって、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、第一種使用等（隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為）が承認された。また、食品としての安全性審査のための申請を厚生労働省へ、飼料としての安全性審査のための申請を農林水産省へ、それぞれ順次行う予定である。

第2 項目ごとの生物多様性影響の評価

1. 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ワタは我が国における長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

隔離ほ場試験において、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、発芽率を検討した（第1、2-(6)-②-a～e、13ページ）。その結果、これらすべての調査項目において、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差や相違は認められなかった。したがって、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質は、対照の非組換え体や従来ワタと同様と判断された。なお、競合における優位性に関わる諸形質のうち休眠性については、ワタの種子は一般的には休眠性が浅いことが知られている。

本組換え体には改変Vip3A蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではなく、抵抗性が付与されても競合における優位性が高まるとは考えにくい。また、本組換え体は選抜マーカーとして利用したAPH4蛋白質の発現によるハイグロマイシンB等、一部のアミノグリコシド系抗生物質耐性が付与されているが、我が国の自然環境下において、この形質を有することにより競合における優位性が高まるとは考えにくい。よって、これらの形質の付与が栽培作物であるワタを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。

以上のことから、本組換え体の競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

2. 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

宿主の属する分類学上の種であるワタについては、他感作用物質のような野生動植物等に対して影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性については、隔離ほ場において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施した（第 1、2-(6)-②-g、15ページ）。その結果、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験において、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差は認められず、意図しない有害物質の産生はないと考えられた。

本組換え体において、改変 *vip3A* 遺伝子によって発現する改変 Vip3A 蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくい。また、選抜マーカーとして導入された *aph4* 遺伝子によって発現する APH4 蛋白質は、ハイグロマイシン B 等、一部のアミノグリコシド系抗生物質をリン酸化するが、極めて基質特異性が高く、さらに、植物体中には基質となり得る物質が存在することは知られていない。よって、本組換え体において産生される改変 Vip3A 蛋白質や APH4 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられた。なお、改変 Vip3A 蛋白質及び APH4 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒素と有意な相同性を持たないことを確認している。

本組換え体にはチョウ目害虫抵抗性を示す改変 Vip3A 蛋白質の産生性が付与されているため、本組換え体の花粉による非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念されるが、ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ない。仮に飛散したとしても、その範囲は極めて限定されたものであると考えられる。さらに、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子がこぼれ落ちて、我が国の自然条件下でワタが生育あるいは自生化したという報告はない。

以上のことから、本組換え体の有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国には、本組換え体が属する4倍体栽培ワタ (*Gossypium hirsutum*) と交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、本組換え体の交雑性によって影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

4. その他の性質

上記の他に、生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換え体の性質はないと考えられる。

第3 生物多様性影響の総合的評価

ワタには我が国における長期にわたる使用等の実績があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。

隔離ほ場試験において、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、発芽率を検討した。その結果、これらすべての調査項目において、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差や相違は認められなかった。以上のことから、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質は、対照の非組換え体や従来のワタと同様と判断された。なお、競合における優位性に関わる諸形質のうち休眠性については、ワタの種子は一般的には休眠性が浅いことが知られている。また、本組換え体は改変Vip3A蛋白質及びAPH4蛋白質を植物体中で生産するが、これらの形質の付与が栽培作物であるワタを自然環境下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

有害物質産生性に関しては、隔離ほ場において、後作試験、植物残渣の鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施したが、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差は認められず、意図しない有害物質の産生はないと考えられた。また、本組換え体で発現する改変Vip3A蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくく、さらに、APH4蛋白質は極めて基質特異性が高く、植物体中には基質となり得る物質が存在することが知られていないことから、宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられた。本組換え体にはチョウ目害虫抵抗性を示す改変Vip3A蛋白質の産生性が付与されているため、本組換え体の花粉による非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念されるが、ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ない。仮に飛散したとしても、その範囲は極めて限定されたものであると考えられる。さらに、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子がこぼれ落ちて、我が国の自然条件下でワタが生育あるいは自生化したという報告はない。したがって、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

交雑性に関しては、我が国には本組換え体と交雑可能なワタの近縁野生種は自生していないことから、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

以上のことから、本組換え体を第一種使用規定に従って使用した場合に、我が国において生物多様性影響が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

引用文献

社外秘につき非開示

緊急措置計画書（食用・飼料に供する場合）

平成 20 年 5 月 29 日

氏名 シンジェンタシード株式会社

代表取締役社長 大伴 秀郎

住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.）（COT102, OECD UI: SYN-IR102-7）（以下、「本組換え体」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定のために関係機関への協力等を必要に応じて行う。更に、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

個人名・所属は個人情報につき非開示。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本組換え体の開発者である米国シンジェンタシード社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

本組換え体の使用に伴い生物多様性影響を生ずるおそれがあると認めた場合には、緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を使用等をしている者に連絡するとともに、弊社のホームページにおいて情報提供を行い、問い合わせ専用窓口を設置する。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

具体的な措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実施する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換え体が我が国において生物多様性影響を及ぼすおそれがあると認められた場合は、速やかに、農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

チョウ目害虫抵抗性ワタ
(改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.) (COT102, OECD UI: SYN-IR102-7)

生物多様性影響評価書

添 付 資 料

- 別紙 1 Vip3A 蛋白質の殺虫スペクトラム
- 別紙 2 ベクターpCOT1 の塩基配列
- 別紙 3 COT102 : 分離比による挿入遺伝子の安定性評価
- 別紙 4 COT102 : 挿入遺伝子のコピー数及び複数世代における安定性
- 別紙 5 COT102 : ELISA による蛋白質の発現量測定
- 別紙 6 COT102 : 系統特異的検出方法
- 別紙 7 隔離ほ場試験結果報告書

社外秘情報につき非開示

シンジェンタシード株式会社