

除草剤グリホサート耐性ワタ (*2mepsps, Gossypium hirsutum* L.) (GHB614, OECD UI: BCS-GH002-5) 申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書	5
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	7
5	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	7
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	7
	① 和名、英名及び学名	7
	② 宿主の品種名	7
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯	7
10	(2) 使用等の歴史及び現状	7
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	8
	② 主たる栽培地帯、栽培方法、流通実態及び用途	8
	(3) 生理学的及び生態学的特性	9
	イ 基本的特性	9
15	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	9
	ハ 捕食性又は寄生性	9
	ニ 繁殖又は増殖の様式	9
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	9
20	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	9
	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	10
	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	10
	ホ 病原性	10
25	ヘ 有害物質の産生性	10
	ト その他の情報	10
	2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	12
	(1) 供与核酸に関する情報	12
30	イ 構成及び構成要素の由来	12
	ロ 構成要素の機能	14

	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	14
5	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を有することが明らかとなっている蛋白質と同一性を有する場合はその旨	14
	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	14
	(2) ベクターに関する情報	16
	イ 名称及び由来	16
	ロ 特性	16
10	① ベクターの塩基数及び塩基配列	16
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	16
	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	17
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	18
15	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	18
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	18
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	18
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	18
20	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	18
	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	19
25	(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	20
	① 移入された核酸の複製物が存在する場所	20
	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	20
30	③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別	21
	④ (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	21
	⑤ 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	23
	(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	23
	(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	24
5	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内容	24
	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	24
10	a 形態及び生育の特性	24
	b 生育初期における低温又は高温耐性	25
	c 生体の越冬性又は越夏性	25
	d 花粉の稔性及びサイズ	25
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	25
15	f 交雑率	26
	g 有害物質の産生性	26
	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	27
	(1) 使用等の内容	27
20	(2) 使用等の方法	27
	(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法	27
	(4) 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	27
25	(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果	27
	(6) 国外における使用等に関する情報	27
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	29
30	1. 競合における優位性	29
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29
	(2) 影響の具体的内容の評価	30
	(3) 影響の生じやすさの評価	30

	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	30
	2. 有害物質の産生性	30
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
5	(3) 影響の生じやすさの評価	32
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
	3. 交雑性	32
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
10	(3) 影響の生じやすさの評価	33
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
	4. その他の性質	33
	 第三 生物多様性影響の総合的評価	 34
15	参考文献	36
	別添資料の内容	37
	 緊急措置計画書	 38

第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 7 月 16 日

5

農林水産大臣 石破 茂 殿  
環境大臣 斉藤 鉄夫 殿

10

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社  
申請者 代表取締役社長 ジョン グレイ 印  
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

20 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。

5

10

遺伝子組換え生物等の種類 の名称	除草剤グリホサート耐性ワタ ( <i>2mepsps</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (GHB614, OECD UI: BCS-GH002-5)
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	—

## 第一 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

#### 5 (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（リクチメン）

英名：Upland cotton

10 学名：*Gossypium hirsutum* L.

##### ② 宿主の品種名

宿主の品種名は、四倍体栽培ワタ（*Gossypium hirsutum* L.）のCoker312である。

##### 15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

*G. hirsutum*は四倍体のワタの栽培種であり（文献47）、我が国の自然環境において、*G. hirsutum*（以下、「ワタ」とする。）及び本種と交雑可能な*Gossypium*属（以下、「ワタ属」とする。）植物の自生は報告されていない。

ワタ属は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯から半乾燥地帯にかけて、世界におよそ50  
20 種（文献13）が分布し、その生物学的多様性の中心は、主にアフリカ・アラビア半島、オーストラリア及びメキシコの3地域である（文献31）。本属のうち二倍体種は、アフリカ、アラビア半島、パキスタン及びおそらくそれ以東に分布するアフリカ・アラビア群（*Gossypium*亜属）の約14種（文献39, 45）、オーストラリア群（*Sturtia*亜属）の約17種（文献5）、そして、メキシコ西部、ガラパゴス諸島及びペルーに分布するアメリカ群（*Houzingenia*亜属）の約14種（文献1）であり、四倍体種は、メ  
25 ソアメリカ（メキシコ及び中央アメリカ）、南アメリカ、ガラパゴス諸島及びハワイ諸島に分布するアメリカ・太平洋群（*Karpas*亜属）の5種である（文献47）。なお、二倍体種の*G. arboreum*及び*G. herbaceum*は旧大陸（アフリカ・アジア）において、一方、四倍体種のワタ（*G. hirsutum*）及び*G. barbadense*は新大陸（*G. hirsutum*はメソ  
30 アメリカ、*G. barbadense*は南アメリカ）において、それぞれ栽培化された（文献31）。

#### (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

ワタ属は数千年間その繊維を得るために栽培されてきた。パキスタンのモヘンジョダロ遺跡から紀元前3000年頃の*G. arboreum*の綿布片が発掘され、一方、新大陸でも、紀元前2400年頃の古代ペルー人の住居跡で*G. barbadense*の種子と原始的織機や織物の破片が発見された。これらのことから、古代インド人とペルーのインディオによって綿から織物を作る技術が開発されていたことがうかがわれる。また、メキシコでは紀元前5800年頃の洞窟からワタ (*G. hirsutum*) のさくが発掘されており、ワタ属の栽培利用の歴史はきわめて古いと考えられている (文献17)。

中南米で栽培されたワタ (*G. hirsutum*) は1700年前頃メキシコから米国に入り、内陸部で一年生の早生種が栽培されるようになり、その後、米国の主要作物となったが、南北戦争のために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17)。今日生産されるワタ属栽培種の95%以上は四倍体種であり、ワタ (*G. hirsutum*) が90%以上、*G. barbadense*が5%程度を占める (文献31)。

我が国における在来の栽培種は*G. arboreum*であり、799年 (延暦18年) に三河地方に漂着したインド人が伝えた種子を栽培したのが最も古い記録とされ、その後、16世紀に入ってから全国的に栽培が広まった (文献41)。しかし、輸入綿におされて次第に衰微し、第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったものの、現在ではその商業的な栽培はなく、観賞用としてわずかに栽培されているにすぎない (文献17)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2007年の世界における綿実の生産量は約7,250万tであり、主な生産国は中国 (2,287万t)、米国 (1,200万t)、インド (948万t)、パキスタン (650万t) である (文献11)。

2007年度には、約14万 t の搾油用の綿実が我が国に輸入されている (文献29)。また、綿実油は2007年度に5,702 tが輸入され、主な輸入先は米国 (3,533 t) 及びオーストラリア (1,834 t) であった。他方、2007年度の綿実油粕の輸入量は4,481 tであり、主な輸入先は中国 (4,182 t)、米国 (299 t) であった (文献23)。

ワタの大規模栽培の畑では機械による収穫が行われるが、その際、葉片などの混入を防ぐために収穫前に薬剤で落葉させる (文献41)。

ワタは工芸作物の中でも最も重要な位置を占めている。ワタの主な用途は繊維利用であり、綿花は糸に紡がれる。また、地毛は短いため繊維として利用されず、セ



ルコースや紙の原料とされる。種子は18～24%の油脂と16～20%の蛋白質を含み、抽出した油は食用油として、また、搾油粕は家畜の飼料として重要であり、肥料としても需要が高い（文献41）。

### 5 (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

ワタは多年生植物で低木にもなるが、商業的には一年生作物として栽培される（文献31）。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である（文献33）が、一般的には  
10 茎長1mから1.5mで栽培されている（文献31）

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽もしくは実生の生育には15℃以上が要求され、38℃以上になると生育遅延が起こる（文献31）。日中の最適温度は30～35℃であるが、35℃以上になると  
15 結実が抑制され、25℃以下では生産量が著しく減少する（文献35）。また、正常な生育には、180～200日以上は無霜期間並びに栽培期間中に500mm以上の降雨量もしくは灌水を要する（文献10）。さらに、ワタは酸性に弱い、アルカリ性に対する適応性が高く、塩分の多いアルカリ性土壌で栽培可能である（文献41）。

#### 20 ハ 捕食性又は寄生性

—

#### ニ 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

25 さくは3～5室に分かれており、1室に7～8個の種子を含んでいる。発育にともない水分が減少し、さく皮が裂けて開じよする。ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくく（文献17）、種子の脱粒性は低い（文献25）。品種によっては収穫後2～3ヶ月の休眠期を持つ（文献10）。また、水分含有率10%以上の種子は貯蔵中に急速に活力が失われることが知られており（文献34）、自然環境では寿命は比較的短いと考えられる。  
30

##### 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

ワタは種子繁殖であり、自然条件下で植物体を再生しうる組織又は器官から出芽するという報告はなされていない。

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植物であるが、媒介昆虫により他家受粉し、他殖率は通常5～30%とされている（文献25）。なお、我が国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。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

ワタは一花に50～125以上の葯を形成し、一つの葯で350～900個の花粉粒が生産される（文献31）。ワタの花粉粒は大きく重く、やや粘着性があるため、風で花粉が運ばれることはほとんどなく（文献42）、自然交雑の程度は主にマルハナバチ（*Bombus*属）やミツバチ（*Apis*属）等の媒介昆虫の活動に依存している（文献28, 31）。米国における放飼昆虫を用いた雄性不稔系統（非組換え体）と在来系統との交配試験により、花粉源からの距離が12mを超えると明らかな花粉移動は見られないという報告がある（文献43）。他方、花粉源に除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10mを超えると耐性個体の出現程度は0.3%以下となり偶発的なものに限られ、60m以上では耐性個体の出現は認められなかった（文献49）。また、花粉の寿命については、25℃飽和湿度条件において、8時間後では約90%、16時間後では約31%、32時間後では7.6%と低下し、蛾（*Helicoverpa armigera*）の口吻に付着した場合には、8時間後には約19%となり、花粉の生存率はさらに低下することが確認されている（文献36）。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

ワタが、他感物質等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は知られていない。

ト その他の情報

ワタの種子には、ヒトや動物が大量に摂取した場合に悪影響を及ぼし得るゴッシ

ポールやシクロプロペン脂肪酸が含まれている（文献31）。そのため、飼料としてのワタ種子の給餌量は制限されているが、反芻動物はこれらの物質を第一胃で消化して無毒化するため、影響を受けにくい（文献24）。

5 ゴッシポールは腺組織に存在するテルペノイドで、二つの異性体(+/-)があり、主に（-）ゴッシポールが活性を示す（文献40）。また、両異性体には遊離型と結  
合型があり、種子には遊離型ゴッシポールが含まれる。遊離型ゴッシポールは、非  
反芻動物、鳥類並びに多くの昆虫や微生物に対して毒性を示し、哺乳類においては  
10 食欲減退、体重減少や呼吸困難等を引き起こす（文献2）。しかし、搾油粕中のゴッ  
シポールは蛋白質と結合して毒性を失い（文献31）、粗油中のゴッシポールは脱ガ  
ム、脱酸、脱色の各工程で除去される（文献37）。

シクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸）は粗油中に1%ほど含ま  
れており、不飽和化酵素を阻害し、鶏では卵白の変色やふ化率の低下などを引き起  
こすが、水素添加など精製過程で除去される（文献15, 30）。

15 ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、野生動物が摂食するという例は報告  
されていない。

## 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

#### 5 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性ワタ (*2mepsps, Gossypium hirsutum* L.) (GHB614, OECD UI: BCS-GH002-5) (以下、「GHB614」とする。)の作出に用いられた供与核酸の構成要素を表1 (p.13) に示した。

10

表1 構成要素のベクター上の位置、サイズ、由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>2mepsps</i> 遺伝子発現カセット			
Ph4a748At	0026-1036	1011	シロイヌナズナ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )のヒストンH4遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (文献7)。植物中で構成的に <i>2mepsps</i> 遺伝子の転写を開始させる。
intron1 h3At	1037-1553	517	シロイヌナズナ( <i>A. thaliana</i> )のヒストンH3.3第II遺伝子の第一イントロンを含む配列(文献8)。
TPotp C	1554-1926	373	ヒマワリ ( <i>Helianthus annuus</i> ) 及びトウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に作製された (文献26)。成熟した2mEPSPS蛋白質を色素体に輸送する。
<i>2mepsps</i>	1927-3264	1338	トウモロコシ( <i>Z. mays</i> )由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子 ( <i>epsps</i> 遺伝子) に点突然変異を起こした、2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (2mEPSPS蛋白質) をコードする遺伝子 (文献27) で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。なお、 <i>epsps</i> 遺伝子の色素体膜輸送ペプチドをコードする配列は、取り除かれている。
3'histonAt	3265-4007	743	<i>A. thaliana</i> のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域 (文献7) を含む配列で、転写を終結させ、3'ポリアデニル化を生じさせる。
その他			
LB	0001-0025	25	<i>Rizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> )のT-DNA領域由来の左側境界反復配列 (文献48)。
RB	4008-4032	25	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> )のT-DNA領域由来の右側境界反復配列 (文献48)。
—	4033-4224	192	右側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片 (文献50)。
<i>nptI</i> 断片	4225-4935	711	ネオマイシン ホスホトランスフェラーゼをコードするトランスポゾンTn903由来の <i>npt I</i> 遺伝子 (文献32) の断片。なお、本配列は断片であるため機能しない。
ORI ColE1	4936-6108	1173	<i>Escherichia coli</i> のプラスミドpBR322 (文献3) 由来複製起点を含む配列。
ORI pVS1	6109-9879	3771	<i>Pseudomonas</i> のプラスミドベクターpVS1(文献22)の複製起点 (文献16) を含む配列。
<i>aadA</i>	9880-11648	1769	<i>E. coli</i> 由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (文献12) を含む配列。
—	11649-11953	305	左側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片 (文献50)。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

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

供与核酸の構成要素それぞれの機能は表1 (p.13) に示した。

5

- 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

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 蛋白質(EC 2.5.1.19)は、  
10 植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路である、シキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生ずる可逆反応を触媒する。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素-基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻  
15 害する (文献4)。その結果、植物は蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり、枯死する。

GHB614に導入された2*mepsps*遺伝子は、トウモロコシ (*Z. mays*) からクローニングされたEPSPS蛋白質をコードする*eppsps*遺伝子の2ヶ所のヌクレオチドが点突然変異により置き換えられた遺伝子である。2*mepsps*遺伝子が産生する2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列は、野生型のEPSPS蛋白質のアミノ酸の102番目のトレオニンがイソロイシンに、また106番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している。これにより、2mEPSPS蛋白質はグリホサートに対する結合親和性が低くなり、グリホサートによる活性阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、グリホサートの存在下でも生育することができる。  
25

また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索 (Uniprot\_Swissprot、Uniprot\_TrEMBL、PIR、NRL-3D、DAD及びGenPept) 及びエピトープ検索 (Uniprot\_Swissprot、Uniprot\_TrEMBL、PIR、DAD及びGenPept) を行った結果、既知の毒素又はアレルギーとの相同性は認められなかった。  
30

- ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

2mEPSPS蛋白質のPEP及びS3Pに対する親和性の濃度 ( $K_m$  値: ミカエリス定数) について、EPSPS蛋白質と比較した結果、PEPに対する  $K_m$  値は同等であった

(表 2)。また、S3P に対する親和性は、2mEPSPS 蛋白質の方が EPSPS 蛋白質よりわずかに低かった(表 2)。さらに、酵素活性を調べた結果、最大反応速度 ( $V_{max}$ ) は、PEP と S3P のいずれに対しても EPSPS 蛋白質の方が 2mEPSPS 蛋白質より高く、PEP に対して約 4.7 倍、S3P に対して約 4 倍、それぞれ高い数値を示した(表 2)。また、グリホサートが PEP の競合阻害剤となることから、PEP 濃度を  $K_m$  値の 5 倍の濃度に設定して PEP に対するグリホサートの 50% 阻害濃度 ( $IC_{50}$  値) を調べた結果、2mEPSPS 蛋白質の  $IC_{50}$  値は EPSPS 蛋白質の約 190 倍高かった(表 2)。さらに、PEP に対するグリホサートの阻害定数 ( $K_i$  値) は 2mEPSPS 蛋白質では 2.3mM、EPSPS 蛋白質では  $0.9 \mu M$  となり、グリホサートの 2mEPSPS 蛋白質に対する阻害活性は、EPSPS 蛋白質に対してよりも約 2000 分の 1 であった (表 2)。以上から、PEP 及び S3P に対する  $K_m$  値がほぼ同等であったことから、各結合部位に変化はなく、2mEPSPS 蛋白質は EPSPS 蛋白質と同じ基質特異性を保持しながらそれ以外の部位に変異が生じてグリホサートに対する高い耐性が誘導されたと考えられる。なお、EPSPS 蛋白質は PEP 及び S3P 以外に S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS 蛋白質とシキミ酸の反応性は低く (文献 14)、高い基質特異性を有している。

表2 2mEPSPS蛋白質及びEPSPS蛋白質の反応動学的定数( $K_m$ 値、 $IC_{50}$ 値、 $K_i$ 値)

酵素	$K_m$ 値/PEP <sup>a</sup> (mM)	$K_m$ 値/S3P <sup>a</sup> (mM)	$V_{max}$ /PEP <sup>a</sup> (U/mg)	$V_{max}$ /S3P <sup>a</sup> (U/mg)	$IC_{50}$ 値/PEP <sup>a</sup> (mM)	$K_i$ 値/PEP ( $\mu M$ )
2mEPSPS	$0.07 \pm 0.005$	$0.12 \pm 0.01$	$2.6 \pm 0.05$	$3.0 \pm 0.08$	$18.3 \pm 2.7$	2300
EPSPS	$0.07 \pm 0.01$	$0.09 \pm 0.006$	$12.2 \pm 0.42$	$11.9 \pm 0.19$	$0.098 \pm 0.005$	0.9

n=2。

a : (平均±標準偏差)。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

また、2mEPSPS蛋白質の産生により既存のEPSPS蛋白質に加算してEPSPS活性が増大することによる影響が考えられる。しかし、シキミ酸合成経路において最終段階の合成反応に関与するEPSPS蛋白質は、中間代謝産物や最終生成物により負の制御を受けている可能性が低く、本経路の律速には関与していないものと考えられる(文献6, 18, 19, 20, 21, 46)。また、通常の40倍のEPSPS蛋白質を生成する植物培養細胞においても、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている(文献38)。さらに、表3(p.16)に示す結果では、GHB614系統と宿主品種であるCoker312との間で、シキミ酸合成経路を経由して生成される最終生成産物であ

る芳香族アミノ酸（チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン）に関して、有毛種子の乾燥重量における各種芳香族アミノ酸の割合がそれぞれ同程度であると確認されている(表3; 別添資料8, p.10, Table 2)。

表3 GHB614及びCoker312の有毛種子における各種アミノ酸含量

アミノ酸	乾燥重量%			有意差 <sup>b</sup>	
	Coker312区 <sup>a</sup> (A)	GHB614 グリホサート 未処理区 <sup>a</sup> (B)	GHB614 グリホサート 処理区 <sup>a</sup> (C)	A-B	A-C
フェニルアラニン	1.241	1.264	1.256	ns	ns
トリプトファン	0.313	0.321	0.317	ns	ns
チロシン	0.593	0.614	0.606	ns	ns

a : 全9試験地の27の測定値(各試験地における3測定値×9試験地)から、総平均を算出した。

b : T-検定 (有意水準1%) により統計処理を行った。T-検定は (A) と (B) 及び (A) と (C) の2パターンで行った。

ns : 有意差無し

- 5 (注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

- 10 (2) ベクターに関する情報

#### イ 名称及び由来

- 15 GHB614の作出に用いたベクターは、*E. coli*由来のプラスミドpBR322、*Pseudomonas*由来プラスミドpVS1等をもとに構築されたpGSC1700 (文献9) を由来とするpTYG50に*2mepsps*遺伝子発現カセットが挿入されたプラスミドpTEM2である (図1, p.17)。

#### ロ 特性

##### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

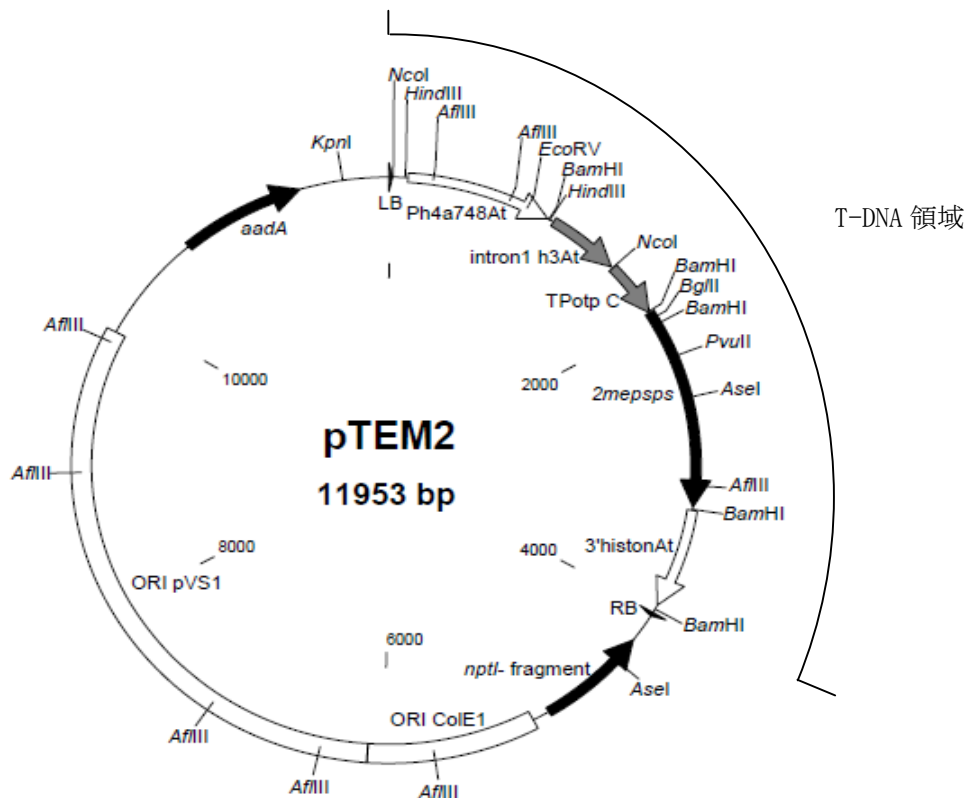
- 20 pTEM2の塩基数は11,953bpである。本ベクターの構成要素を別添資料1 (p.7, Table 1) に示した。

##### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能



pTEM2はT-DNA領域の外側に以下の配列を含むが、これらの配列がGHB614には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（別添資料3, p.14, Figure 10～p.18, Figure 14）。

- 5 - *E. coli*のプラスミドpBR322（文献3）由来複製起点（ORI ColE1）及び*Pseudomonas*のプラスミドベクターpVS1（文献16）の複製起点（ORI pVS1）。それぞれ、*E. coli*及び*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)において自律的複製を行わせる機能を有する。
  - *E. coli*由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (*aadA*)（文献12）。*E. coli*及び*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)において選抜マーカーとして利用した。
- 10 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  
pTEM2の宿主域は*E. coli*及び数種のグラム陰性菌に限られており、植物体では伝達性を持たないと考えられる。



15

図1 pTEM2のベクター地図及び制限酵素切断部位  
(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

5 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内には、pTEM2上のLBとRBに挟まれた2mepsps遺伝子発現カセット ([Ph4a748At]-[intron1 h3At]-[TPotp C]-[2mepsps]-[3'histonAt]) が移入された。T-DNA領域の構成を図2に示した。

10

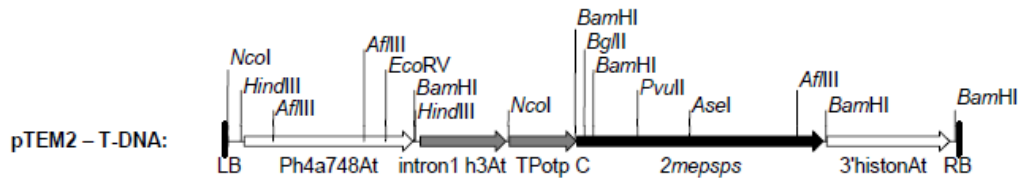


図2 T-DNA領域の構成及び制限酵素による切断部位

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

15

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主品種Coker312（以下、「宿主品種」とする。）への核酸の移入はアグロバクテリウム法を用いて行われた。宿主品種の組織片を、ベクターpTEM2を転移させた*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) C58C1<sup>Rif</sup>株（文献44）の培養液に曝露し、形質転換を行った。

20

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

25 核酸が移入された組織片は、claforan 500mg/Lを含む再生培地においてアグロバクテリウム菌体を除去した後、グリホサートにより選抜された。

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

30 核酸の移入後にclaforan 500mg/Lを含む培地で培養し、形質転換に用いたアグロバ

クテリウム菌体を除去した。さらに、**claforan**を含まない培地で培養し、アグロバクテリウム菌体の残存がないことを確認した。

- 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
- 5 生長した苗条をポットに移植して温室内で栽培し、GHB614当代（T0）を得た。除草剤グリホサート耐性形質及び農業形質等により優良系統を選抜した。なお、本申請の対象は、組換え当代（T0世代）において除草剤グリホサート耐性を示した株
- 10 及びその後代である。
- GHB614の育成の経過を図3に示した。

社外秘情報につき非開示

図3 GHB614の育成の経過

(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

除草剤グリホサートに対する耐性/感受性の分離比について、BC2F2、F1、F2、BC1F1及びBC2F1世代を用いて調べた結果、いずれの世代においても、挿入遺伝子に関して1遺伝子座支配と仮定した場合に想定されるとおりの分離比を示した（表4）。よって、GHB614に移入された核酸の複製物はワタゲノムの1ヶ所に存在すると考えられる。

10

表4 GHB614の除草剤グリホサート耐性に関する分離比の解析

交配親	世代	比率	観察された株数		期待値		$\chi^2$ 検定 <sup>a</sup>
		R:S	R	S	R	S	
BC2F1の自殖	① BC2F2	3:1	28 <sup>b</sup>	8	27	9	0.15
BC2F2 <sup>c</sup> ×FM966 <sup>d</sup>	② F1	1:1	7	9	8	8	0.25
F1ヘテロの自殖	③ F2	3:1	113	43	117	39	0.60
F1ヘテロ×FM966	④ BC1F1	1:1	9	12	10.5	10.5	0.43
BC1F1ヘテロ×FM966	⑤ BC2F1	1:1	11	6	8.5	8.5	1.47

a. 1遺伝子座支配と仮定。自由度1、 $\alpha=0.05$ において、 $\chi^2$ 値3.84以上で帰無仮説が棄却される。

b. PCRによるホモ・ヘテロ接合体検定を行った結果、ホモ接合体が9株、ヘテロ接合体が19株であった。

c. 上記bのヘテロ接合体を用いた。

d. 非組換えワタ商業品種。

R=耐性株 S=感受性株

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

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

GHB614 (BC2F4) から抽出したDNAを制限酵素により切断し、Ph4a748At、intron1h3At+TPotp C、2mepsps、3' histonAt及び完全なT-DNA領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、1コピーのT-DNA領域が移入されていることが確認された（別添資料3, p.4, Figure 2~p.8, Figure 6）。また、GHB614に移入されたT-DNA領域についてシーケンス解析を行った結果、pTEM2上のT-DNA領域と一致することが確認された（別添資料2, p.15~22）。

また、2世代のGHB614 (T7, BC2F3) から抽出したDNAについてサザンブロット分析を行った結果、いずれの世代においても同一のバンドが認められ、移入されたT-DNA領域の複数世代における伝達の安定性が確認された（別添資料3, p.10, Figure

8)。

さらに、GHB614から抽出したDNAについて、プラスミドpTEM2上のT-DNA領域外配列全体をカバーする5つの断片をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、いずれにおいてもバンドは検出されず、T-DNA領域外配列がGHB614に移入されていないことが確認された（別添資料3, p.14, Figure 10～p.18, Figure 14）。

③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

10 —

④ (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

GHB614 (BC2F4) の第一生育期 (2-3葉期)、第二生育期 (4-6葉期)、第三生育期 (開花直前) 及び第四生育期 (開花期) における葉、茎、根、花蕾、頂部及び花粉について、2mEPSPS蛋白質の含有量をELISA法により測定した。なお、葉は全ての生育期、茎及び根は第二及び第四生育期、花蕾、頂部及び花粉は第四生育期について調べた。また、総抽出蛋白質 (TEP) 量を測定し、TEP中における2mEPSPS蛋白質率を算出した。その結果、葉における2mEPSPS蛋白質の各平均含量は、第一生育期の $11.16 \pm 3.73 \mu\text{g/g}$ から第四生育期の $0.45 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ まで、生育の経過と共に経時的に減少した。また、葉におけるTEP中の2mEPSPS蛋白質の割合についても第三生育期において一時的に増加したものの、生育の経過と共に減少した。茎における2mEPSPS蛋白質含有量は、第二生育期では $1.94 \pm 0.61 \mu\text{g/g}$ 、第四生育期では $1.58 \pm 0.96 \mu\text{g/g}$ となり経時的に減少し、TEP中の2mEPSPS蛋白質の割合についても減少した。根における2mEPSPS蛋白質含有量は、第二生育期では $0.99 \pm 1.00 \mu\text{g/g}$ 、第四生育期では $4.04 \pm 1.71 \mu\text{g/g}$ と経時的に増加し、TEP中における2mEPSPS蛋白質の割合も増加した。さらに、第四生育期における花蕾、頂部及び花粉における2mEPSPS蛋白質含有量は、それぞれ $5.35 \pm 0.25 \mu\text{g/g}$ 、 $5.47 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ 及び $0.16 \pm 0.01 \mu\text{g/g}$ となった。よって、組織又は生育時期により発現量は異なるものの、すべてのサンプルにおいて2mEPSPS蛋白質が検出された (表5, p.22; 別添資料4, p.13, Table 7及びp.17, Table 10)。

表5 GHB614各組織における2mEPSPS蛋白質含量の平均値( $\mu\text{g/g}$  生重 $\pm$ 標準偏差<sup>a</sup>)[%TEP]

組織	検出限界値 ( $\times 10^{-3} \mu\text{g/g}$ 生重)	第一生育期	第二生育期	第三生育期	第四生育期
葉	4.47	11.16 $\pm$ 3.73 [0.121]	7.94 $\pm$ 2.87 [0.090]	6.52 $\pm$ 7.20 [0.385]	0.45 $\pm$ 0.22 [0.028]
茎	8.34	ND	1.94 $\pm$ 0.61 [0.062]	ND	1.58 $\pm$ 0.96 [0.039]
根	27.33	ND	0.99 $\pm$ 1.00 [0.074]	ND	4.04 $\pm$ 1.71 [0.176]
花蕾	27.33	NA	NA	NA	5.35 $\pm$ 0.25 [0.175]
頂部	8.10	ND	ND	ND	5.47 $\pm$ 0.22 [0.338]
花粉	16.08	NA	NA	NA	0.16 $\pm$ 0.01 [0.001]

a: 標準偏差は、葉、根及び茎については20測定値(サンプル数5 $\times$ 各サンプルから2反復の抽出物 $\times$ 各抽出物から2反復の測定値)から、未開花蕾・生長点・花粉については4測定値(サンプル数1 $\times$ 各サンプルから2反復の抽出物 $\times$ 各抽出物から2反復の測定値)から算出した。

TEP: 総抽出蛋白質

ND: 測定せず。

NA: 適用できず。

(注: 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

5 GHB614 (BC2F2) の有毛種子 (穀実+地毛外皮) サンプルは、米国の9試験地より採取した。各試験地では、除草剤グリホサート処理{有効成分0.75ポンド/エーカー (0.084 g/m<sup>2</sup>) を3回処理}を施したGHB614系統区及び除草剤グリホサート未処理GHB614区をそれぞれ栽培した。有毛種子を穀実と地毛外皮の2分画に分離し、それぞれ2mEPSPS蛋白質含量をELISA法で測定した。また、各分画の2mEPSPS蛋白質含量と重量から有毛種子の2mEPSPS蛋白質含量を算出するとともに有毛種子における総粗蛋白質 (TCP) 量を測定し、有毛種子における2mEPSPS蛋白質のTCP中含有率(%)を算出した。結果、生育中の除草剤グリホサート散布処理の有無に関わらず、穀実と地毛外皮の両分画で2mEPSPS蛋白質が検出され、GHB614の有毛種子の2mEPSPS蛋白質含量の平均値は、グリホサート未処理サンプルでは19.2 $\pm$ 3.1  $\mu\text{g/g}$ 、グリホサート処理サンプルでは21.2 $\pm$ 4.0  $\mu\text{g/g}$ であった。また、有毛種子における

10

15 2mEPSPS蛋白質中のTCP中含有率は、グリホサート未処理サンプルでは0.0093 $\pm$ 0.0018%、グリホサート処理サンプルでは0.0100 $\pm$ 0.0019%であった (表6, p.23; 別添資料5, p.12, Table 2)。

表6 除草剤グリホサート散布処理及び未処理のGHB614より収穫された有毛種子（穀実+地毛外皮）における2mEPSPS蛋白質質量（ELISA測定）

試料	2mEPSPS蛋白質含有量 ( $\mu\text{g/g} \pm$ 標準偏差 <sup>a</sup> )		総粗蛋白質（TCP）中の 2mEPSPS蛋白質含有率（% <sup>b</sup> ）	
	未処理	処理	未処理	処理
穀実	36.3 $\pm$ 7.2	40.2 $\pm$ 9.0	NA	NA
地毛外皮	0.08 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.15	NA	NA
有毛種子	19.2 $\pm$ 3.1	21.2 $\pm$ 4.0	0.0093 $\pm$ 0.0018	0.0100 $\pm$ 0.0019

a: 全9試験地の108の測定値(各試験地における12測定値 $\times$ 9試験地)から、総平均及び標準偏差を算出した。有毛種子(穀実+地毛外皮)に関しては、試験地毎に3区画の平均値を算出し、全9試験地の平均値から、総平均及び標準偏差を算出した。

b: 穀実及び地毛外皮の各粗蛋白質量は測定していないため、適用されない（NA）。有毛種子については試験地毎に3区画のTCP蛋白質量の平均値及び2mEPSPS蛋白質含有量の平均値よりTCP中の2mEPSPS蛋白質含有率（%）を求め、全9試験地の総平均値及び標準偏差を算出した。

TCP: 総粗蛋白質

（注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。）

5 また、2008年に行われた隔離ほ場試験に供試されたGHB614の種子(BC2F5)より発芽した播種2週間後の実生20個体並びにその次世代の種子から発芽した播種2週間後の実生40個体に除草剤グリホサート(有効成分0.41%) 300 ml/m<sup>2</sup>を散布した結果、いずれの世代についてもGHB614は薬剤散布2週間後も正常に生育し、耐性を示した（別添資料7, p.14, 図9及び表5, p.21, 表10）。

10

これらのことから、GHB614に挿入された遺伝子は、個体間及び世代間で安定して発現することが確認された。

⑤ 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

15

GHB614に移入された核酸は、伝達を可能とする配列を含まない。よって、自然環境下において野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

(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

20

GHB614は、移入されたDNAの周辺配列を利用したプライマーを用いたPCR法に

よって識別することができる（別添資料9）。なお、本識別法は実際に栽培管理に利用されており、その有効性が確認されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

5

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

GHB614は2*mepsps*遺伝子の発現により、除草剤グリホサート耐性を示す。

10 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

2008年に独立行政法人農業環境技術研究所において隔離ほ場試験を行い、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率並びに有害物質の産生性について、GHB614（BC2F5）及び隔離ほ場試験に供試したGHB614の育成過程における戻し交雑の反復親であり遺伝的背景の近い商業品種FM966（以下、「対照品種」とする。）を比較・検討した（別添資料7）。また、2007年に我が国の特定網室内で、生育初期における低温耐性についてGHB614（T6）及び特定網室試験に供試したGHB614と同じ遺伝的背景を有する宿主品種Coker312を比較・検討した（別添資料6）。

20

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性については、発芽揃い・開花期・開じょ期・収穫期・葉形・草型・花色・さくの形状・綿毛の色・種子の形状・種子の色・発芽率・葉の大きさ（葉長及び葉幅）・幹長・着蕾数・節数・発育枝数・結果枝数・総分枝数・株当たり収穫さく数・株当たり未収穫さく数・株当たり総さく数・収穫期の地上部及び地下部重・花粉稔性・花粉長径・さくの大きさ（長さ及び幅）・さくの重量・さくの室数・さく当たりの種子数・種子100粒重について、GHB614と対照品種を比較した。

その結果、GHB614及び対照品種におけるそれぞれの生育期、すなわち発芽揃い、開花期、開じょ期、収穫期において相違は認められなかった。また、葉形、草型、花色、さくの形状、綿毛の色、種子の形状及び色についても相違は認められなかった。さらに、葉の大きさ、幹長、着蕾数、節数、発育枝数、結果枝数、総分枝数、さくの大きさ、さくの重量、株当たり収穫さく数、株当たり未収穫さく数、株当たり総さく数、収穫期の地上部及び地下部重、さくの室数、さく当たりの種子数、種



子100粒重について、GHB614と対照品種の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.8, 表2～p.11, 表4）。なお、隔離ほ場栽培試験に供試した種子（以下、「栽培試験用種子」とする。）の発芽率に関して統計学的有意差が認められたが、これらの栽培試験用種子は採種地が異なり、対照品種の場合、収穫前の天候不順によりGHB614ほど発芽率の高い種子が得られなかったものと考えられる（別添資料7, p.12）。

#### b 生育初期における低温又は高温耐性

特定網室試験で、GHB614及び宿主品種の幼植物体における5°C・10時間明条件下での萎縮程度について経時的に達観評価を行った。その結果、全ての調査時において系統間に統計学的有意差は認められず、低温条件に移してから24日目には両系統ともに全ての株の枯死が確認された（別添資料6, p.9, 表13）。

#### c 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場において、2008年6月に播種したGHB614及び対照品種を11月の収穫期後も栽培を続けたところ、翌年2月には低温及び降霜によりいずれの株も枯死していることが確認された（別添資料7, p.13, 図8）。

#### d 花粉の稔性及びサイズ

隔離ほ場において栽培したGHB614及び対照品種から花粉を採取し、酢酸カーミン溶液で染色した結果、それぞれ99.7%及び99.8%の花粉が染色されており、系統間に統計学的有意差は認められず、いずれも高い花粉稔性を有していた（別添資料7, p.11, 表4及びp.12, 図7）。また、花粉のサイズについて、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.11, 表4及びp.12, 図7）。

#### e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

隔離ほ場において収穫したGHB614及び対照品種の株当たり収穫さく数、株当たり未収穫さく数、株当たり総さく数及びさく当たりの種子数について、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.11, 表4）。

また、同隔離ほ場試験において、GHB614及び対照品種の種子が開じょしたさくより脱粒したかについて観察した結果、いずれの系統にも脱粒は認められなかった（別添資料7, p.8, 表3）。

さらに、隔離ほ場において収穫したGHB614及び対照品種の種子について、収穫直後の種子（以下、「収穫種子」とする。）及び3ヶ月間室温条件下で風乾した種子（以下、「風乾種子」とする。）にそれぞれ播種し、発芽率を調査した。その結果、  
5 収穫直後ではGHB614が60.0%、対照品種が58.0%、また、3ヶ月間室温条件下で風乾後ではそれぞれ96.0%、98.0%を示し、いずれの条件下においても系統間の発芽率に統計学的有意差は認められず、3ヶ月間の風乾後においては両系統共に高い発芽率を示した（別添資料7, p.19, 表9）。

#### 10 f 交雑率

我が国には、ワタと交雑可能な近縁種は自生していないことから、交雑性試験は行わなかった。

#### g 有害物質の産生性

15 隔離ほ場試験において、根から分泌され他の植物に影響を及ぼすものについては後作試験、植物体内に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壌微生物相に影響を及ぼすものについては土壌微生物相試験を行った。

#### 20 後作試験

隔離ほ場において収穫期まで約5ヶ月間栽培したGHB614及び対照品種の収穫後の土壌をそれぞれ採取し、その土壌において検定作物として栽培したダイコンの発芽率、草丈、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.16, 表6）。

25

#### 鋤込み試験

隔離ほ場において収穫期まで約5ヶ月間栽培したGHB614及び対照品種の植物体地上部を収穫し、乾燥・粉碎して試料とした。これを1%の割合で混和した土壌において、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較  
30 した。その結果、いずれの項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.17, 表7）。

#### 土壌微生物相試験

5 隔離ほ場において収穫期まで約5ヶ月間栽培したGHB614及び対照品種の栽培後  
土壌を採取し、適宜希釈後、細菌及び放線菌についてはPTYG培地、糸状菌につい  
てはローズベンガル培地を用いて培養し、それぞれの生菌数を比較した。その結果、  
いずれの項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7,  
p.18, 表8）。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

10

食用及び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) 使用等の方法

15

—

#### (3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方 法

20

—

#### (4) 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

25

緊急措置計画書を参照。

#### (5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境 での使用等の結果

—

30

#### (6) 国外における使用等に関する情報

米国において、2008年4月に米国食品医薬品庁（FDA）により、食品及び飼料安  
全承認を得た。また、2009年5月に米国農務省（USDA）により、無規制承認（栽培

承認)を得た。

カナダにおいて、2008年3月にカナダ保健省 (Health Canada) により食品安全承認を得た。また、同年4月にカナダ食品検査庁 (CFIA) により飼料及び環境安全承認を得た。

5

なお、我が国では、2007年12月に食品としての利用のための承認申請を厚生労働省へ、また、飼料としての利用のための承認申請を農林水産省へ、それぞれ提出し、現在審議中である。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

我が国においてGHB614の商業栽培は行わないため、生物多様性影響が生ずる可能性は、運搬中にこぼれ落ちた種子が生育し、自生する場合には限られる。しかし、  
5 ワタ (*G. hirsutum*) は我が国において長期にわたり輸入され、加工用として使用されてきた経験があるが、自然環境下において自生化したという報告はなされていない。

### 1 競合における優位性

10

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国の自然環境下におけるワタの自生は報告されていない。

15 2008年に我が国の隔離ほ場において、GHB614 (BC2F5) 及び対照品種を栽培し、競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について比較した (別添資料7)。また、生育初期における低温耐性については、2007年に我が国での特定網室試験において  
GHB614 (T6) 及び宿主品種を比較した (別添資料6)。

20 形態及び生育の特性に関する形質については、栽培試験用種子の発芽率を除く全ての調査項目で、系統間に観察調査事項における相違あるいは測定調査事項における統計学的有意差は認められなかった (別添資料7, p.8, 表2~p.11, 表4)。他方、栽培試験用種子の発芽率に関して系統間に統計学的有意差が認められたものの、これらの栽培試験用種子は採種地が異なり、対照品種の場合、収穫前の天候不順により  
25 GHB614ほど発芽率の高い種子が得られなかったものと考えられた。また、収穫種子及び風乾種子の発芽率には統計学的有意差は認められなかったことから、栽培試験用種子に認められた発芽率の差は遺伝子組換えによる影響ではないと考えられる (別添資料7, p.11, 表4及びp.19, 表9)。よって、形態及び生育の特性に関して、  
GHB614と対照品種は同等であると考えられる。

30 成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率については、全ての調査項目において、系統間に相違あるいは統計学的有意差は認められなかった (別添資料7, p.11, 表4, p.14, 図9及びp.19, 表9)。よって、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率に関して、GHB614と対照品種は同等であると考えられる。

5 生育初期における低温耐性については、5℃・10時間明条件下での萎縮程度について経時的に達観評価を行った。その結果、全ての調査時において両系統の萎縮程度に統計学的有意差は認められず、低温条件に移してから24日目には全ての株の枯死が確認された（別添資料6, p.9, 表13）。よって、GHB614の生育初期における低温耐性は宿主品種と同等であると考えられる。

10 また、GHB614は除草剤グリホサート耐性を有するが、自然環境下において除草剤グリホサートが散布されるような状況は考え難いことから、本形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

15 以上から、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

15

—

#### (3) 影響の生じやすさの評価

20

—

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

25 以上から、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

## 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

30

GHB614の種子には非組換えワタの種子と同様に、非反芻動物に対して毒性を示すゴッシポール及び飽和脂肪酸の脱飽和を阻害して鶏卵の変色やふ化率の低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、野生動物がワタの種子

を摂食するという例は報告されていない。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

除草剤グリホサートは、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路において、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生ずる可逆反応を触媒する酵素である、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 蛋白質と特異的に結合してその活性を阻害する。これにより、芳香族アミノ酸の合成が阻害されて植物体は枯死する。

10 一方、GHB614に導入された*2mepsps*遺伝子は、トウモロコシ (*Z. mays*) からクローニングされた*epsps*遺伝子の2ヶ所のヌクレオチドが点突然変異により置き換えられたものであり、この改変により、*2mepsps*遺伝子がコードする2mEPSPS蛋白質の除草剤グリホサートに対する結合親和性が低くなる。このため、除草剤グリホサートの存在下でもシキミ酸合成が正常に機能し、植物は枯死しない。

15 2mEPSPS蛋白質のこれらの基質に対する親和性について、EPSPS蛋白質と比較した結果、いずれもほぼ同等のKm値を示した (表2, p.15) ことから、2mEPSPS蛋白質はEPSPS蛋白質と同じ基質特異性を有すると考えられる。また、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く (文献14)、高い基質特異性を有している。

20 また、通常40倍のEPSPS蛋白質を産生する植物培養細胞において、芳香族アミノ酸は過剰に合成されなかったことが報告されている (文献38)。このことは、EPSPS蛋白質がシキミ酸経路の律速酵素ではないことを示唆している。2mEPSPS蛋白質ばかりでなくEPSPS蛋白質を産生すると考えられるGHB614の種子における芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン) の含有量は、除草剤グリホサートの散布の有無にかかわらず、宿主品種の種子と比較して統計学的有意差は認められなかった (表3, p.16; 別添資料8, p.10, Table 2)。

25 以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

30 また、本蛋白質のアミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索及びエピトープ検索を行った結果、既知の毒素又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

さらに、我が国の隔離ほ場試験において、根から分泌され他の植物に影響を及ぼ

すものについては後作試験、植物体内に有し、枯死した後に他の植物に影響を及ぼすものについては鋤込み試験、根から分泌され土壌微生物相に影響を及ぼすものについては土壌微生物相試験を行った。その結果、いずれの調査項目においても、GHB614と対照品種の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料7, p.16, 表5 6～p.18, 表8）。

以上から、GHB614が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、有害物質の産生性に関し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。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

15

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

20 以上から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

### 3 交雑性

25 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国において、GHB614の宿主が属する種であるワタ (*G. hirsutum*) と交雑可能な近縁種野生種は自生していないため、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。

30

(2) 影響の具体的内容の評価

—



(3) 影響の生じやすさの評価

—

5

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、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した。

10 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性質はないと考えられる。

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国においてGHB614の商業栽培は行わないため、生物多様性影響が生ずる可能性は、運搬中にこぼれ落ちた種子が生育し、自生する場合に限られる。しかし、  
5 ワタ(*G. hirsutum*)は我が国において長期にわたり輸入され、加工用として使用されてきた経験があるが、自然環境下において自生化したという報告はなされていない。

競合における優位性に関わる形質について、2008年の我が国での隔離ほ場試験並びに2007年の我が国での特定網室試験において調査した結果、GHB614の競合にお  
10 ける優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、GHB614は、*2mepsps*遺伝子の発現により除草剤グリホサート耐性を示すが、自然環境下において除草剤グリホサートが選択圧となる可能性は考え難い。したがって、本形質により競合における優位性を高めることはないと考えられた。

以上から、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはない  
15 と判断した。

有害物質の産生性に関して、GHB614の種子には既存のワタの種子と同様に、非反芻動物に対して毒性を示すゴッシポール及び飽和脂肪酸の脱飽和を阻害して鶏卵の変色やふ化率の低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しか  
20 し、野生動物がワタの種子を摂食するという例は報告されていない。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

GHB614が遺伝子組換えにより新たに発現する2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列はEPSPS蛋白質と極めて高い相同性を有しており、2mEPSPS蛋白質の基質に対する親  
25 和性についてEPSPS蛋白質と比較した結果、同様に高い親和性を示した。また、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く、高い基質特異性を有している。

また、通常40倍のEPSPS蛋白質を産生する植物培養細胞において、芳香族アミノ酸は過剰に合成されなかったことが報告されている。このことは、EPSPS蛋白質がシキミ酸経路の律速酵素ではないことを示唆している。2mEPSPS蛋白質ばかりで  
30 なくEPSPS蛋白質を産生すると考えられるGHB614の種子における芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン)の含有量は、除草剤グリホサ

一トの散布の有無にかかわらず、宿主品種と比較して統計学的有意差は認められなかった。

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

5 また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索及びエピートープ検索を行った結果、既知の毒素又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

さらに、我が国での隔離ほ場試験において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの調査項目においても、GHB614と対照品種の間に統計学的有意差は認められなかった。

10 以上から、GHB614が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、有害物質の産生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した。

交雑性に関して、我が国には、GHB614の宿主が属する四倍体ワタ (*G. hirsutum*) と交雑する可能性のある野生植物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した。

15 以上を総合的に評価し、GHB614を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

- 別添資料 1 pTEM2 の説明  
(Description of vector pTEM2)  
5 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 2 GHB614 に移入された核酸の塩基配列  
(Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium*  
10 *hirsutum* transformation event GHB614)  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 3 移入された核酸の確認  
(特性・後代への伝搬の安定性・T-DNA 外配列の移入の確認)  
15 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 4 各組織における 2mEPSPS 蛋白質の発現  
(2mEPSPS protein contents in leaf, stem, root, square, apex and pollen  
20 tissues during the life cycle of glyphosate tolerant cotton event GHB614)  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 5 有毛種子における 2mEPSPS 蛋白質の発現  
(Analyses of raw agricultural commodity (fuzzy seed) of cotton GHB614  
25 for 2mEPSPS protein, USA, 2005)  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 6 除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 の特定網室内における環境安  
全性評価試験  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 7 除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614 の隔離ほ場試験報告書  
30 社外秘情報につき非開示
- 別添資料 8 種子の成分分析  
(Statistical analysis of compositional data of fuzzy seed from first year  
35 field trials of Glytol Cotton, event GHB614, USA 2005)  
社外秘情報につき非開示
- 別添資料 9 イベント識別方法  
(*Gossypium hirsutum* elite event GHB614 discriminating PCR protocol)  
40 社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成 21 年 7 月 16 日

5 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社  
代表取締役社長 ジョン グレイ  
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

10 第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性ワタ (*2mepsps, Gossypium hirsutum* L.) (GHB614, OECD UI: BCS-GH002-5) (以下、「GHB614」とする。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合は、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。なお、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合とは、GHB614に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

15

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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。

危機対策本部	
(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	Bayer CropScience, BioScience

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社はGHB614穀粒の我が国への輸入業者、我が国においてGHB614穀粒を配給した業者、輸入したGHB614穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

25

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

30 確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づき、適切に、弊社は上記2で明らかにしたGHB614穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいてGHB614穀粒を我が国に配給している、またはその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

35

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

- 5 確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づき、適切に、弊社は上記2及び3において示した個人または団体に対し、GHB614を不活性化する措置またはGHB614の環境への放出を防止するための措置、並びに既に環境に放出されたGHB614の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

10 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的根拠に基づき、GHB614が我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認められた場合には、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

15