

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum*
L.) (MON88701, OECD UI : MON-88701-3)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書.....	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	4
① 和名、英名及び学名.....	4
② 宿主の品種名又は系統名.....	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯.....	4
(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	5
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	5
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	6
イ 基本的特性.....	6
ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	6
ハ 捕食性又は寄生性.....	7
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	7
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	7
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.....	7
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じる特性を有する場合はその程度.....	7
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	7
ホ 病原性.....	8
ヘ 有害物質の産生性.....	8
ト その他の情報.....	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	8
(1) 供与核酸に関する情報.....	8
イ 構成及び構成要素の由来.....	8
ロ 構成要素の機能.....	9
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	9
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	14
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	18
(2) ベクターに関する情報	25
イ 名称及び由来	25
ロ 特性	26
① ベクターの塩基数及び塩基配列	26
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	26
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	26
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	26
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	26
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	26
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	26
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	26
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	27
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	27
(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	29
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	29
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	31
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	31
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	31
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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	33
(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	33
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	33
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	33
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	35
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	36
(1) 使用等の内容	37
(2) 使用等の方法	37
(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	38
(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	38
(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	38
(6) 国外における使用等に関する情報	38
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	40
1 競合における優位性	40
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	40
(2) 影響の具体的内容の評価	40
(3) 影響の生じやすさの評価	40
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	40
2 有害物質の産生性	41
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	41
(2) 影響の具体的内容の評価	43
(3) 影響の生じやすさの評価	43
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	43
3 交雑性	43
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
(2) 影響の具体的内容の評価	43
(3) 影響の生じやすさの評価	43
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	43
4 その他の性質	44
第三 生物多様性影響の総合的評価	45
参考文献	47

緊急措置計画書.....	54
隔離ほ場試験計画書.....	56

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 9 月 13 日

5 農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 細野 豪志 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15 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	除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変 <i>dmo, bar, Gossypium hirsutum L.</i>) (MON88701, OECD UI: MON-88701-3)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	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
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地 名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を 取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であ ること及び管理責任者の氏名を明示した標識を 見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着 した土、本遺伝子組換えワタの種子等を洗浄し よって除去するための洗い場を設置していると ともに、当該ワタの隔離ほ場の外への流出を防 止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させる ための防風網を設置している。また、播種時及 び成熟期には防鳥網などを用いた鳥害防止策を 講じる。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えワタ及び比較対照のワタ以外 の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限 に抑える。 (2) 本遺伝子組換えワタを隔離ほ場の外に運搬 し、又は保管する場合は、当該ワタが漏出しな い構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺 伝子組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び 比較対照のワタを隔離ほ場内にすき込む等によ り、確実に不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作 業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等によ り、意図せずに本遺伝子組換えワタが隔離ほ場 の外に持ち出されることを防止する。 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮され るように、設備の維持及び管理を行う。

	<p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

生物多様性影響評価書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 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

10

和名：ワタ (アオイ科 *Gossypium* 属)

英名：cotton あるいは upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は Coker130 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

ワタ属の野生種は熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯に分布しており、Fryxell は野生の 2 倍体種をその地理的分布から、オーストラリア群 (11 種)、アフリカ・アラビア群 (8 種) 及びアメリカ群 (12 種) の 3 群にさらに分けている (Fryxell, 1984)。また、野生 2 倍体に加え、新大陸に自生する野生 4 倍体種には、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. mustelinium* (ブラジル北西部)、*G. darwinii* (ガラパゴス)、*G. lanceolatum* (メキシコ)、*G. barbadense* (アンチル列島、中南米) 及び *G. hirsutum* (中米) がある (Fryxell, 1984; Lee, 1984)。*G. hirsutum* の自生個体が群生していることは稀で、多くの場合海岸沿い、ないしは小島に分散して生育している (Lee, 1984)。

30

なお、わが国において *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の植物の自然分布は報告されていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

35

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ワタ属のうち栽培種は 4 種に分けられ、旧大陸の「アジア綿」と総称される 2 倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、及び新大陸の複 2 倍体種 (2n=52) で「陸地綿、アメリカ綿、メキシコ綿」として知られる *G. hirsutum*、
5 「ピマ綿、超長繊維 (ELS) 綿、海島綿、エジプト綿、クレオール綿、インド綿」として知られる *G. barbadense* があり、個々に栽培品種化されてきた (Brubaker et al., 1999; Lee, 1984; OGTR, 2008; 原田, 1981)。

10 日本で古くから栽培されているワタはアジア綿の *G. arboreum* である。ワタの日本への伝来は、799 年にインド人によってもたらされたのが最初であるとされているが、このワタはすぐに消滅したようである。その後、文禄年間 (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、
15 明治 15~20 年頃には 10 万 ha、2 万 4 千トンの生産をみるにいたったが、その後、外綿の輸入に押されて次第に衰微した (原田, 1981)。現在では、ワタの日本国内における商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

20

ワタ属のうち栽培種は 4 種に分けられ、旧大陸の「アジア綿」と総称される 2 倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* はアフリカ及びアジアの乾燥地帯で、また、同じく 2 倍体種の *G. arboreum* は主にインドで栽培されている。

また、新大陸の複 2 倍体種 ($2n=52$) である *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* は、
25 主要な栽培ワタ種であり、世界的なワタの主要栽培地域であるアメリカ、ヨーロッパ、中国、アフリカ及びオーストラリアで栽培されている (Jenkins, 2003; Lee, 1984)。

米国農務省の統計情報に基づくと、2009/10 年の全世界におけるワタの栽培
30 面積は 3,015 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 1,026 万 ha、中国が 530 万 ha、米国が 305 万 ha、パキスタンが 300 万 ha となっている (USDA-FAS, 2010)。

摘採した実綿には種子がついており、これを繰綿機にかけて分離した綿毛 (lint) を綿花あるいは原綿と呼んでいる。綿花は綿糸・綿織物などの製綿用、あるいは綿火薬や充填用などに用いられる。実綿から綿毛を分離した残りが種子

(綿実) で、その表面につく平均 3~5mm の短い繊維 (短毛又は地毛) を脱リンター機でかき取ったものをリンターと呼ぶ。リンターは搾油工場で副産物として生産され、人造繊維や綿火薬の原料とされ、やや長いものは太糸の原料ともされる。リンターをとった種子 (綿実) は 17~23%の油分を含み、これを圧搾するか溶媒で抽出するかして種子油(綿実油)が得られる。種子 (綿実) 1t から約 130kg の種子油 (綿実油) が得られ、食用油のほかマーガリンや石鹼の原料などとして用いられる。搾油後の種子粕 (綿実粕) は精製して主に飼料や肥料として用いられる (原田, 1981)。

10 2010 年のわが国における種子 (綿実) の輸入量は 11 万 5,465 トンであり、そのうち約 64%がオーストラリア、約 35%が米国、約 0.6%がギリシャから輸入されている (財務省, 2010) 。これら全ての綿実は搾油用として用いられている (農林水産省, 2011)。

15 (3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

20 ワタは種子繁殖する多年生のアオイ科作物で、草丈は 1.0~2.0m に伸び、発育枝と結果枝を生ずる (OECD, 2008)。葉は主茎あるいは枝の軸にらせん状に交互につき、各結果枝は 6~8 個の花芽を付ける (OECD, 2008)。ワタは、基本的には自家受粉であるが、虫媒(例：蜂)による他家受粉も可能であることが知られている。ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから風により飛散する可能性は少ない(OECD, 2008)。

25 なお、栽培条件下では一年生農作物として栽培され、草丈に関しては 1~1.5m 程度に抑制される(OECD, 2008)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

30 ワタに最適な気温は 30~35°C である (OECD, 2008)。ワタは通常年降水量 1,000~1,500mm ぐらいのところであられるが、灌漑ができれば、降雨は少ないほうがよい (原田, 1981)。着蕾期及び開花期に多雨、日照不足、干ばつなどが起こると落蕾や落さくが増加する (平野, 1987)。ワタの栽培は主にオーストラリアやアルゼンチン北部などの北緯 37 度から南緯 32 度の間で行われているが、中央アジアや中国など北緯 43~45 度に至る地域でも栽培されている

(OECD, 2008)。ワタは様々な土壌で栽培されているが、生育に最適なものは有機質が多くて水分保持力が高く、水はけの良い耕作地である (OECD, 2008)。

ハ 捕食性又は寄生性

5

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

10 ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ワタのさくは 3~5 室で構成されている (OECD, 2008)。ワタの完熟したさくはさく皮が裂けて開じよするが、種子は綿毛に覆われているために脱粒性は低い (Llewellyn and Fitt, 1996)。また、種子の休眠期間は 2~3 ヶ月である (OECD, 15 2008)

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

20 ワタは塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、種子繁殖する。自然条件下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があるという報告はこれまでのところない。

25 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じる特性を有する場合はその程度

ワタの受粉様式に関しては、基本的には自家受粉である (Niles and Feaster, 1984)。虫媒による他家受粉も可能であることが知られており、その際の家受精率は 5~30%であったと報告されている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。

30 なお、わ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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

35 ワタ属の花粉の生産量は 1 花当たりおよそ 4 万 5,000 粒である (McGregor, 1976)。花粉は直径 101 μm 、刺状突起の長さは 12.1 μm 、刺状突起の密度は 1 μm^2 当たり 8.3×10^{-3} 本である (Kakani et al., 1999)。

ホ 病原性

—

5

ヘ 有害物質の産生性

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、種子を含む全植物組織の分泌腺に存在する(OGTR, 2008)。ゴシポールは哺乳動物の腹腔内臓器や肺に炎症を起こし、実験動物においては呼吸困難、麻痺を起こす毒性物質として知られている(生化学辞典, 2007)。

また、ワタにはジヒドロステルクリン酸、ステルクリン酸、マルバリン酸などのシクロプロペン脂肪酸(CPFA)が含まれており、種子の総脂質中のおよそ0.5~1.0%を占める(OECD, 2008)。本物質は鶏において卵黄の変色及びふ化率の低下などの有害な影響を及ぼすとされているが、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸はともに搾油工程において著しく減少する(OECD, 2009; OECD, 2008)。

なお、わが国において運搬の際にこぼれ落ちたワタが自生化したという報告はされていない。

ト その他の情報

—

25

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

モンサント・カンパニーは、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与された除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI: MON-88701-3) (以下、「本組換えワタ」という。)を作出した。

35 イ 構成及び構成要素の由来

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 1 (p10)及び表 1 (p11~13)に示した。

5 本組換えワタには *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子と *Streptomyces hygroscopicus* 由来の *bar* 遺伝子が導入されている。

10 本組換えワタに導入された *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO」とする。) のアミノ酸配列は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、CTP2 の切断を容易にする目的で N 末端配列から a¹番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。よって、本組換えワタに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 MON88701 DMO 蛋白質」とする。なお、改変 MON88701 DMO 蛋白質には N 末端側に葉緑体輸送ペプチド (chloroplast transit peptide、CTP2) 蛋白質由来の 9 アミノ酸が結合している。

15

本組換えワタに導入された *bar* 遺伝子から発現する PAT (phosphinothricin N-acetyltransferase) 蛋白質のアミノ酸配列は、*S. hygroscopicus* 由来の野生型 PAT 蛋白質 (以下、「PAT (*bar*) 蛋白質」とする。) と同一のものである。

20 本組換えワタにおいて発現する改変 MON88701 DMO 蛋白質と PAT (*bar*) 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

ロ 構成要素の機能

25 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

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1 (p11~13) に示した。

30

¹ 社外秘につき非開示

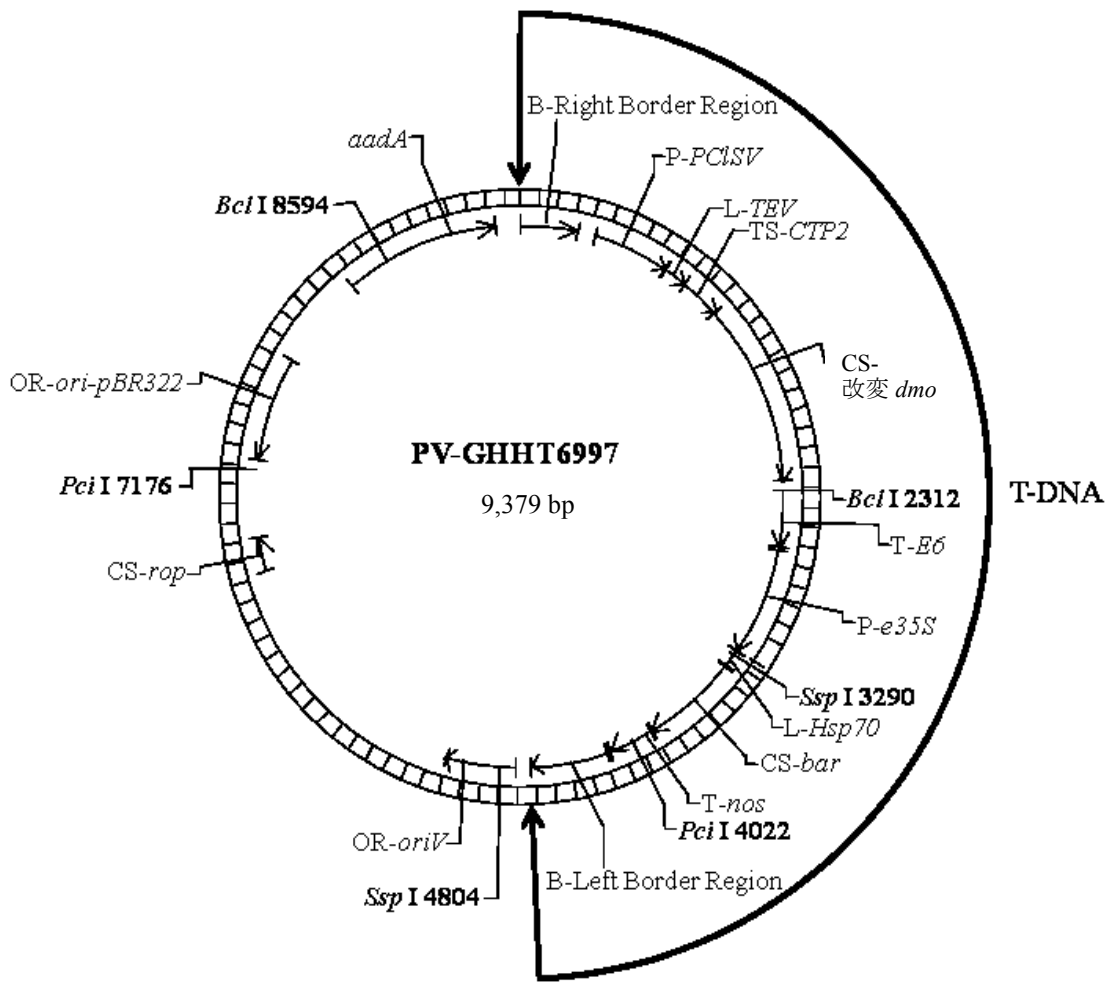


図1 PV-GHHT6997のプラスミドマップ²

²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能³

構成要素	由来及び機能
T-DNA	
B ^{注1} -Right Border Region	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} -PCISV	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の全ゲノムの転写によって生じる完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) の転写を誘導するプロモーターで、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
L ^{注3} -TEV	Tobacco Etch virus (TEV) 由来の 5' 末端非翻訳領域 (Niepel and Gallie, 1999)。遺伝子発現の調節に関与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注4} -CTP2	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Herrmann, 1995; Klee et al., 1987)。改変 <i>dmo</i> 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS ^{注5} -改変 <i>dmo</i>	ジカンバ耐性を付与する <i>S. maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Herman et al., 2005; Wang et al., 1997)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注6} -E6	<i>Gossypium barbadense</i> (ピマワタ) の初期繊維形成に関わる繊維蛋白質をコードする <i>E6</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域 (John, 1996)。mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>e35S</i>	2重エンハンサーを持つ (Kay et al., 1987)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のプロモーター (Odell et al., 1985)。植物細胞で恒常的に転写を誘導する。

³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
L- <i>Hsp70</i>	<i>Petunia hybrida</i> (ペチュニア) の熱ショック蛋白質 70 (HSP70) をコードする <i>DnaK</i> 遺伝子に由来する 5' 末端非翻訳領域 (Rensing and Maier, 1994; Winter et al., 1988)。遺伝子発現の調節に関与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィントリシン・アセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Thompson et al., 1987) を含む配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>nos</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (nos) 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
プラスミド外側骨格配列 (本組換えワタには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注7} - <i>ori V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサーのコード配列。 <i>Escherichia coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori-pBR322</i>	pBR322 由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。

表 1 (つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
プラスミド外側骨格配列(本組換えワタには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3'' (9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター及びコード配列並びに 3' 末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹B - Border (境界配列)

注²P - Promoter (プロモーター)

注³L - Leader (リーダー配列)

注⁴TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁵CS - Coding Sequence (コード配列)

注⁶T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁷OR - Origin of Replication (複製開始領域)

- 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

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

本組換えワタは、*S. maltophilia* 由来の改変 *dmo* 遺伝子が導入されており、改変 MON88701 DMO 蛋白質を発現している。改変 MON88701 DMO 蛋白質は、
10 本組換えワタに除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) 耐性を付与している。*S. maltophilia* は湿潤環境や土壌及び植物に偏在するグラム陰性細菌であり (Denton and Kerr, 1998)、DI-6 株は土壌より単離された (Krueger et al., 1989)。

15 DMO はジカンバから除草活性のない DCSA (3, 6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) への脱メチル反応を触媒する酵素で (Chakraborty et al., 2005)、この働きにより植物にジカンバ耐性を付与する (図 2, p15)。実際に、*dmo* 遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ並びにタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。
20

DMO は Rieske 型非ヘム鉄オキシゲナーゼ (Rieske-type non-heme iron oxygenase) の一種であり、還元酵素、フェレドキシンとともに三成分酸化還元系を構成する。これら 3 つの蛋白質は他の多くのオキシゲナーゼと同様に
25 酸化還元系において共役的に働き、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NADH) から酸素へ電子を運び、電子アクセプター基質 (この場合は除草剤ジカンバ) の脱メチル反応を触媒する (Chakraborty et al., 2005)。この酸化還元系を図 2 (p15) に示した。

30

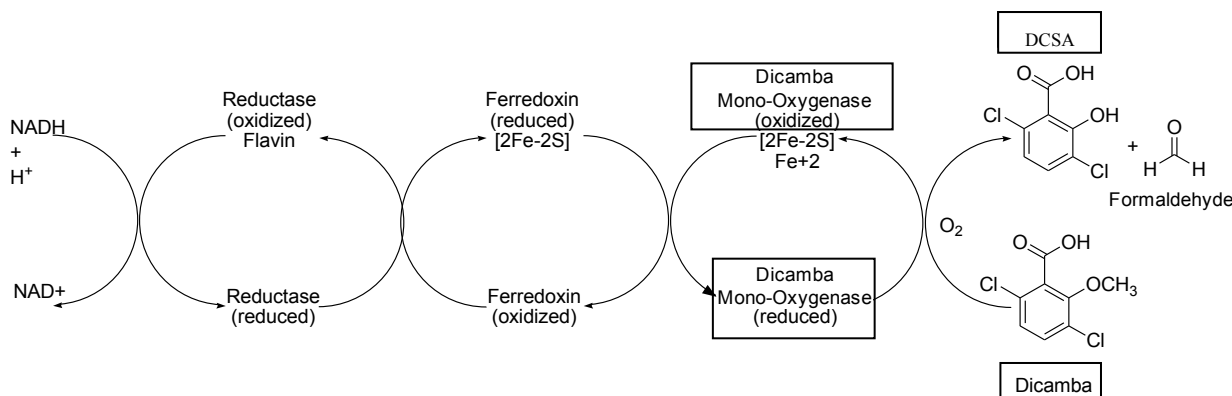


図 2 DMO の三成分酸化還元系⁴

図は NADH から DMO までの電子伝達系であり、ジカンバの脱メチル反応により DCSA が生成される

5

DMO の結晶構造は、C 末端側にヒスチジンタグが付加された DMO⁵を用いて解析されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO の結晶構造は 3 つの DMO 単量体からなる三量体であることが明らかとなっている (図 3, p16)。それぞれの単量体は Rieske [2Fe-2S] クラスタを含む Rieske [2Fe-2S] クラスタードメインと非ヘム鉄センターを含む非ヘム鉄センタードメインを有している (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。これらのドメインは全ての Rieske 型モノオキシゲナーゼに共通して存在し、電子伝達に関する主要なドメインであることが知られている (Ferraro et al., 2005)。

10

15

NADH から運ばれた電子は、内在性の還元酵素とフェレドキシンを介して末端 DMO へ伝達される (図 2, p15)。この電子が酸素を還元的に活性化し、ジカンバの脱メチル反応を触媒する。電子輸送は隣接する単量体の間で起こるため、DMO は単量体同士の間隔と配置が正しくなるよう三量体を形成する必要がある (D'Ordine et al., 2009)。単量体内では Rieske [2Fe-2S] クラスタードメインと非ヘム鉄センタードメインの距離が離れているため、電子伝達が起こらない (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

20

⁴本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

⁵結晶構造解析に供試された DMO は、C 末端側にヒスチジンタグが付加されていること、及びクローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したために N 末端側から 2 番目の位置にアラニンが挿入されていることを除けば、野生型 DMO と同じ配列である。

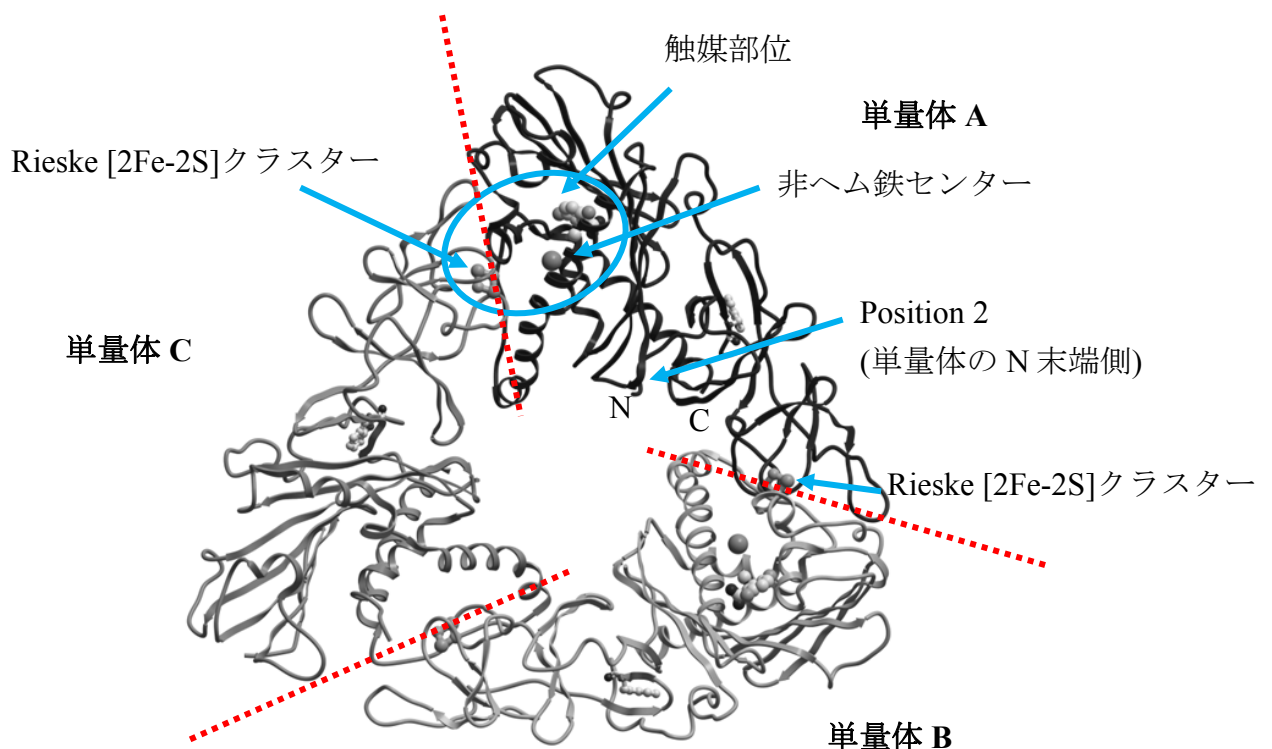


図 3 DMO の結晶構造⁶

- 5 DMO の結晶構造かつ活性型である三量体の模式図 (D'Ordine et al., 2009)。非ヘム鉄センターを含む非ヘム鉄センタードメイン、N 末端と C 末端、Rieske [2Fe-2S] クラスタを含む Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインなどの特徴的な構造を単量体 A に記した。単量体 A と単量体 C が形成する触媒部位は青い丸で囲っている。また、単量体 C の Rieske [2Fe-2S] クラスタも矢印で記した。電子移動は隣接する単量体間で起こるため、単量体 C の Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと単量体 A の非ヘム鉄センタードメインとの間で電子移動が起こる。赤い点線は、隣接している非ヘム鉄センタードメインと Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインのサブユニット間で電子移動が起こる接合部分を表しており、単量体同士の境界線上を示している。なお、結晶構造解析に供試された DMO は、野生型 DMO や MON88701DMO 蛋白質ではなく、C 末端側にヒスチジンタグが付加されており、N 末端側から 2 番目の位置にアラニンが挿入されている (アミノ酸配列の改変については図 4, p20 を参照)。

⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

前述 (p15) したように、本組換えワタが除草剤ジカンバに対して耐性を持つためには、本組換えワタ内で発現する改変 MON88701 DMO 蛋白質が本組換えワタ内で三量体を形成する必要がある。本組換えワタが除草剤ジカンバに対する耐性を持つこと、及び大腸菌から産生・精製された改変 MON
5 88701 DMO 蛋白質にジカンバに対する脱メチル化酵素活性が確認されていることから、本組換えワタ内においても DMO 三量体が形成され、機能していると考えられた。

改変 MON88701 DMO 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ
10 酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース(AD_2011⁷)を用いて FASTA 型アルゴリズム及び 8 つの連続するアミノ酸による相同性検索を行ったが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

【PAT(*bar*)蛋白質】

15 本組換えワタには、*Streptomyces hygroscopicus* 由来の *bar* 遺伝子が導入されており、ホスフィノトリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (PAT) 蛋白質を発現する。PAT (*bar*) 蛋白質は除草剤グルホシネート (2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl) butanoic acid) への耐性を付与する (Thompson et al.,
20 1987)。

グルホシネートは、グルタミン合成酵素と結合することにより除草活性を発揮する。グルタミン合成酵素は光呼吸により生成されたアンモニアを植物に同化させる主要酵素である。グルホシネートがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が阻害されて、植物体内にアンモニア
25 の毒性が蓄積し、枯死する (Manderscheid and Wild, 1986; Wild and Manderscheid, 1984)。

本組換えワタから産生される PAT (*bar*) 蛋白質はグルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素
30 の働きでアセチル化されると、除草活性のない N-アセチルグルホシネートとなる。N-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素と結合できないため、光呼吸を阻害せず、アンモニア蓄積が回避される。本組換えワタは、PAT (*bar*) 蛋白質の産生により、除草剤グルホシネートが散布されても植物

⁷ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2011) に登録されている配列からなるデータベースで、2010年12月の時点で、1,491件のアミノ酸配列が含まれる。

は枯死しない。

5 PAT (*bar*) 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、アレルゲンデータベース (AD_2011)⁸を用いて FASTA 型アルゴリズム及び 8 つの連続するアミノ酸による相同性検索を行ったが、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列は認められなかった。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

10 改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT(*bar*)蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかを検討した。

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

15 一般的に酵素の基質特異性は、酵素触媒反応に必要な構造の有無によって定まる。DMO のジカンバへの特異性は触媒部位で起こる特定の相互作用によるものである(D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO によるジカンバの代謝の結晶構造解析の結果によると、ジカンバのカルボキシル基と塩素原子が DMO の触媒部位に位置するアミノ酸と作用する (Dumitru et al., 2009)。カルボ
20 キシル基は DMO の触媒部位において、アミノ酸と 6 つの水素結合を形成している。この水素結合は、酵素と基質の結合に重要な役割を果たしている。一方、塩素原子は基質を正しい位置に安定させる役割を持つ。これらの相互作用は DMO 結晶解析において DMO の触媒部位にジカンバが存在するときに確認されている。したがって、ジカンバのベンゼン環だけでなく、これらの化学基も、
25 触媒作用に必要な基質の正しい配置に非常に重要な役割を果たすことが示されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。なお、D'Ordine et al. (2009) 及び Dumitru et al. (2009) によって解析された DMO は、野生型 DMO 蛋白質の N 末端側から 2 番目にアラニンが挿入され、C 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (以下、「C 末端 his-DMO 蛋白質」とする。) (図 4, p20)。

30

上述の DMO の触媒部位に関する研究から、構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) は DMO の基質となる可能性がある。改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性の確認のため、米国において、

⁸ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2011) に登録されている配列からなるデータベースで、2010年12月の時点で、1,491件のアミノ酸配列が含まれる。

1) 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)、及び 2) ワタ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B) を行った。

5 なお、試験ごとに供試材料が異なることから、まず以下の I で供試材料について記述した。次に II では試験結果の概要について記載し、III では改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性、及び改変 MON88701 DMO 蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかどうかについて考察した。

I. 供試材料について

試験 A (*in vivo*) には本組換えワタと対照の非組換えワタ Coker130 を供試した。試験 B (*in vitro*) に供試した DMO 蛋白質 (以下、「N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質」とする。) は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質 (図 4, p20) の N 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (図 4, p20)。したがって、*in vitro* の試験に供試した DMO 蛋白質と、本組換えワタ中で発現している改変 DMO 蛋白質との違いは、ヒスチジンタグの有無と、アミノ酸配列の N 末端側から a⁹ 番目のロイシンの有無のみである (図 4, p20)。a¹⁰ 番目のアミノ酸やヒスチジンタグの位置は DMO の触媒部位から立体構造的に離れており、またヒスチジンタグは一般的に蛋白質の構造には影響しないといわれていることから (Carson et al., 2007)、これらのアミノ酸配列の違いは DMO の基質特異性や *in vitro* での試験結果には影響しないと考えられた。なお、試験 B には、基質特異性の解析に用いた DMO 蛋白質と同様の特異性を改変 MON88701 DMO 蛋白質が持つかを評価するために、大腸菌で産生・精製した改変 MON88701 DMO 蛋白質も供試した。

【社外秘につき非開示】

20

図 4 野生型 DMO 蛋白質、改変 MON88701 DMO 蛋白質、試験 A~B に供試した DMO 蛋白質におけるアミノ酸配列の比較

25

【社外秘につき非開示】

30

⁹社外秘につき非開示

¹⁰社外秘につき非開示

II. 試験の結果

II-1. 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)

A. 各種除草剤散布試験 (*in vivo*)

5 本組換えワタ及び対照の非組換えワタ品種 Coker130 を供試し、作用機作の異なる 8 グループ 10 種の除草剤の散布試験を行った (表 2, p23)。米国の温室において栽培した発芽前又は 2 葉期~5 葉期のワタ各系統 10 個体に対し、各除草剤を 2 段階の散布薬量で散布し、散布後 20 日目から 22 日目の間に除草剤による傷害程度を調査して除草剤耐性を評価した。

10 その結果、本組換えワタは供試した除草剤 10 種のうち、除草剤ジカンバに対し強い耐性を示した (別添資料 2 の Table 2, p6; 表 2, p23)。それ以外の除草剤に対しては、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で除草剤による傷害程度に差は認められなかった。

15 なお、本組換えワタと同じく *S. maltophilia* に由来する改変 *dmo* 遺伝子を導入した除草剤ジカンバ耐性ダイズ(MON87708 系統)は、ジカンバと同じ人工オーキシニン型除草剤である 2,4 ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D)、2-メチル-4-クロロフェノキシ酢酸 (MCPA) 及び 2,4-ジクロロフェノキシ酪酸 (2,4-DB) (表 2, p23) に対して弱い耐性を示したが、本組換えワタは 2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB に対して耐性を示さなかった (別添資料 2 の Table 2, p6)。これは、ワタはダイズよりも 2,4-D の代謝能が低く、そのため 2,4-D に対する感受性が高い(Chkanikov et al., 1975; Chkanikov et al., 1976; Staten, 1946) ことが理由であると考えられた。

25 ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統が 2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB に対して弱い耐性を示した理由は、DMO 蛋白質がこれらの除草剤成分を代謝したからではなく、これらの除草剤成分の一部が DMO 蛋白質に結合することで植物体に作用する除草剤の有効成分が減少したためであると考えられた。本組換えワタ中で発現する改変 MON88701 DMO 蛋白質の触媒部位の構造及びアミノ酸配列はジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統中で発現する改変 DMO 蛋白質の触媒部位のものと同一であることから、2,4-D、MCPA 及び 2,4-DB は改変 MON88701 DMO 蛋白質にも結合すると考えられた。しかしながら、ワタはダイズよりも 2,4-D に対して感受性が高いため、植物体に作用する除草剤の有効成分が DMO 蛋白質に結合することにより減少しても傷害程度に差が見られなかったと考えられた。

II-2. ワタ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B)

B. ワタ内在性化合物の DMO による代謝試験 (*in vitro*)

上述 (p18) したように、DMO の基質になり得る化合物は構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) のみであると考えられた。よって、ワタ内在性化合物のうち構造的にジカンバに類似し、かつメトキシ及びフェニルカルボキシル部分を有する化合物として特定することができた 5 種 (*o*-アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸及びシナピン酸) を供試し、DMO 蛋白質による代謝試験を行った (別添資料 3 の Figure 1, p4; 図 5, p22)。

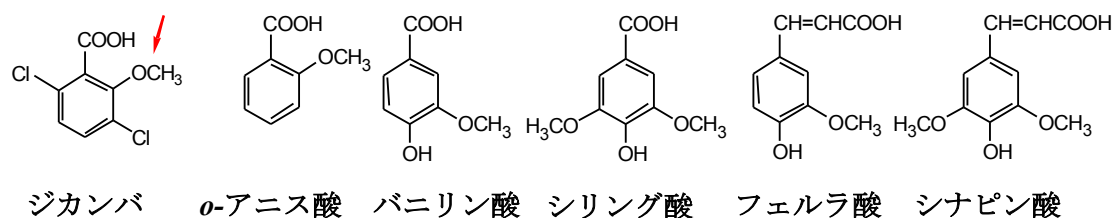


図 5 DMO を用いて *in vitro* で供試したジカンバ及び潜在的な内在性基質¹¹
赤い矢印は DMO により取り除かれるメチル基を示す。

上記の内在性化合物をそれぞれ N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含む反応溶液と N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含まない反応溶液に添加してインキュベートした後、反応溶液の LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行い、DMO 蛋白質により、添加した化合物が減少するか、又は添加した化合物から他の化合物が生成されるかどうかを調査した。その結果、いずれの分析においてもジカンバは減少したが 5 種の内在性化合物の減少は見られず、その他の化合物も検出されなかった (別添資料 3 の Figure 3~5, p10~12)。

なお、大腸菌から産生・精製した改変 MON88701 DMO 蛋白質を、最もジカンバと構造的類似性を有する内在性化合物である *o*-アニス酸と反応させた。その結果、*o*-アニス酸は改変 MON88701 DMO 蛋白質により代謝されなかった (別添資料 4 の Figure 3, p9)。また、供試された DMO 蛋白質におけるアミノ酸配列のわずかな違いは、改変部位が DMO の触媒部位から離れているため、基質特異性に影響しないと考えられた (図 3, p16)。

以上の結果から、改変 MON88701 DMO 蛋白質がワタ内在性化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することはないと考えられた。

¹¹本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

III. 改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性及び改変 MON88701 DMO 蛋白質の宿主の持つ代謝系への影響の考察

- 5 以上の各種除草剤と改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)、及びワタ内在性化合物と DMO 蛋白質及び改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B) の結果から、改変 MON88701 DMO 蛋白質が除草剤ジカンバ以外の化合物を代謝し、宿主であるワタ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た。

10

表 2 本組換えワタに対する各種除草剤散布試験に供試した除草剤¹²

除草剤活性成分	除草剤の種類 (作用機作) ¹
ジカンバ	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-D	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-DB	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
アセトクロール	クロロアセトアミド系 (超長鎖脂肪酸合成阻害)
アトラジン	トリアジン系 (光化学系 II 阻害)
オキシフルオルフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
ハロスルフロン	スルホニルウレア系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
トリフルラリン	ジニトロアニリン系 (紡錘体微小管形成阻害)
パラコート	ビピリジリウム系 (光化学系 I 電子転換)
グリホサート	グリシン系 (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素阻害)

¹(HRAC, 2009)

<http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx>

15

¹²本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

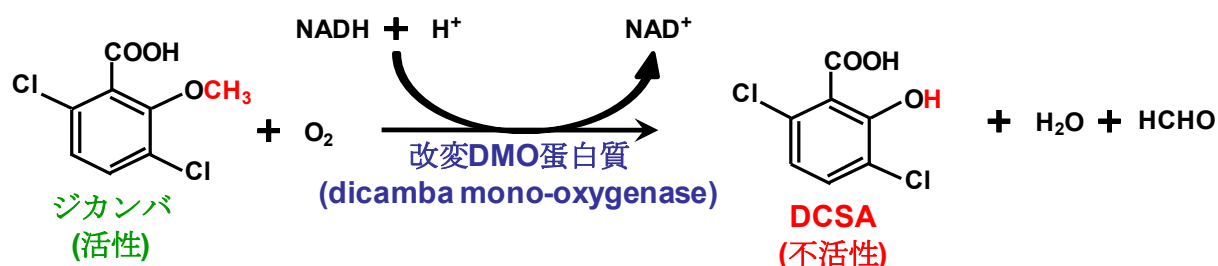
【PAT (*bar*) 蛋白質】

PAT (*bar*) 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT (*bar*) 蛋白質が他の L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT (*bar*) 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが競合アッセイにおいて示された。さらに、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸の存在下においても、PAT (*bar*) 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。これらのことから PAT (*bar*) 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

【改変 MON88701 DMO 蛋白質+PAT (*bar*) 蛋白質】

本組換えワタには、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が存在する。上述したように、これら蛋白質に触媒される化学反応は大きく異なる。さらに、それぞれの化学反応の基質及び代謝物は全く違うものである。したがって、改変 MON88701 DMO 蛋白質と PAT (*bar*) 蛋白質が、植物体内において相互に影響する可能性はないと考えられる (図 6, p25)。

<ジカンバ不活性化>



5 <グルホシネート不活性化>

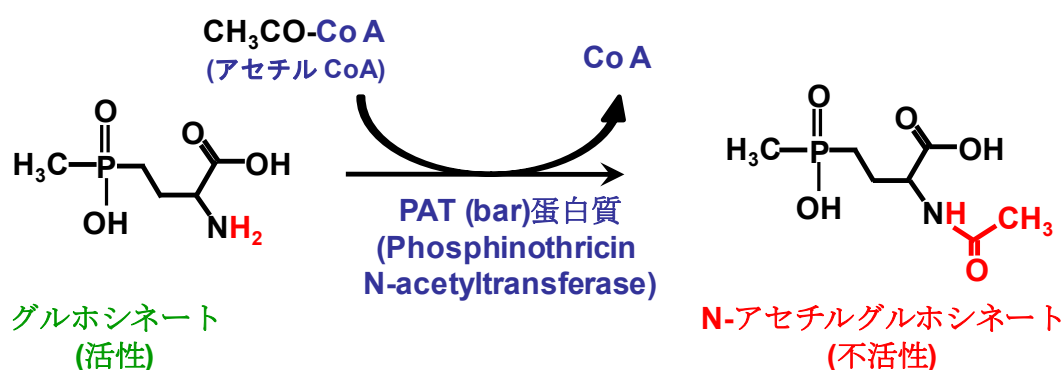


図6 改変 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の基質と代謝物¹³

10

以上、それぞれの酵素反応が異なること、それぞれの基質の構造が全く異なることから、本組換えワタで発現している改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

15

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

20

本組換えワタの作出に用いられたベクターPV-GHHT6997は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

¹³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5 本組換えワタの作出に用いられた PV-GHHT6997 の全塩基数は 9,379bp である。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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
15 情報

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

20

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

25 宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 1 (p11~13)に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1(p10)に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30 プラスミド・ベクター PVGHHT6997 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって、非組換えワタ品種 Coker 130 の胚軸に導入した。

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

35

非組換えワタ品種 Coker130 の胚軸から採取した分裂組織とプラスミド・ベ

クターPV-GHHT6997 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、除草剤グルホシネートを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

- 5 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

10 カルベニシリン及びセフトキシムを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。なお、本組換えワタにアグロバクテリウムが残存していないことは、カルベニシリン及びセフトキシム無添加の培地に本組換えワタを移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

- 15 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

20 形質転換された再分化個体 (R0) に、除草剤ジカンバ (0.56 kg a.e./ha) 及び除草剤グルホシネート散布 (0.59 kg a.e./ha) を行い、改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子を有する個体を選別した。その後、枯死しなかった R0 個体を自殖し、その後代である R1 世代において 1 コピーの T-DNA 領域 (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) をホモで有する個体を、TaqMan PCR 法を用いて選抜した。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に最終的に本組換えワタを選抜した。

25 本組換えワタの育成図を図 7 (p28) に示した。なお、本申請の対象は、R3 世代及び R3 世代から派生する全ての後代交配種である。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

20

図7 本組換えワタの育成図

25

【社外秘につき非開示】

30

(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

5 本組換えワタの T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) が染色体上に存在し、メンデルの法則に従って遺伝しているかを調べるため、本組換えワタの R1、BC1F1、BC1F2 世代において、T-DNA の分離比をカイ二乗検定で分析した。

10 試験に供試する 3 世代 (R1、BC1F1、BC1F2; 図 7, p28) を作出するために、まず形質転換された再分化個体(R0)を自殖し、その後代である R1 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA の分離比を確認した。さらに R3 世代から T-DNA をホモで有する本組換えワタ 8 個体を、T-DNA を持たないワタ系統 DP0949¹⁴と交配して F1 世代を作出した。F1 世代から T-DNA をヘテロで有する 15 個体と DP0949 を交配して BC1F1 世代を作出した。

15 BC1F1 世代において除草剤グルホシネート散布をすることで、T-DNA をヘテロで有する個体を選抜し、End-Point TaqMan PCR 法により確認した。BC1F1 世代から T-DNA をヘテロで有する 25 個体を自殖し、BC1F2 世代を作出した。BC1F2 世代において除草剤グルホシネート散布、End-Point TaqMan PCR 法により T-DNA の有無を確認した分離比を用いて、カイ二乗検定を行

20 った。

カイ二乗検定の結果、分析を行った 3 世代において実測値と期待値の間に統計学的有意差は認められなかった (表 3~表 4, p30; 別添資料 5 の Table1~2, p7)。したがって本組換えワタの T-DNA は染色体上に存在していると考えられた。

¹⁴ DP0949: 改変*dmo*遺伝子発現カセット及び*bar*遺伝子発現カセットを持たないワタ品種 (除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ MON 88913 x 15985 系統)

表3 本組換えワタの R1 及び BC1F2 世代における T-DNA の分離比¹⁵

世代	供試 個体数 ¹	実測値			1:2:1 の分離比の期待値			χ^2	p値 ⁴
		陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数		
R1 ²	173	33	99	41	43.25	86.50	43.25	4.35	0.114
BC1F2 ³	118	36	56	26	29.50	59.00	29.50	2.00	0.368

¹ R1 世代の 173 個体は 1 個体の親世代、BC1F2 世代の 118 個体は 25 個体の親世代から得られた。

² 実測値は Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

³ 実測値は End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

⁴ 上記 2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p≤0.05)。

表4 本組換えワタの BC1F1 世代における T-DNA の分離比¹⁶

世代	供試 個体数 ¹	実測値		1:1 の分離比の期待値		χ^2	p 値 ³
		陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数		
BC1F1 ²	261	123	138	130.50	130.50	0.86	0.353

¹ BC1F1 世代の 261 個体は 15 個体の親世代から得られた。

² 実測値は除草剤グルホシネート散布 (0.59 kg a.e./ha) 及び End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

³ BC1F1 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (p≤0.05)。

¹⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えワタのゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており(別添資料 6 の Figure 4~6, p37~39)、複数世代(R2~R6 世代)にわたり安定して後代に遺伝していることが確認された(別添資料 7 の Figure 4, p24)。また、外側骨格は導入されていないことが確認された(別添資料 6 の Figure 7, p40)。

10

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

1 コピーなので該当しない(別添資料 6 の Figure 4~6, p37~39)

15

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

20 ウェスタンブロット分析により、本組換えワタの複数世代(R2~R6 世代)にわたり改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が安定して発現していることが確認された(別添資料 7 の Figure 5~6, p25~26)。

25 また、2010 年に米国の 3 ヲ所(テキサス州ヘイル郡 1 ヲ所、ジョージア州ティフト郡 1 ヲ所、サウスカロライナ州バーンウェル郡 1 ヲ所)のほ場において、4 反復で育成した本組換えワタの葉(*over-season leaf*: OSL2)及び種子での改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した(別添資料 8)。その結果、本組換えワタの葉及び種子において、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の発現が確認された(表 5~表 6, p32; 別添資料 8 の Table 1~2, p12~13)。

30

表 5 本組換えワタの葉 (OSL2) 及び種子における改変 MON88701 DMO 蛋白質の発現量 (2010 年、米国)¹⁷

供試部位	平均値 (SD) ¹ 範囲 ² (µg/g 新鮮重)	平均値 (SD) 範囲 (µg/g 乾燥重) ³	LOD/LOQ ⁴ (µg/g 新鮮重)
葉(OSL2) ⁵	44 (15) 19 – 65	260 (91) 110 – 380	0.168/0.313
種子	20 (2.7) 17 – 26	22 (2.9) 19 – 28	0.059/0.313

¹平均値及び標準偏差 (SD) を算出した (n=12 (1サンプル/反復、4反復/ほ場で3ほ場))。蛋白質発現量を新鮮重ベースで組織重量 (g) 当たりの蛋白質重量 (µg) で表した。

5 ²最小値及び最大値は、各組織について算出した。

³蛋白質発現量を µg/g 乾燥重 で表した。乾燥重は µg/g 新鮮重 を水分分析データから得た乾燥重変換係数で割って算出した。

⁴LOQ=定量限界; LOD=検出限界

⁵4 葉期~6 葉期

10

表 6 本組換えワタの葉(OSL2) 及び種子における PAT (*bar*) 蛋白質の発現量 (2010 年、米国)¹⁸

供試部位	平均値 (SD) ¹ 範囲 ² (µg/g 新鮮重)	平均値 (SD) 範囲 (µg/g 乾燥重) ³	LOD/LOQ ⁴ (µg/g 新鮮重)
葉(OSL2) ⁵	1.2 (0.32) 0.68 – 1.6	6.8 (1.9) 3.8 – 9.4	0.162/0.188
種子	5.7 (0.61) 4.8 – 7.0	6.2 (0.67) 5.2 – 7.6	0.032/0.188

¹平均値及び標準偏差 (SD) を算出した (n=12 (1サンプル/反復、4反復/ほ場で3ほ場))。蛋白質発現量を新鮮重ベースで組織重量 (g) 当たりの蛋白質重量 (µg) で表した。

15 ²最小値及び最大値は、各組織について算出した。

³蛋白質発現量を µg/g 乾燥重 で表した。乾燥重は µg/g 新鮮重 を水分分析データから得た乾燥重量変換係数で割って算出した。

⁴LOQ=定量限界; LOD=検出限界

⁵4 葉期~6 葉期

¹⁷本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(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

10

本組換えワタは、本組換えワタに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、End-Point TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 9)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10 ng であることが推奨されており、種子 1 粒を用いて検定できる。

15 本法の再現精度については 90 粒の本組換えワタ及び 89 粒の非組換えワタを用いて確認試験を行った(別添資料 9)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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

25 本組換えワタへ導入された改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子は改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質を発現することにより、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

30 従来ワタでは、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの散布は播種前における雑草茎葉処理に限られていた。しかし、本組換えワタは除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対して抵抗性を持つため、ジカンバ及びグルホシネートの散布適期幅が広がった。ジカンバにおいては播種後から発芽までの雑草茎葉処理に加え、発芽後から収穫7日前までの生育期における処理が可能となり、グルホシネートにおいては、播種後から発芽までの雑草茎葉処理に加え、発芽後から開花初期までの生育期における処理が可能となる。なお、本組換えワタが商品化された際に予定されている本組換えワタに対する除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの使用体系を表 7 (p34) に示した。

35

表7 本組換えワタに対する除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの使用体系¹⁹

	散布時期				
	発芽前処理	茎葉処理			
		4節	8節	12節	収穫7日前
最大使用体系 ¹	1.12 kg a.e./ha ³ ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.89 kg a.e./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.59 kg a.e./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.59 kg a.e./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ
通常の雑草種に 対する 推奨使用体系	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.59 kg a.e./ha グルホシネート	散布しない	散布しない
難防除雑草種に 対する 推奨使用体系 ²	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.59 kg a.e./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ 又は 0.59 kg a.e./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ

¹ 生育段階ごとの最高使用薬量を示した。栽培期間中におけるジカンバの総使用量の上限は 2.24 kg a.e./ha、グルホシネートは 1.79 kg a.e./ha である。

² 雑草の発生時期が遅い場合を含む。

³ a.e.; acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性成分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

¹⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

除草剤ジカンバは 95 種以上の一年生及び二年生雑草を効果的に防除し、100 種を超える多年生の広葉及び木本の植物種の生育を抑制する。除草剤グルホシネートは、約 120 種の広葉及びイネ科雑草を防除する広域接触型非選択的除草剤である。また、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートはブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*)、ヒメムカシヨモギ(*Conyza canadensis*) やオオホナガアオゲイトウ(*Amaranthus palmeri*) など除草剤グリホサートに抵抗性を持つ雑草も防除することができる。

- 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

15 本組換えワタの宿主は非組換えワタ品種 Coker130 であり、導入遺伝子は改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子である。

宿主であるワタについて、わが国に交雑可能な近縁野生種は存在しない。

20 本組換えワタの導入遺伝子である改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子は、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質をコードする遺伝子である。

25 改変 MON88701 DMO 蛋白質はジカンバから除草活性のない DCSA とホルムアルデヒド (HCHO) への脱メチル反応を触媒する酵素である (Chakraborty et al., 2005)。DMO のジカンバへの特異性は触媒部位で起こる特定の相互作用によるものであると報告されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。また、第一-2-(1)-ロ-③ (p18~25) に記載したように、各種除草剤と改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)、及びワタ内在性化合物と DMO 蛋白質及び改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B) の結果から、改変 MON88701 DMO 蛋白質が除草剤ジカンバ以外の化合物を代謝する可能性は極めて低いことが示された。

30 PAT (*bar*) 蛋白質は、グルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素に対する阻害作用を不活性化化する。第一-2-(1)-ロ-③ (p18~25) に記載したように、PAT (*bar*) 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT (*bar*) 蛋白質が各種アミノ酸にアセチル基を転移することはない。また、特に構造が似ている L-グルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生ずることはない (Thompson et al., 1987)。さらに、

過剰の各種アミノ酸の存在下においても、PAT (*bar*) 蛋白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。なお、PAT (*bar*) 蛋白質と同様の作用機作を示す蛋白質 (PAT 蛋白質、改変 PAT 蛋白質) を発現する遺伝子組換え作物についてカル

5 タヘナ法に基づき第一種使用規程が承認された系統 (スタック系統は除く) は現在までに 4 作物 21 系統 (ワタでは 3 系統) があり、いずれの系統もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、生物多様性に影響が生じるおそれはないと考えられる。

10 これらのことから、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の基質特異性は非常に高く、植物代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、第一-2-(1)-ロ-③ (p18~p25) に記載したように、それぞれの酵素反応が異なること、それぞれの基質の構造が全く異なることから、本組換えワタで発現

15 している改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。よって、導入遺伝子である改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子による影響が、目的とした宿主の生理学的特性であるジカンバ耐性及びグルホシネート耐性以外に及ぶとは予想されない。

したがって、本組換えワタの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると

20 考えられた。

なお、本組換えワタの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

25

①形態及び生育の特性 (播種日 (月日)、発芽率 (%)、草型、草丈、開花期 (月日)、花色、葉形、有効花蕾数、結果枝数、開じょ期 (月日)、繊維の色 (綿毛の色)、さく (ワタの果実) の形状、1 個体当たりのさく数、未収穫のさく数、さくの室数、さく当たりの種子数、種子の色、収穫期 (月日)、さくの新鮮重 (g))、

30 ②生育初期の低温耐性、③成体の越冬性、④花粉の稔性及びサイズ、⑤種子の生産量、脱粒性及び発芽率、⑥有害物質の産生性 (土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験)

35 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

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。

5

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

名称：日本モンサント株式会社隔離ほ場

10

使用期間：承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで

1. 隔離ほ場の施設

(1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

15

(2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本組換えワタの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ワタの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

20

(4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網を設置している。播種時には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

2. 隔離ほ場での作業要領

25

(1) 本組換えワタ及び比較対照のワタ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

(2) 本組換えワタを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ワタが漏出しない構造の容器に入れる。

30

(3) (2) により運搬又は保管する場合を除き、本組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び比較対照のワタを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。

(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本組換えワタが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。

35

(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。

- (6) (1) から (5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

5 なお、日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場地図を別添の試験計画書の図 1(p8)に示した。

- (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

10

—

- (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

15

申請書に添付した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

20

—

- (6) 国外における使用等に関する情報

25

これまで本組換えワタについて 2007~2010 年間に米国及びプエルト・リコにおいて延べ 116 ヲ所のほ場試験が行われているが(表 8, p39)、非組換えワタと比較して生物多様性影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

30

なお、本組換えワタに関しては【以下社外秘】

表 8 海外で本組換えワタのほ場試験を行ったほ場数及び国²⁰

年	ほ場の数	国
2007/2008	1	プエルト・リコ
2008	8	米国
2008/2009	1	プエルト・リコ
2009	27	米国
2009/2010	1	プエルト・リコ
2010	77	米国
2010/2011	1	プエルト・リコ

5

表 9 本組換えワタの海外における申請予定

10

【社外秘につき非開示】

²⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

5 第一-2-(6)-②に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

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

15 現在、わが国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。また、これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

20 本組換えワタは改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに高い耐性を持つが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えにくい。

25 以上のこと及び本組換えワタが限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用されることから、競合における優位性に起因する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

—

30 (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

35

以上のことから、本組換えワタは、限定された環境で一定の作業要領を備え

た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の範囲内では、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考えられた。

5

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

- 10 本組換えワタには既存のワタと同様に、哺乳動物に対して毒性を示すゴシポール及び鶏卵の変色及びふ化率の低下などを起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、現在、わが国ではワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。さらに、ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。したがって、野生動物がワタを
- 15 食害する可能性は極めて低い。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有害物質の産生性は報告されていない。

- 本組換えワタ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変MON88701 DMO蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT (*bar*) 蛋白質が発現しているが、DMO蛋白質及びPAT (*bar*) 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された (第一の2-(1)-ロ-②, p14~p18)。
- 20

- 第一の2-(1)-ロ-③ (p18~25) に示したように、改変MON88701 DMO蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ジカンバと構造的に類似するワタ内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。同様に、PAT (*bar*) 蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難く (Thompson et al., 1987)、宿主の代謝系に影響し、新たに有害物質を
- 30 産生することはないと考えられた。したがって、PAT (*bar*) 蛋白質及び改変MON88701 DMO蛋白質が原因で、本組換えワタ中に有害物質が産生されることはないと考えられた。

- 本組換えワタに除草剤ジカンバを散布した際には、図 2 (p15) に示したように改変 MON88701 DMO 蛋白質の作用によって除草剤ジカンバの脱メチル反応が触媒され、3,6-DCSA とホルムアルデヒドと水が産生される。DCSA は EPA
- 35

による除草剤ジカンバの RED²¹ (Reregistration Eligibility Decision、農薬再登録確認書) のリスク評価過程において安全性が既に評価されており(EPA, 2009)、またその毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている (FAO/WHO, 2011)。ホルムアルデヒドは粘膜に対し刺激性のある有害物質として知られている (IPCS, 1989)。このため、本組換えワタに除草剤ジカンバを散布した際に生じるホルムアルデヒドにより野生動植物等に影響が及ぶ可能性を以下に考察した。

ホルムアルデヒドは自然のプロセス及び人為的発生の結果として、環境中に広く存在している。自然の発生源としては主として大気中における炭化水素の酸化が挙げられる。人為的発生源としては、ホルムアルデヒドは工業的に大量に生産・使用されているほか、自動車排気ガスや木材の燃焼が挙げられる。通常人為的発生源から離れた大気中には 0.1~2.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、人間が活動している場所では 7~12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ のホルムアルデヒドが含まれる(IPCS, 1989)。ホルムアルデヒドは土壌若しくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中においては速やかに拡散し、また酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられている(IPCS, 1989)。また、ホルムアルデヒドはほとんど全ての生物種において 1 炭素化合物の代謝過程の中間体として生体内に存在している。実際に、ホルムアルデヒドは多くの植物種で検出されており、その濃度は最大で数千 mg/kg との報告もある(Adrian-Romero et al., 1999)。食品でも同様にホルムアルデヒド濃度の報告があり、果物や野菜といった生鮮食品では 1~98 mg/kg 程度含まれていると報告されている(Trézl et al., 1997; IPCS, 1989)。

以上をまとめると、ホルムアルデヒドは環境中に広く存在し、土壌若しくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中においては酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられる。よって、隔離ほ場における本組換えワタの栽培時に、本組換えワタに対して除草剤ジカンバを散布し、本組換えワタ中でホルムアルデヒドが仮に産生されたとしても、野生動植物が影響を受けることはないと考えられた。

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受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

²¹ 農薬再登録確認書：EPAは連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法 (FIFRA) のもと、1984年11月以前に登録された農薬について安全性の再評価を続けている。再評価された後に農薬再登録確認書が発行される。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5 (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

10

以上のことから、本組換えワタは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、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考えられた。

15

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

20

わが国では本組換えワタが属する *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生していない。よって、交雑性について、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

25

—

(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

15 以上のことから、本組換えワタは、交雑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された。

4 その他の性質

—

5

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 第一-2-(6)-②に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場試験で使用する場合の生物多様性影響を生理学的又は生態学的特性データを用いずに評価した。

競合における優位性：

10 これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。本組換えワタは改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに高い耐性を持つが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが競合

15 における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、本組換えワタは限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、競合における優位性に起因する生物多様性を生じるおそれはないと判断された。

20 有害物質の産生性：

これまでワタが野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす他感物質のような有害物質の産生性は報告されていない。本組換えワタ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が発現しているが、DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質は有害物質としては知られていない。25 また、両蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された。

改変 MON88701 DMO 蛋白質はジカンバに対し高い基質特異性を有し、PAT (*bar*) 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有しているため、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。30

本組換えワタに対し除草剤ジカンバを散布した際には、改変 MON88701 DMO によって除草剤ジカンバが分解され、ホルムアルデヒドと DCSA が生じる。ホルムアルデヒドは植物において日常的に産生されている物質である。DCSA は EPA による除草剤ジカンバの RED のリスク評価過程において安全性35 が既に評価されており、またその毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている。よって、DMO と除草剤ジカンバの反応に

より産生される DCSA とホルムアルデヒドのいずれも、野生動植物等に影響を与えとは考えにくい。

- 5 以上のことから、本組換えワタは限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、有害物質の産生性に起因する生物多様性を生じるおそれはないと判断された。

交雑性：

- 10 わが国では本組換えワタが属する *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生していない。

以上のことから、本組換えワタは限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性を生じるおそれはないと判断された。

- 15 よって、総合的評価として、本組換えワタは、限定された環境で一定の作業要領を備えた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の範囲内では、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

参考文献

Adrian-Romero, M., G. Blunden, B.G. Carpenter and E. Tyihák. 1999. HPLC quantification of formaldehyde, as formaldemethone, in plants and plant-like organisms. *Chromatographia* 50: 160-166.

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium-tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. Lavalley, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.

Bevan, M., W.M. Barnes and M.D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.

Brubaker, C.L., F.M. Bourland and J.F. Wendel. 1999. The origin and domestication of cotton. Pages 3-31 in *Cotton: origin, history, technology and production*. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

Carson, M., D.H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette and L.J. Delucas. 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 63: 295-301.

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.

Chkanikov, D.I., A.M. Makeev, N.N. Pavlova and V.P. Dubovoi. 1975. Behavior and metabolism of 2,4-D in plants differing in their degree of sensitivity to herbicides. *Materialy 10go Mezhdunarodnogo Simpoziuma Stran-Chlenov SEV* 2: 104-108.

Chkanikov, D.I., A.M. Makeev, N.N. Pavlova, E.N. Artemenko and V.P. Dubovoi. 1976. The function of herbicide metabolism in plant resistance to 2,4-D. *Agrokhimiya* 13: 120-126.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasinski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *J Mol Biol* 392: 481-497.

Denton, M. and K.G. Kerr. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11: 57-80.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: a Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *J Mol Biol* 392: 498-510.

EPA, U.S. 2009. Reregistration eligibility decision for dicamba and associated salts. June 8, 2006, as amended June 17, 2009. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

FAO/WHO. 2011. Pesticide residues in food 2010: Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. FAO Plant Production and Protection Paper 2000. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy.

FARRP (Food Allergy Research and Resource Program Database). 2010. www.allergenonline.com. University of Nebraska, Lincoln, NE.

Ferraro, D.J., L. Gakhar and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 175-190.

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Reseach* 13: 7095-7106.

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

Fryxell, P.A. 1984. Taxonomy and germplasm resources. Pages 27-58 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6. *Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

HRAC. 2009. Classification of herbicides according to mode of action. Herbicide Resistance Action Committee. <http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx> [Accessed June 26, 2010].

International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1989) Formaldehyde. Environmental Health Criteria 89 <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc89.htm#SectionNumber:1.4> [Accessed August 10, 2011]

Jenkins, J.N. 2003. Cotton. Pages 61-70 in *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular*

Biology 30: 297-306.

Kakani, A., S. Saha, V.T. Sapra, A. Zipf and D.M. Stelly. 1999. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene(s) in *Gossypium*. *Crop Science* 39: 668-673.

Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium*. Pages 139-150 in *Plant Resources of South-East Asia No 17: Fibre Plants*. M. Brink and R.P. Escobin (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Krueger, J.P., R.G. Butz, Y.H. Atallah and D.J. Cork. 1989. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37: 534-538.

Lee, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Pages 1-25 in *Cotton*. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Llewellyn, D. and G. Fitt. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. *Molecular Breeding* 2: 157-166.

Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Promoter (FLt) for the full-length transcript of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCLSV) and expression of chimeric genes in plants. Patent 5,850,019, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum-aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142.

McGregor, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Handbook No. 496. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of virology* 73: 9080-9088.

Niles, G.A. and C.V. Feaster. 1984. Breeding. Pages 202-231 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Odell, J.T., F. Nagy and N.H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No.45. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2009. 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. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Office of the Gene Technology Regulator, Australian Government Department of Health and Ageing, , Canberra, ACT.

Rensing, S.A. and U.G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.

Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and*

General Genetics 181: 8-12.

Staten, G. 1946. Contamination of cotton fields by 2,4-D or hormone-type weed sprays. *Journal of the American Society of Agronomy* 38: 536-544.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.

Trézl, L., Csiba, A., Juhász, S., Szentgyörgyi, M., Lombai, G., Hullán, L. 1997. Endogenous formaldehyde level of foods and its biological significance. *Z. Lebensm Unters Forsch A* 205: 300-304.

USDA-FAS. 2010. World agricultural production. U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, D.C. <http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2010/10-11/productionfull11-10.pdf> [Accessed May, 2011]

Wang, X.Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. *Applied and environmental microbiology* 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift fuer Naturforschung Section C. Journal of Biosciences* 39: 500-504.

Winter, J., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley and D.M. Shah. 1988. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. *Molecular and*

General Genetics 211: 315-319.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

財務省 2010 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed June 22]

生化学辞典 2007 Page 497 生化学辞典 第2版 今堀和友、山川民夫 (編) 株式会社
東京化学同人 東京

農林水産省 大臣官房国際部 国際政策課 2011 農林水産物輸出入概況 2010年(平
成22年) 確定値 農林水産省

原田重雄 1981 II 繊維料 ワタ Pages 26-42 工芸作物学 栗原浩 (編) 社団法人 農山
漁村文化協会 東京

平野寿助 1987 15 工芸作物 繊維料作物 ワタ Pages 709-711 農学大事典 第2次増
訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 株式会社 養賢堂 東京

緊急措置計画書

平成 23 年 9 月 13 日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-88701-3) (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おそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

- 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は以下に示すとおりである。

平成 23 年 9 月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 河内研究農場 農場長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、日本モンサント河内研究農場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

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

具体的措置として、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・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。

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 の
隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場

2. 住所

茨城県稲敷郡河内町生板 4717 番地

3. 電話番号

0297-60-4011

4. 地図

図 1 (p62)参照

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部)

2. 隔離ほ場管理責任者

【個人情報につき非開示】(日本モンサント株式会社 代表取締役社長)

III. 試験期間

承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで

IV. 施設概要

部外者の立ち入りを禁止するためのフェンス(高さ 1.6 m)、立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識、洗い場、焼却炉を設置している(図 2, p63)。

V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

3. 試験区の配置図

図 3 (p64) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する(図 4, p65)。

2. 周辺の土地利用状況

隔離ほ場の周辺は、水田・畑・民家・道路・用水路(隔離ほ場のフェンスから約 2.5 m の距離)として利用されている。

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

隔離ほ場境界より半径 1 km 圏内に環境省の定める自然保護地域(国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等)はない。なお、上記の

自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは水郷筑波国定公園であり、隔離ほ場からの距離は約 15 km である。

4. 気象条件

隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である茨城県龍ヶ崎アメダス観測所（龍ヶ崎市大徳町）における気象データの平年値を表 1 (p58) に示した(気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード、アクセス 2011 年 6 月 23 日：

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&prec_ch=%88%EF%8F%E9%8C%A7&block_no=1014&block_ch=%97%B4%83P%8D%E8&year=&month=&day=&elm=normal&view=

表 1 茨城県龍ヶ崎アメダス観測所(龍ヶ崎市大徳町)における気象データの平年値¹

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1988～2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1月	54.2	3.1	9.2	-2.4	2.2	183.9
2月	54.9	4	9.9	-1.4	2.5	167.4
3月	110.1	7.3	13.0	1.9	2.9	166.8
4月	110.9	12.7	18.5	7.3	3.2	171.6
5月	119.9	17.4	22.5	13.0	3.2	164.0
6月	145.4	20.5	25.1	16.9	2.7	119.1
7月	117.1	24.1	28.9	20.6	2.6	147.6
8月	118.7	25.6	30.8	22.0	2.5	177.0
9月	185.3	22.1	26.9	18.5	2.6	129.4
10月	185.0	16.4	21.6	12.0	2.2	134.3
11月	88.5	10.5	16.5	5.2	1.9	147.1
12月	49.2	5.4	11.8	-0.3	2.0	175.5
年	1343.9	14.1	19.6	9.5	2.5	1887.7

5. 台風の襲来暦

① 平年値

気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信越地方への台風接近数^{注2}の平年値は、3.1 回である（気象庁ホームページ気象統計情報

¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

ページ、アクセス 2011 年 6 月 23 日：

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>)。

② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近回数

関東甲信地方に台風が接近し^{注1}、かつ隔離ほ場最寄の観測地点(茨城県龍ヶ崎アメダス観測所)において日ごとの最大風速が 15m/s を超えた回数^{注3}を隔離ほ場周辺への台風の接近回数とした。過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近回数は、合計 7 回(2001 年 9 月、2004 年 5 月、2004 年 8 月、2004 年 10 月、2007 年 9 月、2009 年 10 月、2011 年 9 月)であった。

台風の襲来が予想された場合には、以下の強風対策を行う。

- ・ 強風時には、必要に応じて補助支柱を入れる。
 - ・ 補強支柱などの資材は常に準備しておき、気象情報により取り付ける。
- また、施設の周囲は、風による物の飛来を防止するため、周囲の片付け・清掃を常に行い、隔離ほ場施設内の資材等が風により飛散することのないよう留意する。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にはほ場が冠水したことはない。

7. 過去 10 年における強風の経験とその程度・頻度

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

8. 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け（策定されている場合）

隔離ほ場は、河内町の洪水ハザードマップによると、100 年～200 年に 1 回程度起こる大雨により洪水が生じた場合に、水深 1.0～2.0 m となると想定されている。

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

^{注2} 台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている。

（台風の統計資料（気象庁）：<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/index.html>）

^{注3} 台風の強風域の定義が平均風速 15m/s であることによる。

http://www.jma.go.jp/jma/kishou/now/yougo_hp/haichi2.html

鳥獣害の被害報告はない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等
なし

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等
わが国には交雑可能な野生種は存在しない。

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図 5 (p66～12) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

3. 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内に鋤込む等の適切な手段で処分する。なお、本組換えワタの栽培終了後も本隔離ほ場では遺伝子組換え作物の隔離ほ場試験等を実施する予定である。

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

隔離ほ場は下記(1)~(5)の設備を備えている。

- (1) 部外者の立入りを防止するために、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴などに付着した土、本組換えワタの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、本組換えワタの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風網(高さ3 m)を設置している。また、播種時及び成熟期には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。

5. 作業要領

- (1) 試験実施中の組換え作物及び比較対照の作物以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該作物が漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、組換え作物の栽培終了後は、当該作物及び比較対照の作物を隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに組換え作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- (7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

以上

図1 日本モノサント株式会社隔離ほ場の位置

1:25,000
0 200 400
龍ヶ崎

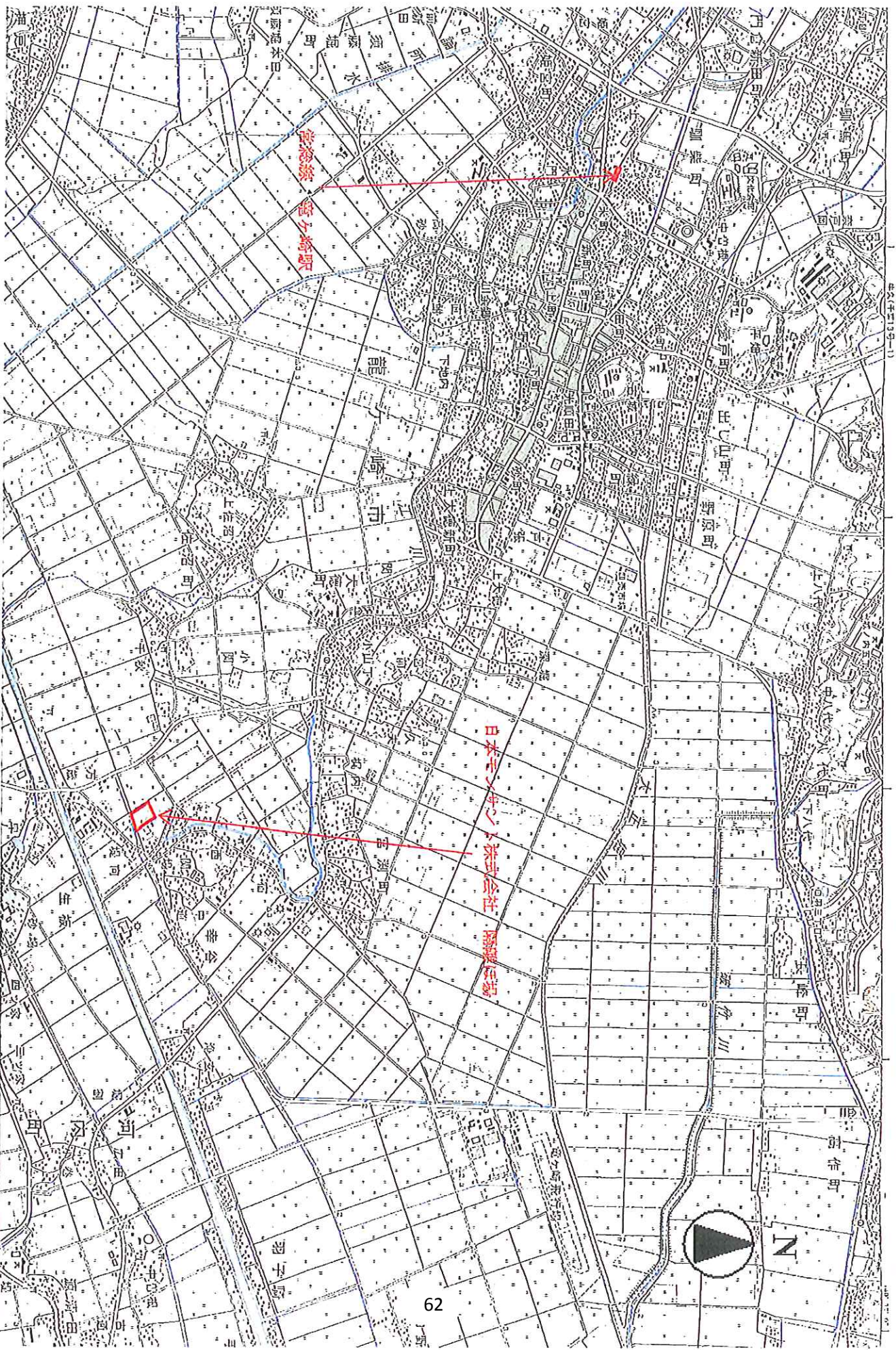
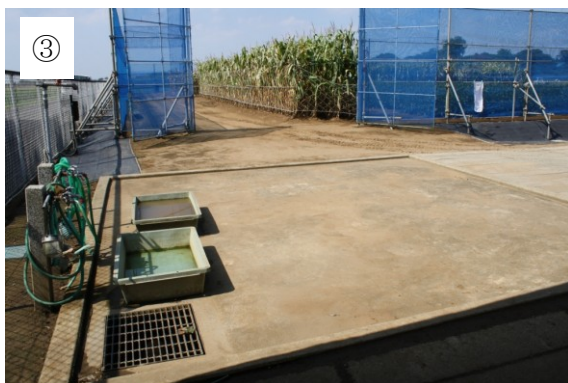


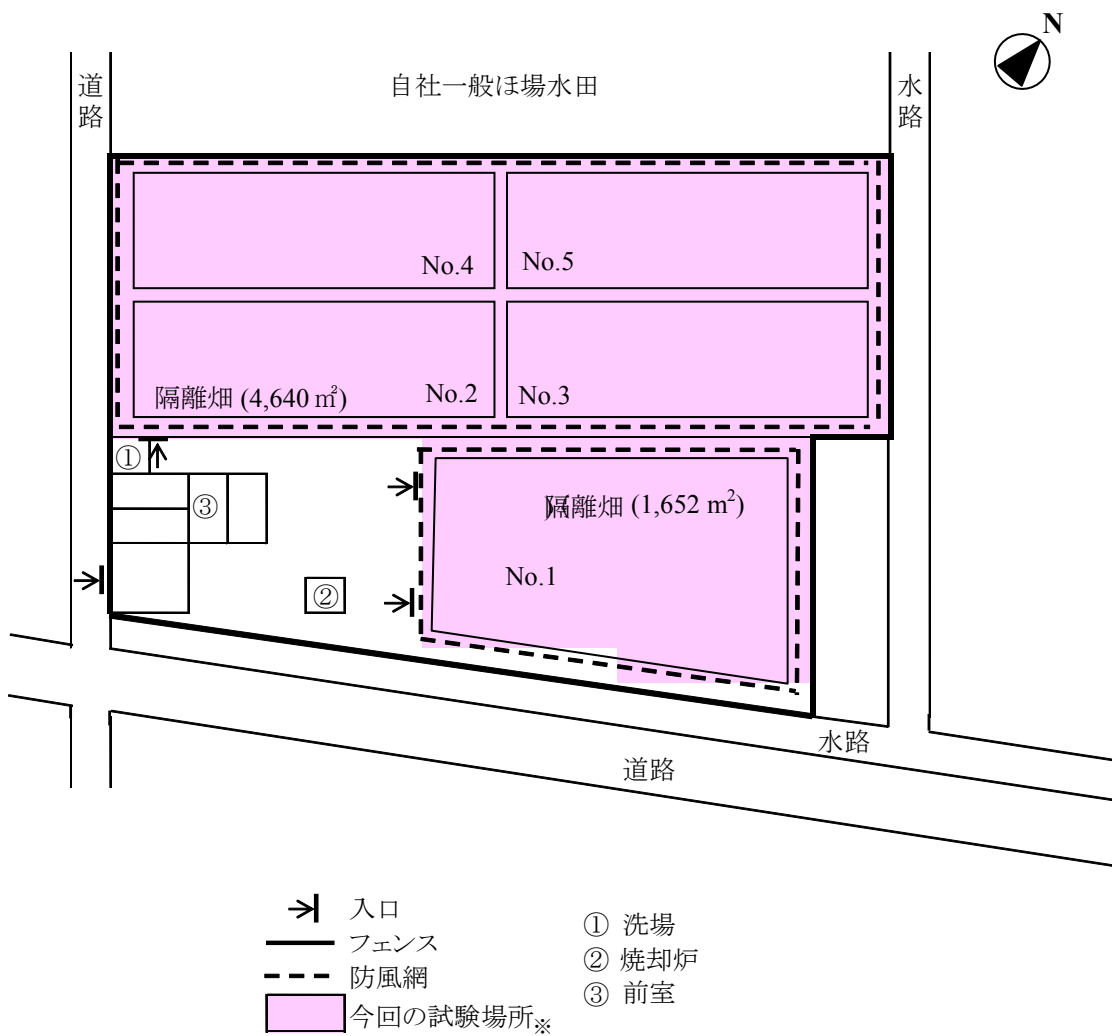
図 2 隔離ほ場の設備⁵



- ① 立入禁止であること及び管理責任者を明示するための標識
- ② 焼却炉
- ③ 洗い場

⁵本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

図3 試験区の配置図⁶



※上記試験場所のうち約 1,000 m²の面積において栽培予定。

⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

図4 日本モンサント株式会社 隔離ほ場の位置

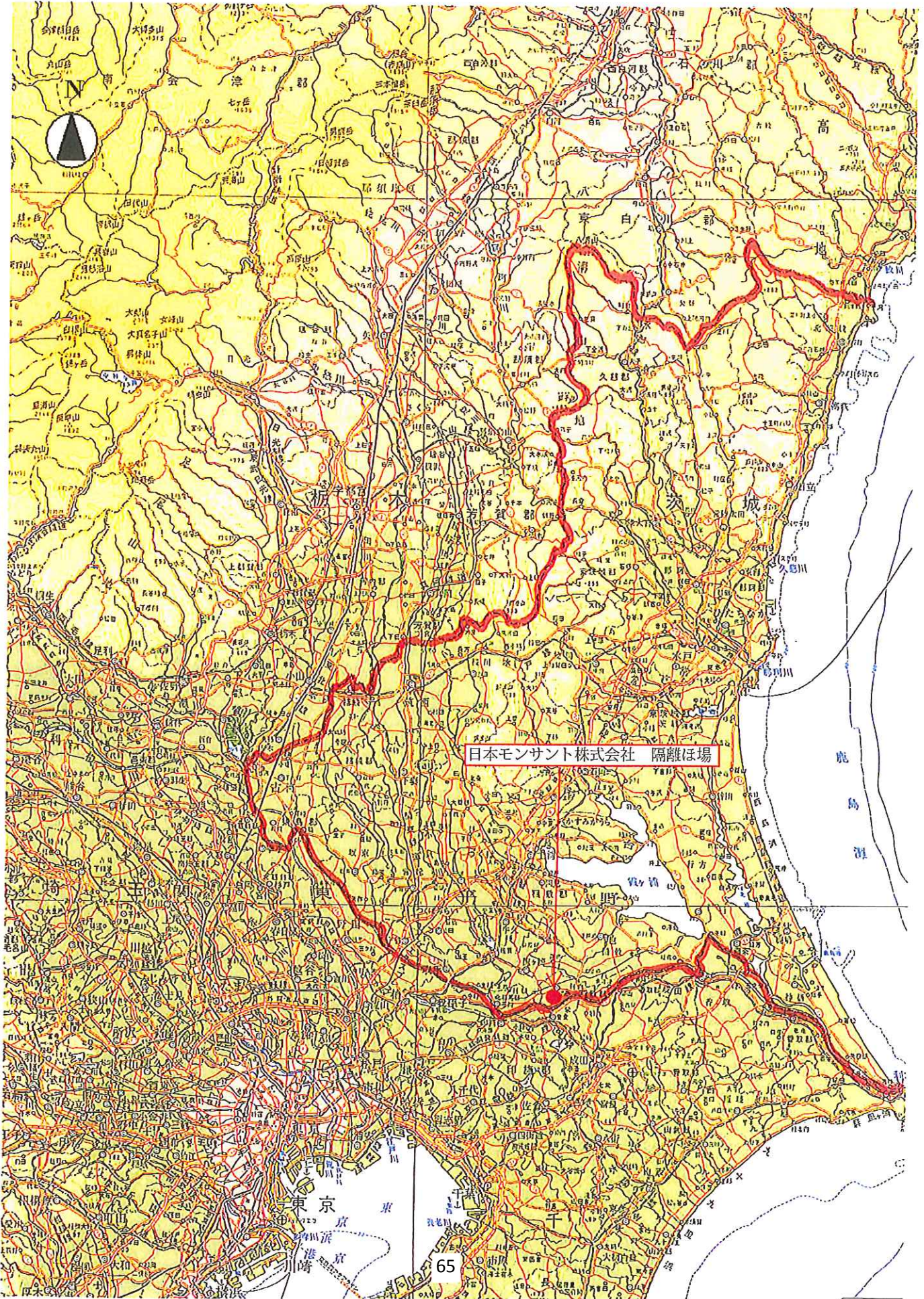
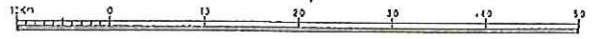


図5 隔離ほ場における栽培履歴⁸

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2009年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え カラシナ				↔								
	遺伝子組換え テンサイ					↔	↔						
	非遺伝子組換え テンサイ					↔	↔						
	遺伝子組換え ダイズ						↔	↔	↔				
	非遺伝子組換え ダイズ						↔	↔	↔				
	遺伝子組換え トウモロコシ						↔	↔	↔				
	非遺伝子組換え トウモロコシ						↔	↔	↔				
	非遺伝子組換え エンバク						↔	↔	↔				
	非遺伝子組換え ライムギ												↔
	No.2	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔									
非遺伝子組換え カラシナ				↔									
非遺伝子組換え エンバク							↔	↔					
非遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔					
No.3	遺伝子組換え ダイズ	↔											
	非遺伝子組換え ダイズ	↔											
	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔										
	非遺伝子組換え カラシナ			↔									
	非遺伝子組換え エンバク						↔	↔					
	非遺伝子組換え トウモロコシ						↔	↔					
No.4	遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔									↔	
	非遺伝子組換え カラシナ			↔									
	非遺伝子組換え エンバク						↔	↔					
	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔									↔	
No.5	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔									↔	
	非遺伝子組換え カラシナ			↔									
	遺伝子組換え ダイズ							↔	↔				
	非遺伝子組換え ダイズ							↔	↔				

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2010年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ	↔	↔	↔									↔
	非遺伝子組換え ソルガム							↔	↔				
	遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔			
No.2	遺伝子組換え ダイズ							↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ダイズ							↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ライムギ												↔
No.3	非遺伝子組換え ソルガム							↔	↔				
	遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔	↔		
	非遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔	↔		
	非遺伝子組換え ライムギ												↔
No.4	遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え ライムギ												↔
	非遺伝子組換え ソルガム							↔	↔				
	遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔			
	非遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔	↔			
No.5	遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔				
	非遺伝子組換え ダイズ	↔						↔	↔				
	非遺伝子組換え ライムギ												↔
	非遺伝子組換え ソルガム							↔	↔				
	遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔				
	非遺伝子組換え トウモロコシ							↔	↔				

図5 隔離ほ場における栽培履歴(つづき)⁸

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2011年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	非遺伝子組換え ソルガム							←	←	←	←		
	遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え トウモロコシ							←	←	←	←		
	遺伝子組換え ダイズ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え ダイズ							←	←	←	←		
No.2	遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ	→											
	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	非遺伝子組換え ソルガム							←	←	←	←		
No.3	非遺伝子組換え ライムギ				→								
	非遺伝子組換え ソルガム							←	←	←	←		
	遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
No.4	遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え ライムギ				→								
No.5	遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え セイヨウナタネ							←	←	←	←		
	非遺伝子組換え ライムギ				→								

⁸ 図5 (p11~12)に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外秘につき非開示】