

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *bar; cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB119, OECD UI: BCS-GH005-8）申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書…………… 3

5

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

(2) 使用等の歴史及び現状…………… 5

10 (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

15 ホ 病原性…………… 8

ヘ 有害物質の産生性…………… 8

ト その他の情報…………… 9

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報…………… 10

(1) 供与核酸に関する情報…………… 10

20 イ 構成及び構成要素の由来…………… 10

ロ 構成要素の機能…………… 11

(2) ベクターに関する情報…………… 14

イ 名称及び由来…………… 14

ロ 特性…………… 15

25 (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法…………… 17

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成…………… 17

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法…………… 17

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過…………… 17

(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…………… 19

30 (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…………… 21

(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違…………… 21

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報…………… 25

	(1) 使用等の内容	25
	(2) 使用等の方法	25
	(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	25
5	(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
	(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	25
	(6) 国外における使用等に関する情報	25
10	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	27
	1 競合における優位性	27
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	27
	(2) 影響の具体的内容の評価	28
	(3) 影響の生じやすさの評価	28
15	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	28
	2 有害物質の産生性	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
20	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	30
	3 交雑性	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	31
	(3) 影響の生じやすさの評価	31
25	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	31
	4 その他の性質	31
	第三 生物多様性影響の総合的評価	32
	参考文献	34
30	別添資料の内容	39
	緊急措置計画書	40

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 6 月 16 日

5

農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 松本 龍 殿

10

申請者 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 ギャビン マーチャント 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。

25

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 <i>bar</i> , <i>cry2Ae</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.） （GHB119, OECD UI:BCS-GH005-8）
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	—

30

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（陸地棉）

10 英名：upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

② 宿主の品種名

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

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20 *G. hirsutum*（以下、「ワタ」とする。）は四倍体ワタの栽培種であり（Wendel and Cronn, 2003）、我が国の自然環境下において、本種及び本種と交雑可能な*Gossypium*属（以下、「ワタ属」とする。）植物の分布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種（Fryxell, 1992）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（OECD, 2008）。ワタ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（Vollesen, 1987; Stanton *et al.*, 1994）、オーストラリア群（*Sturtia*亜属）の約17種（Brown and Brubaker, 2000）、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（Alvarez *et al.*, 2005）であり、四倍体種はメソアメリカ（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（Wendel and Cronn, 2003）。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(OECD, 2008)。

(2) 使用等の歴史及び現状

5 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、ワタ(*G. hirsutum*)の栽培利用の歴史はきわめて古いと考えられている(原田, 1981)。

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、南北戦争で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(原田, 1981)。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、長繊維綿、ピマ綿又はエジプト綿と呼ばれる*G. barbadense*が5%程度を占める(OECD, 2008)。

我が国における在来の栽培種は*G. arboreum*とされ、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(巽, 2000)。しかし、輸入綿におかれて次第に衰微し、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(原田, 1981)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2010年の世界における綿実の生産量は4,239万tであり、主な生産国は中国(1,194万t)、インド(1,157万t)、米国(553万t)、パキスタン(370万t)である(FAOSTAT, 2012)。

我が国における2011年の搾油用綿実の輸入量は約11万3千tであり、主な輸入先は

オーストラリア（7万8千t）、米国（3万t）であった。また、2011年の綿実油の輸入量は4,349 tであり、主な輸入先はオーストラリア（3,750 t）及びトルコ（599 t）であった（農林水産省, 2012）。また、2011年の綿実油粕の輸入量は3,515 tであり、主な輸入先は中国（2,150 t）、インド（919 t）及び米国（446 t）であった（財務省貿易統計, 2012）。

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（巽, 2000）。

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（巽, 2000）。

15 (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（OECD, 2008）。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である（Oosterhuis and Jernstedt, 1999）が、一般的には茎長1 mから1.5 mで栽培されている（OECD, 2008）。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽若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（OECD, 2008）。生育の最適温度は、昼温30～35℃であるが、35℃以上になると結実が抑制され、25℃以下では生産量が著しく減少する（Reddy *et al.*, 1992）。また、正常な生育には、180～200日以上が無霜期間並びに栽培期間中に500mm以上の降雨量若しくは灌水を要する（Duke, 1983）。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（巽, 2000）。

ハ 捕食性又は寄生性

ニ 繁殖又は増殖の様式

5

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

さくは3~5室に分かれており、1室に7~8個の種子が含まれる。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（原田, 1981）、種子の脱粒性は低い（Kerkhoven and Mutsaers, 2003）。品種によっては収穫後2~3ヶ月の休眠期を持つ（Duke, 1983）。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（Purseglove, 1968）、自然環境では寿命は比較的短いと考えられる。

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発芽するという報告はなされていない。

20

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（Kerkhoven and Mutsaers, 2003）。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。

30

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（OECD, 2008）。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（Thies, 1953）、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 (McGregor, 1976; OECD, 2008)。米国での調査では、除草剤耐性ワタの商業栽培ほ場から1625 m (1マイル) 地点で0.04%の交雑が認められたことが報告されている (Van Deynze *et al.*, 2005)。しかし、米国における同じく除草剤耐性ワタを用いた

5 交雑試験では、媒介昆虫の活発な活動の条件下では花粉源からの距離が9 m以上で交雑率は1%以下になり、媒介昆虫の活動が乏しい条件下では1 m以上で1%以下であった (Van Deynze *et al.*, 2005)。また、除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10 m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、60 m以上では耐性個体の出現は認められなかった (Zhang *et al.*, 2005)。

10 花粉の寿命については、25°C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、オオタバコガ (*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 (Richards *et al.*, 2005)。

15 ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

20

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 (OECD, 2008)。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 (Kandyliis *et al.*, 1998)。

25 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 (Stipanovic *et al.*, 2005)。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、哺乳類においては食欲減退、体重減少や呼吸困難等を引き起こす (Berardi and Goldblatt, 30 1980)。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 (OECD, 2008)、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 (新谷, 1989)。

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、油の精製工程で除去される（Gunstone, 2007; OECD, 2004）。

- 5 ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、綿実は大量の繊維に覆われているため鳥類のような種子を摂食する動物は好まず、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや種子の形態により摂食は避けると考えられる。また、野生の哺乳動物が綿実を摂食するという例は報告されていない。

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

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *bar*, *cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB119, OECD UI:BCS-GH005-8）（以下、「GHB119」とする。）の作出に用いられた供与核酸の構成要素を表1に示した。

10 また、改変 *bar* 遺伝子産物である改変PAT蛋白質及び *cry2Ae* 遺伝子産物である Cry2Ae蛋白質のアミノ酸配列を別添資料1（社外秘情報につき非開示）に示した。

表1 ベクターpTEM12の構成要素の位置、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
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット			
3'nos	26 - 335	310	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の pTiT37 由来のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域 (Depicker <i>et al.</i> , 1982) 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。
改変 <i>bar</i>	336 - 887	552	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィンオトリシン・アセチル基転移酵素 (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Thompson <i>et al.</i> , 1987) を含む配列で、除草剤グルホシネートに耐性を付与する。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の2つのコドン は ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
Pcsmv XYZ	888 - 1423	536	Cassava Vein Mosaic Virus 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域 (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。構成的に転写を開始させる。
<i>cry2Ae</i> 遺伝子発現カセット			
P35S2	1424 - 1920	497	Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域 (Odell <i>et al.</i> , 1985) を含む配列。構成的に転写を開始させる。
5'cab22L	1921 - 1990	70	<i>Petunia hybrida</i> (ペチュニア) 由来の chlorophyll a/b binding protein 遺伝子のリーダー配列を含む配列 (Harpster <i>et al.</i> , 1988)。 <i>cry2Ae</i> 遺伝子の発現レベルを増加させる。
TPssuAt	1991 - 2155	165	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の RuBisCo 小サブユニットの輸送ペプチド遺伝子 <i>ats1A</i> のコード領域 (De Almeida <i>et al.</i> , 1989)。

<i>cry2Ae</i>	2156 - 4051	1896	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> 由来の害虫抵抗性遺伝子のコード領域で、チョウ目害虫抵抗性を付与する。なお、本遺伝子は、ワタにおける発現に適するように塩基配列が改変されているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない (Arnaut <i>et al.</i> , 2005)。
3'35S	4052 - 4320	269	Cauliflower Mosaic Virusの35S RNA遺伝子の3'非翻訳領域 (Sanfaçon <i>et al.</i> , 1991) を含む領域。転写を終結させる。
その他			
RB	4321 - 4345	25	<i>A. tumefaciens</i> の T-DNA 由来の右側境界反復配列 (Zambryski, 1988)。
—	4346 - 4537	192	プラスミドpTiAch5の断片 (Zhu <i>et al.</i> , 2000)。
<i>nptI</i> -fragment	4538 - 5248	711	トランスポゾンTn903由来のネオマイシン ホスホトランスフェラーゼをコードする <i>nptI</i> 遺伝子 (Oka <i>et al.</i> , 1981) の断片。なお、本配列は断片であるため機能しない。
ORI ColE1	5249 - 6421	1173	<i>Escherichia coli</i> のプラスミドpBR322由来複製起点 (Bolivar <i>et al.</i> , 1977) を含む配列。
ORI pVS1	6422 - 10192	3771	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> のプラスミドpVS1 (Itoh <i>et al.</i> , 1984) の複製起点 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994) を含む配列。
<i>aadA</i>	10193 - 11961	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 (Fling <i>et al.</i> , 1985) を含む配列。
—	11962 - 12266	305	プラスミドpTiAch5の断片 (Zhu <i>et al.</i> , 2000)。
LB	1 - 25	25	<i>A. tumefaciens</i> の T-DNA 由来の左側境界反復配列 (Zambryski, 1988)。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

ロ 構成要素の機能

5

① 目的遺伝子、発現調整領域、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.10~11) に示した。

10

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PAT蛋白質

植物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、植物は枯死に至る。

10

改変 bar 遺伝子が産生する改変PAT蛋白質（ホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素）は、グルホシネートをアセチル化して無毒性の 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への阻害作用を不活性化する（OECD, 1999）。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても植物は枯死しない。

15

改変 PAT 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、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似している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じさせることはない（Thompson *et al.*, 1987）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下でも、改変 PAT 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かった（Wehrmann *et al.*, 1996）。これらのことから、改変 PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられる。

20

改変PAT蛋白質のアミノ酸配列に関して、2011年にデータベース（AllergenOnline）に登録されている既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

25

なお、改変 bar 遺伝子は、我が国において平成18年2月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グルホシネート耐性ワタLLCotton25（OECD UI: ACS-GH001-3）に導入されたもの同一の遺伝子である。

30

Cry2Ae蛋白質

GHB119に導入された*cry2Ae*遺伝子がコードするCry2Ae蛋白質は、632アミノ酸、分子量71 kDaの殺虫活性蛋白質（Bt蛋白質）である。Cry2Ae蛋白質は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌の*B. thuringiensis* subsp. *dakota*から単離された野生型
5 Cry2Ae蛋白質の活性領域（コア蛋白質）とN-末端の43アミノ酸を含む。なお、GHB119に導入された*cry2Ae*遺伝子は、ワタにおける発現に適するようにコドンを変更しているが、この変更によりコードされるアミノ酸は変化していない（Arnaut *et al.*, 2005）。

10 Cry2Ae蛋白質は、チョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ（tobacco budworm : *Heliothis virescens*）、アメリカタバコガ（cotton bollworm : *Helicoverpa zea*）、オオタバコガ（Old world bollworm : *Helicoverpa armigera*）、ワタアカミムシ（pink bollworm : *Pectinophora gossypiella*）、ツマジロクサヨトウ（fall armyworm : *Spodoptera frugiperda*）、シロイチモジヨトウ（beet armyworm : *Spodoptera exigua*）等に殺虫活
15 性を示す（Arnaut *et al.*, 2005; 別添資料7: 社外秘情報につき非開示）。Cry2Ae蛋白質は他のBt蛋白質と同様に、標的昆虫に摂取されると、中腸において特定のプロテアーゼにより消化されて活性ポリペプチド（コア蛋白質）となり、中腸上皮の刷子縁膜小胞（BBMV）の特定の受容体と結合し、中腸の円柱細胞にイオンチャンネルを形成し（Chen *et al.*, 1995）、恒常性が失われ、敗血症を引き起こし、死に至る（Knowles
20 and Dow, 1993; Broderick *et al.*, 2006）。

なお、Cry2Ae蛋白質はミツバチ（*Apis mellifera*）及びテントウムシ（*Coleomegilla maculate*）の成育及び生存に影響を及ぼさないことが確認されている（別添資料7: 社外秘情報につき非開示）。また、2007年から2008年に米国で行った試験において、
25 Cry2Ae蛋白質は、その他の非標的昆虫であるクサカゲロウ（*Chrysoperla rufilabris*）、オオフォルソムトビムシ（*Folsomia candida*）及びオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対しても影響を及ぼす可能性が低いことが確認されている（表2, p.14）。さらに、ヒトを含む哺乳類においては、Bt蛋白質は消化器系に存在するプロテアーゼや酸性の消化液によってコア蛋白質を含めて消化されること、また、消化器官にはコア蛋白質の受容体は存在しないことから、Cry2Ae蛋白質を含むBt蛋白質を摂取しても影
30 響を受ける可能性は極めて低い。

また、Cry2Ae蛋白質のアミノ酸配列に関して、2011年にデータベース

(AllergenOnline)に登録されている既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

表2 非標的昆虫に対するCry2Ae蛋白質の影響評価

生物種	生育ステージ	評価項目	結果
クサカゲロウ (脈翅目) (Green Lacewing: <i>Chrysoperia rufilabris</i>)	幼虫	致死	NOEC ¹ 27 µg/g ²
オオフォルソムトビムシ (トビムシ目) (Springtail: <i>Folsomia candida</i>)	幼虫	致死、生殖	44 µg/gで致死率に影響なし
オオミジンコ (双殻目) (<i>Daphnia magna</i>)	未成熟	致死、発達、生殖	NOEC 330 µg/L

5 ¹: NOEC: 無影響濃度

²: ELISAによる給餌飼料中のCry2Ae蛋白質量の平均値

(注: 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

10 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変PAT蛋白質

15 改変PAT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おり、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ないと考えられる。また、グルホシネートの代謝産物であるN-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することはない(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。

Cry2Ae蛋白質

20 Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質は、宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられる。よって、これらの蛋白質が宿主の持つ代謝系へ影響を及ぼすことはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

25

イ 名称及び由来

GHB119の作出に用いたベクターは、pGSC1700 (Comelissen and Vandewiele, 1989)に由来するプラスミドpTEM12である (図1, p.16)。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5

pTEM12の塩基数は12,266 bp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

pTEM12はT-DNA領域の外側に下記の配列を有するが、これらの配列はT-DNA領域外に位置しており、GHB119 (T3 : 図2のb, p.18) には導入されていないことがサザンブロット分析により確認されている (別添資料1: 社外秘情報につき非開示)。

— *E. coli*のプラスミドpBR322由来複製起点 (ORI ColE1) (Bolivar *et al.*, 1977) 及び
15 *P. aeruginosa*のプラスミドベクターpVS1の複製起点 (ORI pVS1) (Hajdukiewicz
et al., 1994)。それぞれ、*E. coli*及び*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*) (Fling *et al.*, 1985)
を含む配列。 *E. coli*及び*A. tumefaciens*において選抜マーカーとして利用した。

20

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

pTEM12には伝達性を示す因子は含まれておらず、感染性はない。

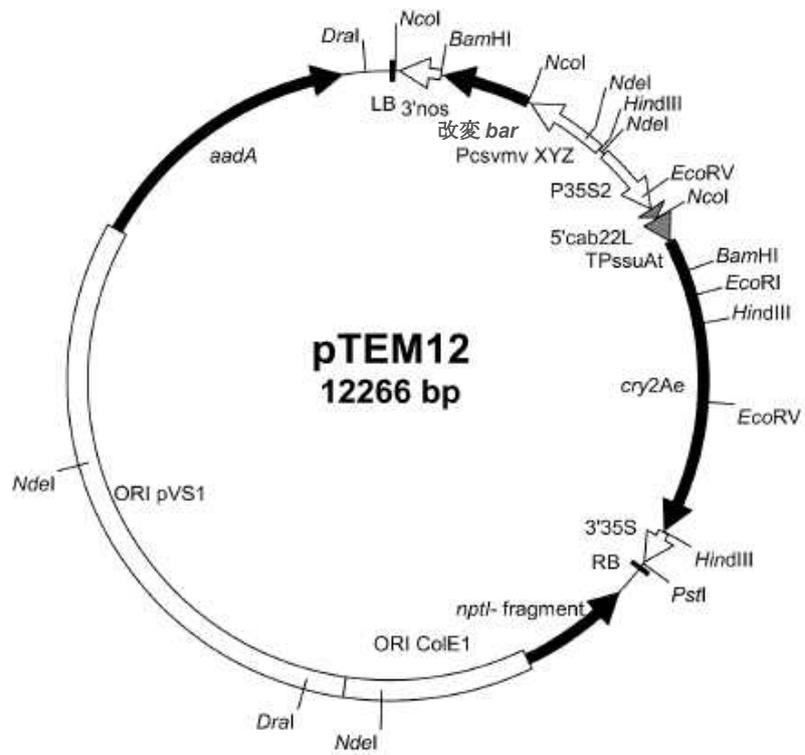


図1 pTEM12のベクター地図

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

(3) 遺伝子組換え生物等の調整方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

- 5 宿主内には、pTEM12上のLBとRBに挟まれた*cry2Ae*遺伝子発現カセット及び改変
bar 遺伝子発現カセット（[3'nos]-[改変 *bar*]-[Pcsmv XYZ]-[P35S2]-[5'cab22L]-
[TPssuAt]-[*cry2Ae*]-[3'35S]）が移入された（図1, p.16）。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10

宿主への核酸の移入は、アグロバクテリウム法（Deblaere *et al.*, 1985）を用いて
行った。宿主ワタCoker312の胚軸部分から培養した胚形成カルスを、非腫瘍形成性
ヘルパーTiプラスミドpEHA101及pTEM12を保持する非腫瘍形成性*A. tumefaciens*
C58C1^{Rif}株（Van Larebeke *et al.*, 1974）の培養液に曝露し、共存培養して形質転換を
15 行った。

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

20

核酸が移入された組織片を、*claforan* 500mg/Lを含む再生培地において培養し、植
物体を再生させ、さらにグルホシネートにより耐性個体を選抜した。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウムの場合はアグロバクテリウム菌体の残存 25 の有無

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。

30

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 選抜された植物体をポットに移植して温室内で栽培し、さらに除草剤グルホシネートによる選抜を行い、GHB119当代（T0）を得た。さらに、除草剤グルホシネ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。GHB119の育成の経過を図2に示した。なお、本申請の対象は、T3世代及びF1世代並びにこれらの後代である。

10 なお、2011年2月に食品安全承認申請を厚生労働省へまた、飼料安全性承認申請を農林水産省へそれぞれ提出した。

15

20

【社外秘情報につき非開示】

25

30

図2 GHB119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

5 GHB119のT1及びBC1F1（図2のa, p.18）において、除草剤グルホシネートに対する耐性株／感受性株の分離比を調べた結果、挿入遺伝子に関して一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比に適合する結果を示した（表3）。よって、GHB119に移入された挿入DNAは、ワタゲノム上の1ヶ所に存在すると考えられる。

10 表3 分離比の確認

世代	供試株数	期待分離比	実測値		χ^2 値 ¹
			耐性株	感受性株	
T1	16	3 : 1	11	5	0.33
BC1F1	19	1 : 1	10	9	0.05

1: 一遺伝子座と仮定。自由度 1、 $p=0.05$ において、 χ^2 値が 3.84 以上で帰無仮説が棄却される。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

15 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 GHB119 (T3: 図2のb, p.18) を用いたサザンブロット分析により、1コピーのT-DNA領域が移入されたことが確認された(別添資料1: 社外秘情報につき非開示)。また、シーケンス解析により、GHB119に移入されたDNAの塩基配列は、ベクターpTEM12上のT-DNA領域と一致することが確認された(別添資料2: 社外秘情報につき非開示)。移入されたDNAの構成を図3に示した。

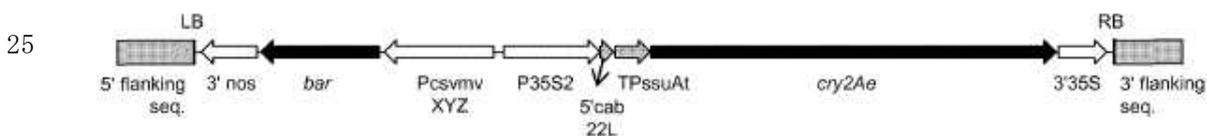


図3 GHB119に移入されたDNAの構成図

図中の「bar」は「改変bar」を示す。

30 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

また、GHB119の3世代（F1, BC1F1, BC2F1：図2のc, p.18）の葉から抽出したゲノムDNAについて、T-DNA領域に2つの切断部位を持つ制限酵素*EcoRV*で処理し、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。その結果、いずれの世代においても想定されたサイズのバンドが同一パターンで検出され、移入された核酸は複数世代において安定して伝達していることが確認された（別添資料1: 社外秘情報につき非開示）。

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

GHB119には1コピーのT-DNA領域が移入されたため、本項目は該当しない。

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

2007年に米国の温室内で栽培したGHB119（BC2F4：図2のd, p.18）5株について、生育ステージ別（生育期、開花直前期、開花期、収穫期）に採取した根、茎、葉、蕾、頂端、さく、全地上部、花粉、蜜、花及び種子を用いて、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質の発現量をELISA法により測定した。その結果、改変PAT蛋白質は全ての組織及び蜜において検出された。他方、Cry2Ae蛋白質は、蜜において検出限界（10.8 ng/g試料）以下であったが、その他の全ての組織では検出され、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質はGHB119において個体間で安定して発現することが確認された（別添資料3: 社外秘情報につき非開示）。

2011年度に我が国で実施した隔離ほ場試験において、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質の発現について、隔離ほ場試験に供試した世代（T6：図2のf, p.18）及びその収穫種子由来の次世代を対象に、改変PAT蛋白質については除草剤グルホシネート散布試験を、Cry2Ae蛋白質については免疫クロマトグラフ法を用いて発現の有無を調査した。その結果、GHB119ではいずれの世代においても全ての個体で除草剤グルホシネート耐性が認められるとともに、Cry2Ae蛋白質が検出された。よって、GHB119において、両蛋白質は世代間で安定して発現することが確認された（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

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

5 GHB119は伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然条件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

10 GHB119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。また、本検出法による定量限界は0.08%であり、社内及び社外の2機関において検証され、信頼性が確認されている(別添資料4:社外秘情報につき非開示)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

15

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

20 GHB119は、改変 *bar* 遺伝子がコードする改変 PAT 蛋白質により、除草剤グルホシネートに耐性を示す。また、改変 PAT 蛋白質によりグルホシネートの代謝産物である *N*-アセチルグルホシネートが生成されるが、*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することなく(OECD, 2002)、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。さらに、本代謝産物は綿実におけるグルホシネートの残留基準値(4 ppm)の規制対象化合物に含まれており(公益財団法人日本食品化学研究振興財団)、ラット、マウス、イヌ等の哺乳類に対する毒性試験の結果、その毒性は、普通物^{*}に分類されるグルホシネートよりも低いことが確認されている(バイエルクロップサイエンス株式会社, 2009)。

25 30 また、*cry2Ae*遺伝子がコードするCry2Ae蛋白質により、ワタ栽培におけるチョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ(*H. virescens*)、ワタアカミムシ(*P. gossypiella*)、アメリカタバコガ(*H. zea*)等に対して抵抗性を示す。

^{*} 毒物及び劇物取締法に定める毒物又は劇物に該当しないもの。なお、経口投与におけるLD50値は300 mg/kg以上である。

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

5 2010年度に国立大学法人宮崎大学フロンティア科学実験総合センター開放系栽培ほ場（以下、「隔離ほ場」とする。）において隔離ほ場試験を実施した結果、栽培開始時期の遅れ及びチョウ目害虫の食害により、生物多様性影響を評価するに足る知見が得られなかったため、2011年度に再試験を行い、GHB119（T6：図2のf, p.18）と宿主品種Coker312（以下、「非組換えワタ」とする。）を比較した（別添資料5: 社
10 外秘情報につき非開示）。また、生育初期の低温耐性については、2008年度年にバイエルクロップサイエンス社 結城中央研究所のPIP実験室において、GHB119（BC2F5：図2のe, p.18）と非組換えワタを比較した（別添資料6: 社外秘情報につき非開示）。

15 a. 形態及び生育の特性

隔離ほ場試験において、発芽揃い、開花期、開じょ期、葉形、草型、花色、さくの形状、綿毛の色、種子の形状、種子の色、葉長、葉幅、茎長、着蕾数、節数、総分枝数、株当たりの収穫さく数、地上部重、地下部重、さくの長さ、さくの幅、さ
20 くの重量、さくの室数、さく当りの種子数及び種子の100粒重について、GHB119と非組換えワタを比較した。

その結果、播種14日後における発芽率は、GHB119が61%、非組換えワタが98%と差がみられた（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。開花期はGHB119が非組換えワタよりも3日遅く、他方、開じょ期は2日早かった（別添資料5: 社外秘情報につ
25 き非開示）。また、茎長及び着蕾数は、GHB119が非組換えワタに比べて低い値を示し、他方、さくの重量ではGHB119が非組換えワタに比べて大きい値を示し、それぞれ統計学的有意差が認められた（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。その他の項目はいずれも、系統間に差異又は統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

30

b. 生育初期における低温又は高温耐性

我が国のPIP実験室において、GHB119及び非組換えワタの幼植物体を5℃・12時

間明暗条件下で1ヶ月間育成し、1週間毎に萎縮程度を調査した。その結果、いずれの調査時においても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4週間後には、両系統ともに全ての個体の枯死が確認された（別添資料6: 社外秘情報につき非開示）。

5

c. 成体の越冬性又は越夏性

隔離ほ場において、GHB119と非組換えワタを収穫期後も冬季のほ場で栽培を続けた結果、2012年2月にはいずれの株も枯死していることが確認された（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

10

d. 花粉の稔性及びサイズ

隔離ほ場において採取したGHB119と非組換えワタの花粉のサイズに統計学的有意差は認められなかった。また、花粉はいずれも99%以上の高い稔性を示し、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

15

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、株当たりの収穫さく数、さく当たりの種子数及び100粒重を調査した結果、いずれにおいてもGHB119と非組換えワタの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

20

脱粒性に関して、GHB119と非組換えワタのいずれにおいても脱粒は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

25

休眠性及び発芽率に関して、隔離ほ場で収穫したGHB119及び非組換えワタの種子について、収穫直後の種子及び3ヶ月間室温条件下で風乾した種子の発芽率をそれぞれ調査した。その結果、収穫直後ではGHB119は70%、非組換えワタは66%、3か月後にはそれぞれ94%及び86%となり、いずれの条件においても、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

30

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。

5

g. 有害物質の産生性

10 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与える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与える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与えるものについては土壌微生物相試験を行った。

後作試験

15 隔離ほ場におけるGHB119及び非組換えワタの栽培後の土壌にダイコンを播種し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、いずれの調査項目についても試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5: 社外秘情報につき非開示)。

20 鋤込み試験

25 隔離ほ場において収穫したGHB119及び非組換えワタの植物体を混和した土壌にダイコンを播種し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、いずれの調査項目についても試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5: 社外秘情報につき非開示)。

土壌微生物相試験

30 隔離ほ場におけるGHB119及び非組換えワタの栽培後の土壌について、細菌数、放線菌数及び糸状菌数を希釈平板法により比較した。その結果、いずれの項目についても試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料5: 社外秘情報につき非開示)。

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

5 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それらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

10 _____

(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

15 _____

(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

20 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

25 _____

(6) 国外における使用等に関する情報

諸外国における承認状況を表4 (p.26) に示した。

30

表4 諸外国における承認状況 (2012年5月現在)

国名	承認機関	承認年	目的
米国 [*]	米国農務省 (USDA)	2011年10月	規制外栽培
	米国環境保護庁 (EPA)	2012年1月	環境
	米国食品医薬品庁 (FDA)	2011年8月	飼料・食品
カナダ [*]	カナダ食品検査庁 (CFIA)	2012年1月	規制外栽培・飼料
	カナダ保健省 (HC)	2012年1月	食品
オーストラリア・ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)	2011年1月	食品

^{*} GHB119は単独での商品化はされず、スタック系統の交配親として使用する予定である。よって、米国及びカナダにおいて、GHB119単独での承認申請は行わず、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変*bar*, 改変*cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.）(T304-40, OECD UI: BCS-GH004-7) とのスタック系統として承認を得た。

5

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

第二 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

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ワタは我が国において長期にわたる使用等の経験があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。

10 競合における優位性に関わる形質として、2011年度に我が国の隔離ほ場において GHB119 と非組換えワタを栽培し、形態及び生育の特性、成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、種子の休眠性及び発芽率について比較した（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。また、生育初期における低温耐性については、2008年度に我が国の P1P 実験室において調査した（別添資料6: 社外秘情報につき非開示）。

15

形態及び生育の特性に関する項目のうち、開花期、開じょ期、茎長、着蕾数及びさくの重量において、GHB119 と非組換えワタの間に差異又は統計学的有意差が認められた。

開花期は GHB119 が非組換えワタに比べて3日遅かった。これは、GHB119 の供試種子の播種14日後の発芽率が61%と低く、発芽力の低下により非組換えワタに比べて初期生育が遅れる傾向にあったことが開花期に影響したと考えられるが、その後は順調に生育し、開じょ期は非組換えワタよりも2日早くなった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。しかし、いずれも差は僅かであり、これらの差によって GHB119 の競合における優位性が高まることはないと考えられる。なお、供試種子の発芽率に差はみられたものの、隔離ほ場で収穫した種子における発芽率において、系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）ことから、この差は遺伝的要因によるものではないと考えられる。

茎長及び着蕾数において、GHB119 が非組換えワタよりも低くなった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）が、これは、初期生育の遅れに起因するものと考えられる。さくの重量については、GHB119 の方が非組換えワタよりも大きい値となり（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）、これは、着蕾数が少なくなったことにより一さくが大きくなる傾向になったものと考えられる。なお、GHB119 のさくの重量については、同年に同ほ場において栽培した非組換え品種 FM966 の値（別添資

料 5: 社外秘情報につき非開示) を上回っていないことから、品種間差の範囲内であると考えられる。よって、この差によって、GHB119 の競合における優位性が高まることはないと考えられる。

- 5 また、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、脱粒性、種子の休眠性及び発芽率において、差異又は統計学的有意差は認められなかった（別添資料6; 別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。

さらに、GHB119は、改変PAT蛋白質による除草剤グルホシネート耐性、並びに
10 Cry2Ae蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性を有する。しかし、自然条件下において除草剤グルホシネートが選択圧となることは考え難い。また、栽培種であるワタが我が国の自然環境下で自生することは困難であることから、チョウ目昆虫の食害を受けにくいことにより既存のワタに比べ一時的に生存率が高まることがあったとしても、この性質のみによって競合における優位性を高めるとは考え難い。よって、
15 これらの性質により、GHB119の競合における優位性が高まることはないと考えられる。

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。

20

(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

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

30

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

5

GHB119の種子には既存のワタの種子と同様に、非反芻動物等に対して毒性を示すゴッシポール、並びに飽和脂肪酸の脱飽和を阻害し、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、ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、綿実には大量の繊維に覆われているため鳥類のような種子を
10 摂食する動物は好まず、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや種子の形態により摂食は避けると考えられる。また、野生の哺乳動物が綿実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。

15 有害物質の産生性については、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、いずれの調査においても試験区間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5: 社外秘情報につき非開示）。よって、GHB119は新たに他感物質のような物質を産生していないと考えられる。

20 改変PAT蛋白質は高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。なお、GHB119に除草剤グルホシネートを散布すると、改変PAT蛋白質により*N*-アセチルグルホシネートが産生される。*N*-アセチルグルホシネートは、綿実におけるグルホシネートの残留基準値（4 ppm）の規制対象化合物に含まれており（公益財団法人日本食品化学研究振興財団）、その毒性は、普通物に分類されるグルホシネートよりも低いことが確認されている（バ
25 イエルクロップサイエンス株式会社, 2009）。また、Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質、宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生するおそれはないと考えられる。さらに、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質の各アミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められ
30 なかった。

GHB119はCry2Ae蛋白質によりチョウ目害虫抵抗性が付与されているため、我が国に生息するチョウ目昆虫種がGHB119の植物体を摂食した場合、また、GHB119

から飛散した花粉を摂食した場合に生存に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、我が国においてワタの自生は報告されておらず、輸入されたワタ種子が運搬の途中でこぼれ落ち、自然条件下で生育あるいは自生する可能性は低い。また、仮に生育しても、ワタの花粉は比較的強く粘着性があることから、風により広範囲に飛散する可能性は低い。よって、我が国に生息するチョウ目昆虫種がGHB119を摂食する可能性並びに花粉に暴露される可能性はいずれも低いと考えられる。

以上から、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

15

(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

30

我が国において、GHB119の宿主が属する種であるワタ (*G. hirsutum*) と交雑可能な近縁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植物種は特定されない。

(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の判断

10

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。

4 その他の性質

15 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

ワタは我が国において長期にわたる使用等の経験があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。

5

競合における優位性に関しては、隔離ほ場試験及びPIP実験室において調査した結果、GHB119の競合にお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、GHB119は、改変*bar*遺伝子の発現による除草剤グルホシネート耐性及び
10 *cry2Ae*遺伝子の発現によるチョウ目害虫抵抗性を付与されている。しかし、自然環境下において除草剤グルホシネートが選択圧となる可能性は考え難いこと、また、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下で生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、これらの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。

15 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と判断した。

有害物質の産生性に関して、GHB119の種子は既存のワタの種子と同様に、非反芻動物等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、
20 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。

また、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、いずれの試験においてもGHB119区と非組換えワタ区の間には統計学的有意差は認められず、GHB119が新たに他感物質のような物質を産生する可能性は低いと考えられた。

さらに、改変PAT蛋白質は高い基質特異性を有し、改変PAT蛋白質の代謝産物である*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害することはなく、宿主
30 の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質は宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、いずれの蛋白質についても、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられた。さらに、改変PAT蛋白質及び

Cry2Ae蛋白質の各アミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

5 GHB119はCry2Ae蛋白質によりチョウ目害虫抵抗性が付与されているため、我が国に生息するチョウ目昆虫種がGHB119の植物体を摂食した場合、また、GHB119から飛散した花粉を摂食した場合に生存に影響を及ぼす可能性が考えられる。しかし、我が国においてワタの自生は報告されておらず、輸入されたワタ種子が運搬の途中でこぼれ落ち、自然条件下で生育あるいは自生する可能性は低い。また、仮に生育しても、ワタの花粉は比較的強く粘着性があることから、風により広範囲に飛散する可能性は低い。よって、我が国に生息するチョウ目昆虫種がGHB119を摂食
10 する可能性並びに花粉に暴露される可能性は、いずれも低いと考えられた。

以上から、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された。

15 交雑性に関して、我が国には、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。

以上を総合的に評価し、GHB119を第一種使用規程に従って使用した場合に生物
20 多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

1. Alvarez, I., Cronn, R., Wendel, J.F. (2005) Phylogeny of the New World diploid cottons (*Gossypium* L., Malvaceae) based on sequences of three low-copy nuclear genes. *Plant Syst. Evol.* 252: 199-214.
2. Arnaut, G., Boets, A., Vanneste, S., Van Rie, J., Van Houdt, S. (2005) Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. US Patent US 2005/0216971 A1.
3. Berardi, L.C., Goldblatt, L.A. (1980) *Gossypol*. In: Liener, I.E. (ed.) *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*, 2nd edn. Academic Press, New York. pp. 184-237.
4. Bolivar, F., Rodrigues, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H., Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
5. Broderick, N.A., Raffa, K.F., Handelsman, J. (2006). Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 15196-15199.
6. Brown, A.H.D., Brubaker, C.L. (2000) Genetics and the conservation and use of Australian wild relatives of crops. *Aust. J. Bot.* 48: 297-303.
7. Chen, X.J., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, D.H. (1995) Mutations in domain I of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAb reduce the irreversible binding of toxin to *Manduca sexta* brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 270: 6412-6419.
8. Cornelissen, M., Vandewiele, M. (1989) Nuclear transcriptional activity of the tobacco plasmid psbA promoter. *Nucleic Acids Research* 17: 19-29.
9. De Almeida, E.R.P., Gossele, V., Muller, C.G., Dockx, J., Reynaerts, A., Botterman, J., Krebbers, E., Timko, M.P. (1989) Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis rbcS* promoter: Sequence encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Mol. Gen. Genet.* 218: 78-86.
10. Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., Leemans, J. (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acid Res.* 13: 4777-4788.
11. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M. (1982) Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *J. Mol. Appl. Genet.* 1: 561-573.
12. Duke, J.A. (1983) *Gossypium hirsutum* L. In: *Handbook of Energy Crops*, unpublished. Center for New Crops & Plant Products, Purdue Univ. West Lafayette, Indiana.

13. FAOSTAT ProdSTAT: Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (accessed 2012-03-23)
- 5 14. Fling, M.E., Kopf, J., Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 13: 7095-7106.
- 10 15. Fryxell, P.A. (1992) A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). *Rheede* 2: 108-165.
- 15 16. Gunstone, F.D. (2007) Cottonseed oil (*Gossypium hirsutum* and *G. barbadense*). In: Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. (eds.) *The Lipid Handbook*, 3rd edn. CRC Press, Florida. pp. 44-45.
17. Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. (1994) The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 25: 989-994.
- 20 18. Harpster, M.H., Townsend, J.A., Jones, J.D.G., Bedbrook, J., Dunsmuir, P. (1988) Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, 1', 2' and nopaline synthase promoters in transformed tobacco, sugarbeet and oilseed rape callus tissue. *Mol. Gen. Genet.* 212: 182-190.
- 25 19. Itoh, Y., Watson, J.M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.
20. Kandyliis, K., Nikokyris, P.N., Deligiannis, K. (1998) Performance of growing-fattening lambs fed whole cotton seed. *J. Sci. Food Agric.* 78: 281-289.
- 30 21. Kerkhoven, G.J., Mutsaers, H.J.W. (2003) *Gossypium* L. In: Brink, M., Escobin, R.P. (eds.) *Plant Resources of South-East Asia*, No.17, Fiber plants. Backhuys Publishers, Leiden. pp. 139-150.
- 35 22. Knowles, B.H., Dow, J.A.T. (1993) The crystal δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*: Models for their mechanism of action on the insect gut. *BioEssays* 15: 469-476.
- 40 23. McGregor, S.E. (1976) Insect pollination of cultivated crop plants. *Agriculture Handbook No.496*. U.S. Department of Agriculture.
24. Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.-H. (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
25. OECD (1999) Consensus document on general information concerning the genes and

- their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. ENV/JM/MONO(99)13.
- 5 26. OECD (2004) Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No. 11. ENV/JM/MONO(2004)16.
- 10 27. OECD (2008) Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.45. ENV/JM/MONO(2008)33.
- 15 28. Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. J. Mol. Biol. 147: 217-226.
29. Oosterhuis, D.M., Jernstedt, J. (1999) Morphology and anatomy of the cotton plant. In: Smith, W.C., Cothren, J.T. (eds.) Cotton: Origin, History, Technology and Production. Wiley, New York. pp. 175-206.
- 20 30. Purseglove, J.W. (1968) Tropical Crop, Dicotyledons. Longmans, London. p.719.
31. Reddy, K.R., Reddy, V.R., Hodges, H.F. (1992) Temperature effects on early season cotton growth and development. Agron. J. 84: 229-237.
- 25 32. Richards, J.S., Stanley, J.N., Gregg, P.C. (2005) Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: Implications for spread of transgenes and pollination ecology. Ecol. Entomol. 30: 327-333.
- 30 33. Sanfaçon, H., Brodmann, P., Hohn, T. (1991) A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. Genes Dev. 5:141-149.
34. Stanton, M.A., Stewart, J.McD., Percival, A.E., Wendel, J.F. (1994) Morphological diversity and relationships in the A-genome cottons, *Gossypium arboreum* and *G. herbaceum*. Crop Sci. 34: 519-527.
- 35 35. Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S., Bell, A.A., Percival, A.E., Jacobs, J. (2005) Occurrence of (+)- and (-)-gossypol in wild species of cotton and in *Gossypium hirsutum* var. *marie-galante* (Watt) Hutchinson. J. Agric. Food Chem. 53: 6266-6271.
- 40 36. Thies, S.A. (1953) Agents concerned with natural crossing of cotton in Oklahoma. Agron. J. 45: 481-484.
- 45 37. Thompson, C., Van Montagu, M., Leemans, J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO Journal. 6: 2513-2518.

38. Van Deynze, A.E., Frederick, J.S., Bradford, K.J. (2005) Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Sci.* 45:1565-1570.
- 5 39. Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A., Schell, J. (1974) Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252: 169-170.
- 10 40. Verdaguer, B., De Kochko, A., Beachy, R.N., Fauquet, C. (1996) Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Mol. Biol.* 31: 1129-1139.
41. Vollesen, K. (1987) The native species of *Gossypium* (Malvaceae) in Africa, Arabia and Pakistan. *Kew Bull.* 42: 337-349.
- 15 42. Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A. (1996) The Similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.* 14:1274-1278.
- 20 43. Wendel, J.F., Cronn, R.C. (2003) Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv. Agron.* 78: 139-186.
44. Zambryski, P. (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.* 22: 1-30.
- 25 45. Zhang, B.-H., Pan, X.-P., Guo, T.-L., Wang, Q.-L., Anderson, T.A. (2005) Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Mol. Biotechnol.* 31: 11-20.
- 30 46. Zhu, J., Oger, P.M., Schrammeijer, B., Hooykaas, P.J.J., Farrand, S.K., Winans, S.C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182: 3885-3895.
47. 公益財団法人日本食品化学研究振興財団 農薬等の基準値. グルホシネート. http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/zaidan/agrdtl.php?a_inq=18900 (accessed 2011-06-13)
- 35 48. 新谷 勲 (1989) 食品油脂の科学. 幸書房, 東京. 31-32.
49. 巽 二郎 (2000) ワタ. “作物学 (II) 工芸・飼料作物編” 石井龍一 (執筆代表), 文永堂出版, 東京. 8-15.
- 40 50. バイエルクロップサイエンス株式会社 (2009) 農薬抄録. グルホシネート (除草剤). 独立行政法人農林水産消費技術センター. <http://www.acis.famic.go.jp/syouroku/glufosinate/index.htm> (accessed 2011-06-13)
- 45 51. 原田 重雄 (1981) II. 繊維料, ワタ. “工芸作物学” 栗原浩編, 農文協, 東京. 26-42.

52. 農林水産省（2012）農林水産物輸出入統計. 貿易統計（輸入）2011年（平成24年3月23日公表）<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001087653> (accessed 2012-03-23)

5

53. 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=01&P=0> (accessed 2012-03-23)

10

別添資料の内容

- 5 別添資料 1 挿入遺伝子の分子特性
(Summary report on the molecular characterization of Cry2Ae Cotton event GHB119)
【社外秘情報につき非開示】
- 10 別添資料 2 GHB119 に移入された核酸の塩基配列
(Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119)
【社外秘情報につき非開示】
- 15 別添資料 3 GHB119 における Cry2Ae 蛋白質及び改変 PAT 蛋白質の発現量分析
(Protein expression analysis of cotton event GHB119, expressing Cry2Ae and PAT/*bar* proteins)
【社外秘情報につき非開示】
- 20 別添資料 4 イベント識別方法
【社外秘情報につき非開示】
- 25 別添資料 5 除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 の
隔離ほ場試験報告書 (2011 年度)
【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料 6 除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ GHB119 に
おける環境安全性評価試験 (P1P 試験報告書)
【社外秘情報につき非開示】
- 30 別添資料 7 GHB119 の特性調査及び環境影響評価試験
【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23年6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 ギャビン マーチャント
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ルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ(改変 *bar*, *cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.)(GHB119, OECD UI:BCS-GH005-8)(以下、「GHB119」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、GHB119に関して、
15 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。

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

20 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。

(平成23年6月現在)

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 研究開発本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 研究開発本部 バイオサイエンスグループリーダー
	バイエルクロップサイエンス株式会社 社長室長
	Bayer CropScience, BioScience Global regulatory affairs manager, Cotton

【個人名は個人情報につき非開示】

25 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社はGHB119の穀粒の我が国への輸入業者、我が国における配給業者、輸入した

GHB119の穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

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

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で明らかにしたGHB119の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GHB119の穀粒を我が国に配給している、又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。

10

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

15

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又は団体に対し、GHB119を不活性化する措置又は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GHB119の拡散を防止する措置について連絡、指導する。

20

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、GHB119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。

25