

除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *aad-12, pat, Gossypium hirsutum* L.) (DAS1910, OECD UI : DAS-81910-7) 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の概要.....	2
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	2
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	2
(2) 使用等の歴史及び現状.....	2
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	3
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	5
(1) 供与核酸に関する情報.....	5
(2) ベクターに関する情報.....	12
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	13
(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.....	15
(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.....	16
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	17
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	20
(1) 使用等の内容.....	20
(2) 使用等の方法.....	20
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法.....	20
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置.....	20
(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.....	20
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	22
1 競合における優位性.....	22
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	22
(2) 影響の具体的内容の評価.....	23
(3) 影響の生じやすさの評価.....	23
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	23
2 有害物質の産生性.....	23
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	23
(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.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	25
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.....	25

(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.....	25
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	25
4 その他の性質.....	25
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	26
参 考 文 献.....	28
緊 急 措 置 計 画 書.....	32
添 付 資 料 リ ス ト.....	34

第一種使用規程承認申請書

平成25年8月23日

農林水産大臣 林 芳正 殿

環境大臣 石原 伸晃 殿

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
申請者 代表取締役 栗田 道郎 印
住所 東京都品川区東品川二丁目2番24号

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	除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ(改変 <i>aad-12, pat, Gossypium hirsutum</i> L.)(DAS1910, OECD UI: DAS-81910-7)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	-

生物多様性影響評価書の概要

第一 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

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

5 和名、英名及び学名

和名：ワタ

英名：cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

10 宿主の品種名又は系統名

宿主の品種名は、四倍体栽培ワタ (*G. hirsutum* L.) の Coker310 である。

国内及び国外の自然環境における自生地域

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

ワタ属は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯から半乾燥地帯にかけて、世界におよそ 50 種が分布し、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。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、オーストラリア群 (*Sturtia* 亜属) の約 20 17 種、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 種である。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。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 25 ワタ及び *G. barbadense* は新大陸 (ワタはメソアメリカ、*G. barbadense* は南アメリカ) において、それぞれ栽培化された (OECD, 2008)。

30 (2) 使用等の歴史及び現状

国内及び国外における第一種使用等の歴史

我が国における栽培種は二倍体種の *G. arboreum* であり、799 年に三河国に漂着したインド人によって伝えられたことが記録に残っているが、このワタは 35 すぐに消滅したと考えられている。その後、文禄年間 (1592 ~ 1595 年) に再び九州に伝えられ、明治 15 ~ 20 年 (1882 ~ 1887 年) ごろには関東以南を中心に 10

万 ha 栽培されていた。しかし、輸入ワタに圧迫された結果、現在では観賞用などにわずかに栽培されているにすぎない(原田, 1981)。

ワタの栽培はメソアメリカで始まり、紀元前 3500~2300 年頃のワタの栽培の形跡がメキシコのテワカン谷で発見されている。今日栽培されているワタの起源はグアテマラ国境近くのメキシコと考えられており、18 世紀半ばに米国南東部に広まった。その後、米国の南北戦争の時期に、世界の熱帯・亜熱帯の諸国に広がった。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、ワタが 90% 以上、*G. barbadense* が 5% 程度を占める(OECD, 2008)。

10 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2011年の世界におけるワタの栽培面積は約3522万haであり、インドが約1218万ha、中国が約504万ha、米国が約394万ha、パキスタンが約284万haであった(FAO, 2013)。

栽培方法については、畝立てを行い、深さ10 cmにおける地温が14 以上、3日間以上続く時期に十分な土壌水分含量を確認した上で機械により播種を行う。発芽後、適宜、灌水、施肥、病虫害防除、雑草管理などの一般管理を行う。さくらの成熟を確認した上で落葉剤を散布し、大部分の葉が枯れ落ちたことを確認した後、機械による収穫を行う(OECD, 2008)。

2012年の我が国における搾油用綿実の輸入量は、約12万トンであり、主な輸入先はオーストラリア(約11万トン)及び米国(約5700トン)である。また、2012年の綿実油かすの輸入量は約2739トンであり、主な輸入先は中国(約2560トン)、米国(約160トン)である(財務省, 2013)。

ワタの主な用途は、繊維として衣服の原料になるほか、フェルトやマットレスの詰め物として利用されたり、紙やセルロースの原料とされる。子実(種子)は搾油用に供され、綿実油かすは家畜の飼料として利用される(OECD, 2008)。

(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、商業的には一年生植物として栽培される。主茎は直立し、単軸性、無限成長であるが、一般的には草丈1~1.5 m で栽培されている。葉は3~5に浅裂し、互生である。花色は乳白色から黄白色である(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 以上を必要とし、38 以上になると生育遅延が起こる。日中の最適温度は30~35 であるが、35 以上になると結実が抑制され、25 以下では生産量が半減する。正常な生育には、180~200日の無霜期間かつ、その中で平均150日間の適温(例:15.5 以上での積算温度が

1200)が必要である。また、灌水がない場合においては、栽培期間中に 500 mm 以上の降雨量を要する。ワタは様々な種類の土壌で栽培されているが、水はけの良い土壌でよく育つ。また、ワタは耐塩性植物であるが、塩分ストレスは発芽に悪影響を与える(OECD, 2008)。

5

八 捕食性又は寄生性

二 繁殖又は増殖の様式

10 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ワタのさくは球形ないし卵形で先端が尖っており、淡緑色である。さくは 3 ~ 5 室からなり、1 さく当たり 25 ~ 35 個の種子を形成する。種子は綿毛で覆われているため、脱粒性は低い。ワタの種子は 2 ~ 3 ヶ月の休眠性をもつが、栽培種は育種により休眠性を最小限に抑えられているか若しくは完全になくされている(OECD, 2008)。多湿の環境下において、ほ場に残った種子は、通常翌年の作期まで生存しない(Jenkins, 2003)。

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 ワタは種子繁殖であり、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖はしない。また、ワタには、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があるという報告はない。

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

25 ワタは基本的には自殖性であるが、虫媒等で他家受粉が生じる場合がある(OECD, 2008)。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、アポミクシスは報告されていない。

30 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 1 花当たり 50 ~ 125 以上の葯を形成し、1 葯当たり 350 ~ 900 個の花粉粒を生産する。ワタの花粉は大きく重く、やや粘性があるため、自然条件下で風に運ばれることはほとんどない。米国及びオーストラリアの研究機関の行った調査によれば、ワタの花粉は 20 m 以上風で移動することはほとんどないことが報告されている(Umbeck *et al.*, 1991)。なお、マルハナバチ(*Bombus* 属)やミツバチ(*Apis* 属)等が花粉を媒介することがある(OECD, 2008)。米国における研究では、ミツバチが存在する条件下における交雑率が、0.3 m で 7.65% から 9 m で 0.67% に低下し、30 m では 0.32% であった。一方、ミツバチが存在しない条件下における交雑率は、0.3 m で 4.86% から 1 m で 0.30% にまで低

下した (Van Deynze *et al.*, 2005)。

実験室での飽和湿度条件下における花粉の発芽率は、花粉採取後 8 時間で 90%、16 時間で 31%、32 時間で 7.5%に低下した。また、蛾 (*Helicoverpa armigera*) の口吻に付着した花粉の発芽率は花粉採取後 8 時間で 19%であり、
5 飽和湿度条件下よりさらに短いものであった (OECD, 2008)。

ホ 病原性

10 ヘ 有害物質の産生性

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

ワタにはゴッシポールとシクロプロペン脂肪酸が含まれていることが知られている。ゴッシポールには遊離型と結合型があるが、遊離型ゴッシポールが生理活性をもつ。ゴッシポールは非反芻動物、鳥類、多くの昆虫や微生物に対し
15 毒性を示し、ほ乳類においては食欲減退、体重減少、呼吸困難を引き起こすことがある。一方、反芻動物では反芻胃において遊離型ゴッシポールを結合型ゴッシポールに変換し無毒化することができるため、ゴッシポールの影響を受けにくい (OECD, 2008)。また、遊離型ゴッシポールは、綿実油の加工中に除去
20 されるため、綿実油中にはほとんど含まれない (OECD, 2004)。

一方、シクロプロペン脂肪酸 (マルバリン酸、ステルクリン酸、ジヒドロステルクリン酸) は、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより、鶏卵の卵黄の脱色やふ化率低下を引き起こす。これらのシクロプロペン脂肪酸は、精製油の脱臭
25 工程中に大幅に減少する (OECD, 2004)。

ワタの種子中には、これらの有害物質が含まれているが、野生のほ乳動物が摂食するという例は報告されていない。

ト その他の情報

30 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *aad-12*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (DAS1910, OECD UI :
35 DAS-81910-7) (以下「本組換えワタ」という。) の作出に用いられた供与核酸の構成とその由来は、表1(p.6)のとおりである。

表 1 供与核酸の構成、構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
T-DNA Border B	24	アグロバクテリウム (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の T-DNA 境界配列。
RB7 MAR	1166	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来の核マトリックス結合領域 (Allen <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子の発現を安定させる。
改変 <i>aad-12</i> カセット		
<i>AtUbi10</i>	1322	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来のポリユビキチン 10 (UBQ10) 遺伝子のプロモーター。5' 末端非翻訳領域及びイントロンを含む (Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i>	882	グラム陰性桿菌である <i>Delftia acidovorans</i> 由来のアリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変アリルオキシアルカノエート・デオキシゲナーゼ (<i>AryloxyAlkanoate Dioxygenase</i> 、以下「改変 AAD-12 蛋白質」という。) を発現させる。発現する改変 AAD-12 蛋白質のアミノ酸配列に関しては、クローニングサイト導入のため、2 番目にアラニンが追加されている (Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23 3' UTR</i>	457	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
<i>pat</i> カセット		
<i>CsVMV</i>	517	キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava vein mosaic virus) 由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1998)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
<i>pat</i>	552	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT 蛋白質を発現させる。発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列に関しては改変されていない (Wohlleben <i>et al.</i> , 1988)。
<i>AtuORF1 3' UTR</i>	704	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結する。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列。
T-DNA Border A	24	アグロバクテリウム由来の T-DNA 境界配列。

(本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

□ 構成要素の機能

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

挿入遺伝子の各要素の機能を表 1(p.6)に示した。

- 5 供与核酸には、核マトリックス結合領域である *RB7 MAR* 配列が含まれる。核マトリックス結合領域はゲノム DNA 配列に頻繁に見られる領域で、DNA のループ構造形成のために、核マトリックスに DNA を付着させる役割をしていると考えられている。核マトリックス結合領域が導入遺伝子のいずれかの側に隣接していると、導入遺伝子の発現を高めることや、導入遺伝子の発現を抑制する
- 10 ジーンサイレンシングを減少させることが報告されている (Allen *et al.*, 2000 ; Halweg *et al.*, 2005)。また、核マトリックス結合領域が導入遺伝子の上流もしくは両側に隣接していると導入遺伝子の発現を高めるが、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことも報告されている (Fukuda and Nishikawa, 2003)

15

目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と同一性を有する場合はその旨

- 20 改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である (Wright *et al.*, 2007)。

本組換えワタにおいては、改変 AAD-12 蛋白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入する反応を触媒することにより、除草活性のない化合物に変換し、除草剤耐性を示す。例えば、改変 AAD-12 蛋白質は除草剤 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) に酸素を導入する反応を触媒し、除草活性のない

25 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) とグリオキシル酸に変換する (図 1、p.7)。なお、改変 AAD-12 蛋白質の基質となる除草剤を添付資料 1 に示した。

改変 AAD-12 蛋白質が既知アレルギーとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルギー・データベース (FARRP Allergen Database version 12、2012) を用いて調べたところ、既知アレルギーと構造的に類似する配列を有していなかった。

30

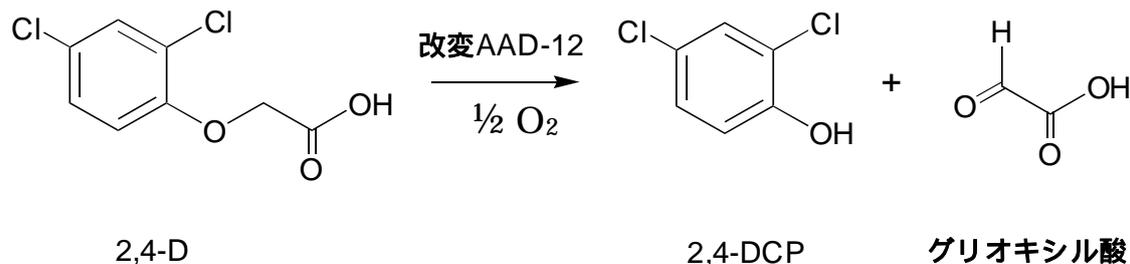


図 1 改変 AAD-12 蛋白質の作用機作

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ
(Phosphinothricin Acetyltransferase、以下「PAT 蛋白質」という。)は、
グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない安定した化合物である N-ア
セチル-L-グルホシネート(2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコ-ブタン酸)に
5 迅速に変換する。

グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植
物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。
したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素
10 阻害のために大量のアンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こ
る。一方、N-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないた
め、PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え植物ではアンモニアの影響を受けず、
除草剤グルホシネートへの耐性を示す(OECD, 2002)。

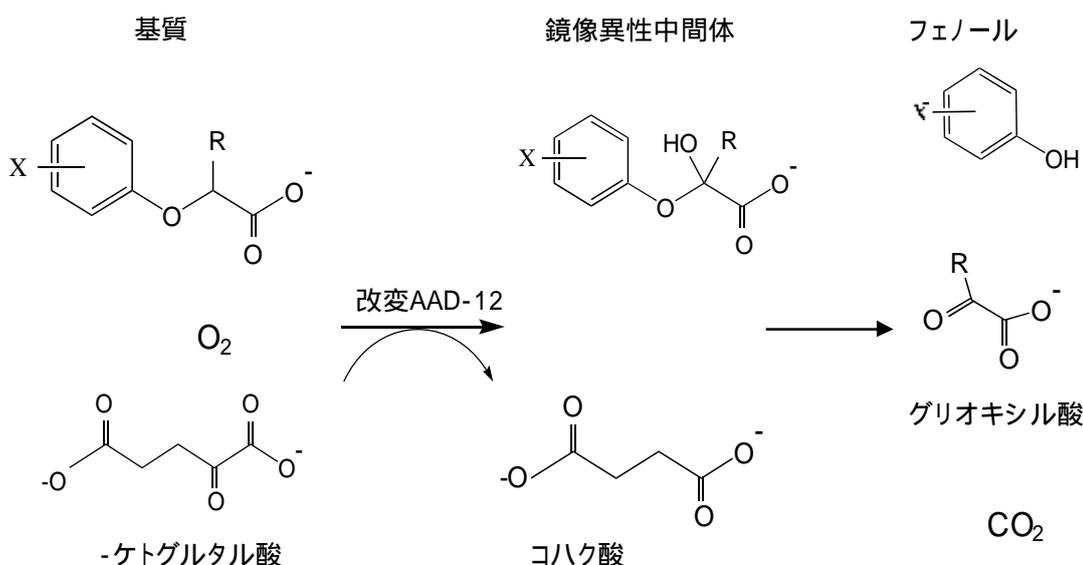
PAT 蛋白質が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲ
ン・データベース(FARRP Allergen Database version 12、2012)を用いて調べ
15 たところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 AAD-12 蛋白質】

改変 AAD-12 蛋白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち
20 光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応
を触媒する酵素である。

改変 AAD-12 蛋白質が基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタ
ル酸の存在下で、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される(図 2、p.8)。



25

図 2 α -ケトグルタル酸存在下での改変 AAD-12 蛋白質の酵素反応
(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

そこで、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った植物体中に存在する化合物が改変 AAD-12 蛋白質の基質になり得るかどうか、 α -ケトグルタル酸を添加した改変 AAD-12 蛋白質の反応実験においてコハク酸測定を行い、コハク酸の生成について確認した。コハク酸測定では、サクシニル CoA シンテターゼ、ピルビン酸キナーゼ及び乳酸デヒドロゲナーゼを用いた反応系において、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の酸化により生成する酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) 量を 340 nm の吸光度で測定することにより、コハク酸の生成量に換算した (Luo *et al.*, 2006 ; 図 3、p.9)。

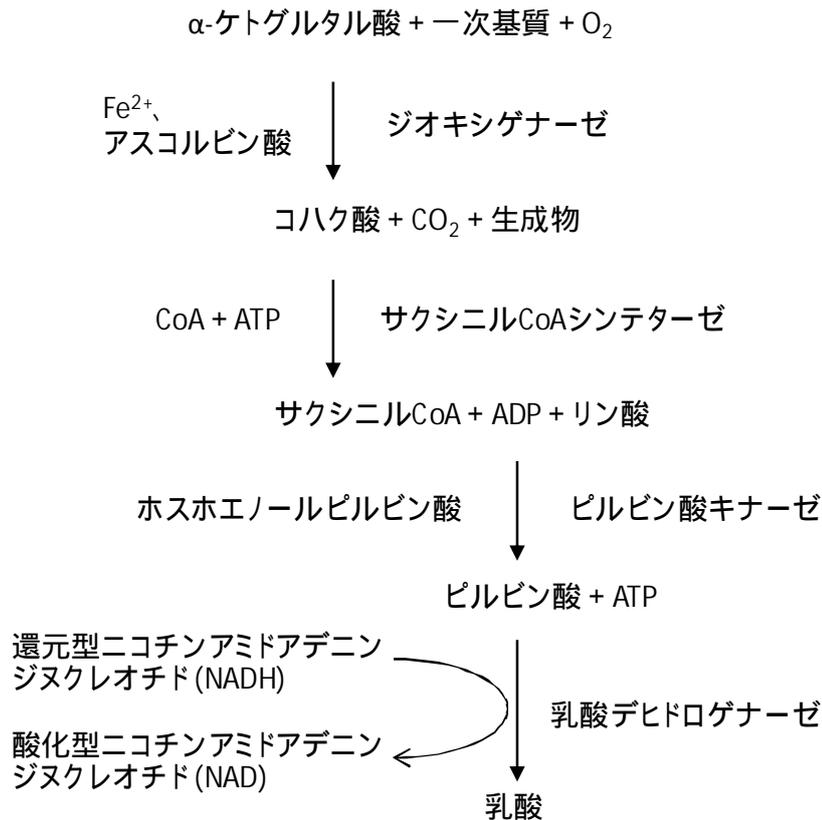


図 3 コハク酸測定の反応経路 (Luo *et al.*, 2006 の Scheme 1 を改編)

ジオキシゲナーゼが基質に酸素を導入する反応において、 α -ケトグルタル酸はコハク酸に変換される。

補酵素 A (CoA) 及びアデノシン-5-三リン酸 (ATP) の存在下で、コハク酸は、サクシニル CoA シンテターゼによりサクシニル CoA に変換され、同時に、アデノシン-5'-二リン酸 (ADP) 及びリン酸が生成される。

ピルビン酸キナーゼにより、ホスホエノールピルビン酸と ADP から、ピルビン酸と ATP が生成される。

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) の存在下で、ピルビン酸が乳酸デヒドロゲナーゼによって乳酸に変換され、同時に NAD が生成される。この反応で生成された NAD 量は量的にコハク酸量に等しいと考えられる。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

植物体中に存在するアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った化合物として、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸(GA3)、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸、及びフェニルプロパノイド中間体であるトランス桂皮酸、クマル酸、シナピン酸、並びに 20 種類の L-アミノ酸をコハク酸測定に用いた。

20 種類の L-アミノ酸については、1 μM の改変 AAD-12 蛋白質の濃度においてコハク酸の生成が認められなかったため、改変 AAD-12 蛋白質は 20 種類の L-アミノ酸とは反応しないと考えられた(添付資料 2、Table 1、p.18)。一方、1 μM の改変 AAD-12 蛋白質を植物ホルモン及びフェニルプロパノイド中間体に作用させた結果、クマル酸、トランス桂皮酸及びアミノシクロプロパン-1-カルボン酸において、わずかにコハク酸の生成が認められた(添付資料 2、Table 2、p.19)。さらに、5 μM 及び 10 μM の改変 AAD-12 蛋白質を作用させた結果、インドール-3-酢酸、ジベレリン酸、アブシジン酸、クマル酸、トランス桂皮酸及びシナピン酸において、コハク酸の生成が認められた(添付資料 2、Table 3 及び Table 4、p.20 及び p.21)。このように、異なる改変 AAD-12 蛋白質の濃度において、いくつかの化合物でコハク酸の生成が認められた。しかしながら、コハク酸測定による測定では、基質の酸化を経なくともコハク酸生成物を誘発する脱共役反応(uncoupling)が起こる可能性がある(Hausinger, 2004)。したがって、コハク酸測定において反応が認められた化合物が実際に酸化されているかを確認するために、フーリエ変換質量分析(FT/MS)による一次酸化物の測定を行った。その結果、10 μM の改変 AAD-12 蛋白質を作用させた場合に、トランス桂皮酸とインドール-3-酢酸の酸化物のみが検出された。

そこで、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸、また、対照として、アリルオキシアルカノエート構造を持つ化合物で 2,4-D と類似の化学構造を持つ S-ジクロルプロップ¹ についてコハク酸測定による改変 AAD-12 蛋白質の触媒効率を検討した。その結果、トランス桂皮酸、インドール-3-酢酸及び S-ジクロルプロップについての触媒効率 K_{cat}/K_m は、それぞれ 156.7 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、8.2 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 及び 30175 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった(添付資料 2、Table 5、p.22)。トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は、S-ジクロルプロップについての K_{cat}/K_m に対してそれぞれ 0.52% 及び 0.027% であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率は S-ジクロルプロップと比較して非常に低い値であることが示された。なお、改変 AAD-12 蛋白質の 2,4-D についての K_{cat}/K_m は 18600 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることが報告されており(Wright *et al.*, 2010)、改変 AAD-12 蛋白質の 2,4-D 及び S-ジクロルプロップについての触媒効率は同等であることから、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸の触媒効率は 2,4-D と比較して非常に低い値であると考えられる。

¹ 光学異性である除草剤ジクロルプロップの S 体の化合物。除草活性を持つのは R 体のみであるため、S-ジクロルプロップは除草活性を持たない。

さらに、シロイヌナズナの桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ (Cinnamate-4-hydroxylase) の *in vitro* におけるトランス桂皮酸についての K_{cat}/K_m は $3.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であることが報告されている (Chen *et al.*, 2007)。また、イネのインドール-3-酢酸アミドシンセターゼ (IAA amido synthetase) の *in vitro* における
5 インドール-3-酢酸についての K_{cat}/K_m は $2.75 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であると報告されている (Chen *et al.*, 2009)。このように桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼ及びインドール-3-酢酸アミドシンセターゼの触媒効率はいずれも高い値であり、トランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸は、植物体内の既存の代謝経路において効率的かつ特異的に利用されているものと考えられる。一方、改変 AAD-12 蛋白質のトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値は桂皮酸-4-ヒドロキシラーゼのトランス桂皮酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.005% である。また、改変 AAD-12 蛋白質のインドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値はインドール-3-酢酸アミドシンセターゼのインドール-3-酢酸に対する K_{cat}/K_m 値の 0.3% であり、改変 AAD-12 蛋白質の K_{cat}/K_m 値はいずれも非常に低い値である。

15 以上より、改変 AAD-12 蛋白質はトランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、認められた酸化反応が植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変 AAD-12 蛋白質は、植物体の他の代謝系を変化
20 させることはないと考えられる。

除草剤 2,4-D の分解産物である 2,4-DCP の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} (半数致死濃度) は淡水魚で 1.7 mg/L、オオミジンコ (*Daphnia magna*) で 1.4 mg/L であり、ウキクサの EC_{50} (半数影響濃度) が 1.5 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC (無影響濃度)
25 が 0.14 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.21 mg/L である。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズの LC_{50} が 125 mg/kg、オオフォルソムトビムシ (*Folsomia candida*) の EC_{10} (10% 影響濃度) が 0.7 mg/kg である (OECD, 2006)。一方、2,4-D の水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験における LC_{50} は淡水魚で 0.26 mg/L、オオミジンコで 2.2 mg/L であり、ウキクサの EC_{50} が 0.2992 mg/L である。また、慢性毒性試験ではウキクサの NOEC が 0.0476 mg/L、オオミジンコの NOEC が 0.20 mg/L である (EPA, 2004)。

30 このように、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸や D-グル
40 ルホシネートをアセチル化することはない (OECD, 1999)。また、L 型アミノ酸

が過剰に存在する場合においても、PAT 蛋白質による L-グルホシネートのアセチル化反応が影響を受けることはない(OECD, 1999)。したがって、PAT 蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

5 除草剤グルホシネートの代謝産物である N-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性(急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性)はグルホシネートより低いことが確認されており(食品安全委員会, 2010)、グルホシネートが散布された場合における N-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

10

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

導入した pDAB4468 の基となったベクターpDAB2407 は、アグロバクテリウムと大腸菌(*Escherichia coli*)に由来する。

15

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

発現ベクターpDAB4468 の塩基数は 12154 bp である。pDAB4468 の塩基配列は添付資料 3 に示した。

20

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

発現ベクターpDAB4468 はスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子を有する。*specR* 遺伝子は、発現ベクターpDAB4468 を構築する際の選抜マーカーとして利用したが、T-DNA 領域の外側に位置するため、本組換えワタに *specR* 遺伝子は導入されていない。

25

なお、本組換えワタ中における *specR* 遺伝子の存在の有無をサザンブロット分析により確認した結果、*specR* 遺伝子は存在していないことが確認された(添付資料 4、表 2、p.5)。

30

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

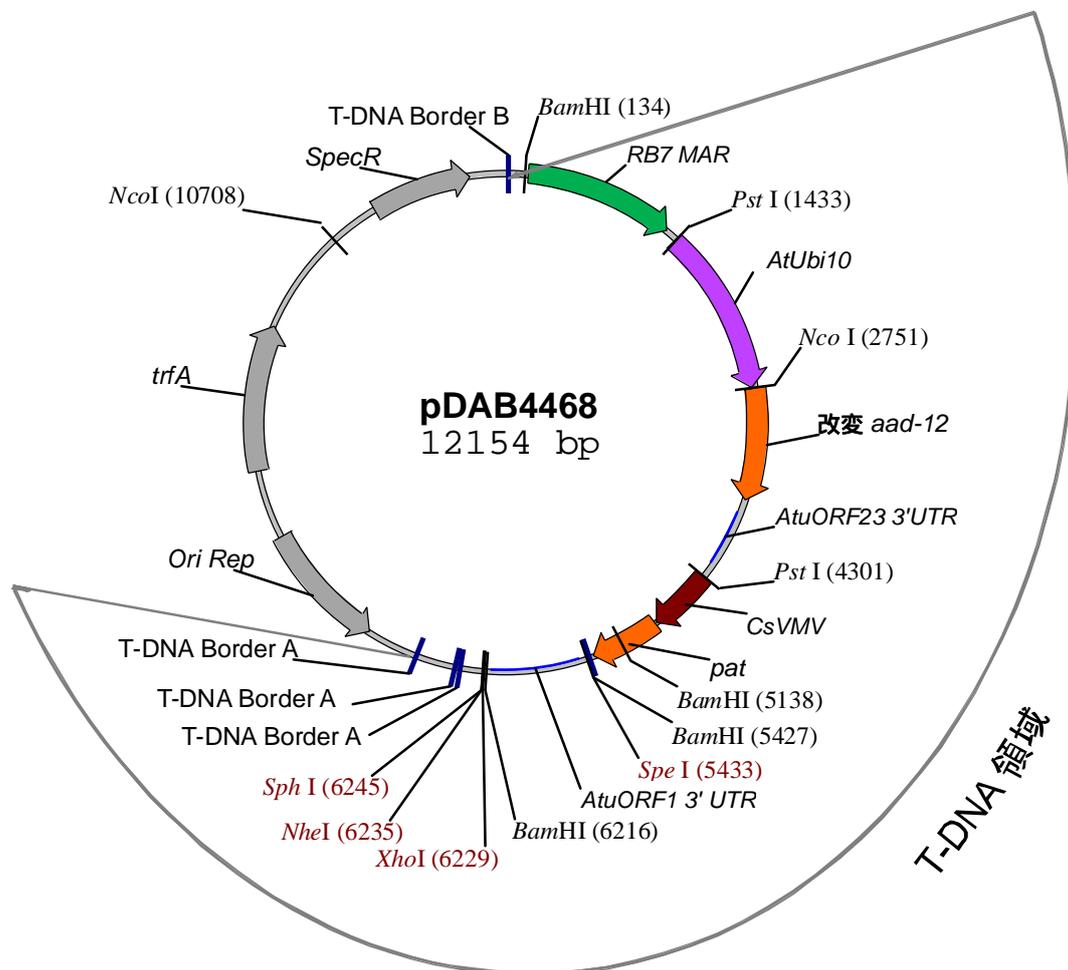
発現ベクターpDAB4468 の基となったベクターの T-DNA 領域は、表 1(p.6) に示した供与核酸に置き換えられており、アグロバクテリウムの感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性は知られていない。

35

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

発現ベクター-pDAB4468 の構成図を図 4 上段(p.13)に示した。また、発現ベクター-pDAB4468 の作成過程を添付資料 5 に示した。



5

図 4 発現ベクター-pDAB4468 の構成図(上段)及び T-DNA 領域の挿入概要図(下段)

10

上段図の()内の数字は、T-DNA Border B を起点としたプラスミド上の制限酵素切断位置を示す。下段図の数字(6390)は、実際に移入された核酸のサイズを示す。

(本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はダウ・ケミカル日本株式会社にある)

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の宿主への導入はアグロバクテリウム法により行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

5 核酸が移入された細胞の選択の方法

除草剤グルホシネートを含む培地でカルスを培養することにより選抜した。

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菌体の残存の有無

10 アグロバクテリウム菌体が残存していないことは、カルス誘導培地及び胚形成カルス培地に抗生物質を添加することにより、アグロバクテリウムを殺菌後、T0及びT1世代においてPCR法を用いて外骨格領域が検出されないことにより確認した。

15 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

再分化した植物体にグルホシネートを塗布することにより耐性を有する個体を選抜した。選抜された植物体については、内部標準を用いた定量PCR法による改変*aad-12*遺伝子及び*pat*遺伝子のコピー数の解析を行った。特に*G. hirsutum*は異質四倍体ワタであることも考慮し、1コピーの導入遺伝子をもつ植物体を選抜した(T0世代及びT1世代)。さらに、米国の野外ほ場において、後代系統(T2世代以降)においてPCR法による改変*aad-12*遺伝子及び*pat*遺伝子の存在確認並びにサザンブロット分析による改変*aad-12*カセット、*pat*カセット及び

20 *RB7 MAR*配列のコピー数の解析を行った。これらの結果及び蛋白質発現の確認、除草剤耐性及び農業形質から総合的に判断し、本組換えワタを選抜した。申請の範囲はT2世代以降の後代系統である。

25 詳細を図5(p.15)に示す。

30 本組換えワタの我が国における認可、申請の状況は次のとおりである(2013年7月現在)。

2012年5月 農林水産省及び環境省より「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づく第一種使用規程(隔離ほ場試験)の承認を得た(使用期間：2012年5月29日から2014年3月31日まで)。

35

2013年 厚生労働省に「食品衛生法」に基づく食品利用としての安全性確認の申請を行う予定である。

2013年 農林水産省に「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法

律」に基づく飼料利用としての安全性確認の申請を行う予定である。

5

社外秘情報につき非開示

図 5 本組換えワタの育成図

10

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸の複製物が存在する場所

15 移入した核酸は、いったん植物染色体に組み込まれると、メンデル遺伝の法則に従う。本組換えワタに導入された形質が、T1 世代(図 5、p.15)の集団でどのような分離を示すかを PCR 法による改変 *aad-12* 遺伝子の存在確認及び除草剤 2,4-D 及びグルホシネート散布による除草剤耐性の有無を調べた(2009 年、米国インディアナ州)。

20 その結果、PCR 法による改変 *aad-12* 遺伝子の存在が確認された個体はすべて両除草剤耐性を示した。よって、得られた観測値は、核内遺伝子におけるメンデルの分離法則に矛盾していないことより、移入した核酸が染色体上に存在していることを確認した(表 2、p.15)。

表 2 本組換えワタの T1 世代の形質分離

25

社外秘情報につき非開示

30 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

35 移入された核酸のコピー数を確認するため T2 世代から T5 世代及び BC1F2 世代におけるサザンプロット分析を行った結果、本組換えワタに導入された *RB7 MAR* 配列、改変 *aad-12* カセット及び *pat* カセットは 1 コピーであり、複数世代において安定して伝達されることが確認された(添付資料 4、表 2、p.4)。

また、T-DNA 領域における個々の構成要素の挿入を確認するために、宿主ゲノム境界領域を含む本組換えワタにおける挿入遺伝子全体のクローニング及び塩基配列決定を行った。移入された核酸領域 6390 bp、5' 末端の近傍配列 1373

bp 及び 3' 末端の近傍配列 1071 bp を含む合計 8834 bp の塩基配列を決定した (添付資料 6)。その結果、T-DNA Border については T-DNA Border A は移入されておらず、T-DNA Border B の一部のみが移入されており、その他の構成要素については全て完全な形で移入されていることが明らかになった (図 4 下段、p.13)

5

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

染色体上に複数コピーは存在しない。

10

(6)の 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

本組換えワタの T3 世代から T5 世代において、葉における改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により調べた。その結果、複数世代において改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質が安定して発現していることを確認した (表 3、p.16)。

15

表 3 本組換えワタの T3 世代から T5 世代での葉における改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量

20

社外秘情報につき非開示

25

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

本組換えワタには、伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換えワタに導入された遺伝子が伝達されることはない。

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

本組換えワタの検出及び識別の方法として、導入遺伝子配列と隣接ゲノム配列をプライマーとして設定し、本組換えワタをイベント特異的に検出できる PCR 法が開発されている。非組換えワタに対する本組換えワタの混入率について、本 PCR 法の検出限界値はゲノム DNA 濃度比で 0.04% である。なお、再現性については、米国ダウ・アグロサイエンス社及び米国ユーロフィン・ジーンスキャン社において、施設間互換性 (inter-laboratory transferability) が確保されていることが確認されている (添付資料 7)。

35

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

5 本組換えワタには、改変 *aad-12* 遺伝子及び *pat* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。

10 2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで行った隔離ほ場試験において、本組換えワタ（BC1F3世代）及び対照の非組換えワタ（社外秘情報につき非開示）の除草剤 2,4-D 及びグルホシネート耐性試験を行った。3葉期の本組換えワタ及び非組換えワタ（各 10 個体）に 2,4-D を 1120g a.e./ha（通常使用量）を散布し、2週間後に調査した結果、本組換えワタはすべて 2,4-D 散布後も生育したのに対し、対照の非組換えワタは薬害により生育が阻害された（「隔離ほ場試験結果報告書」、図 1、p.2）。また、3葉期の本組換えワタ及び
15 非組換えワタ（各 10 個体）にグルホシネートを 596g a.i./ha（通常使用量）散布し、1週間後に調査した結果、本組換えワタはすべてグルホシネート散布後も生育したのに対し、対照の非組換えワタは薬害により生育が阻害された（「隔離ほ場試験結果報告書」、図 2、p.3）。

20 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

2012年に、ダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、本組換えワタと対照の非組換えワタの相違を検討した。

25 a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽率、発芽揃い、開花期、開じょ期、葉形、葉長・葉幅、着蕾数、花色、草型、幹長、節数、総分枝数、収穫期の地上部・地下部重量、株当たり収穫さく数、株当たり総さく数、さくの形状、さく長・幅、さくの重量、さくの室数、さく当たりの種子数、百粒重、種子の形状、種子の色、綿毛の色について、本組換えワタと非組換えワタの比較を行った。
30

隔離ほ場において、本組換えワタ及び非組換えワタはともに播種 5 日後に発芽を開始した。発芽率について、本組換えワタと非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった（「隔離ほ場試験結果報告書」、表 1、p.4）。発芽揃いについては、本組換えワタと非組換えワタとの間に相違は認められなかった。また、開花期及び開じょ期について、本組換えワタと非組換えワタとの間に相違は認められず（「隔離ほ場試験結果報告書」、表 2、p.4）、葉形、花色、草型、さくの形状、さくの室数、種子の形状、種子の色及び綿毛の色についても、相違は認められなかった（「隔離ほ場試験結果報告書」、図 3 及び図 4、p.7）。さら
40 に、葉長・葉幅、着蕾数、幹長、節数、総分枝数、収穫期の地上部・地下部重

量、株当たり収穫さく数、株当たり総さく数、さく長・幅、さくの重量、さく当たりの種子数及び百粒重について、本組換えワタと非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 3～表 5、p.5～p.6)。

5

b 生育初期における低温耐性

本組換えワタと非組換えワタの生育初期における低温耐性について検討した。本葉 1 葉期まで生育した本組換えワタ及び非組換えワタ(各 6 個体)を 4、16 時間日長に設定した恒温器内で栽培し、生育状況を観察した。その結果、16 日後に本組換えワタ及び非組換えワタはともに、植物体の萎縮及び著しい生育障害の症状を呈し、その程度に差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 5、p.8)。

10

c 成体の越冬性

本組換えワタと非組換えワタの成体の越冬性について検討した。ほ場で生育した株(10 株)を成熟後も収穫せずに翌年まで放置し、冬季の自然条件下における植物体の状況を観察した。2013 年 3 月に供試個体を観察した結果、本組換えワタ及び非組換えワタはともに、いずれの株も枯死していたことより越冬性は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 6、p.9)。

20

d 花粉の稔性及びサイズ

花粉の形状に差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 7、p.10)。また、酢酸カーミン溶液で染色した本組換えワタと非組換えワタの花粉の充実度及びサイズについて検討した。その結果、本組換えワタ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(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 6、p.10)。

25

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は、本組換えワタと非組換えワタの株当たり収穫さく数、株当たり総さく数、さく当たりの種子数及び百粒重を比較した。その結果、全ての項目において統計学的有意差が認められなかったことから、本組換えワタと非組換えワタの種子の生産量に差異はないと判断した(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 5、p.6)。

30

脱粒性については、本組換えワタ及び非組換えワタの種子が開じょしたさくから脱粒したかについて観察した。その結果、本組換えワタ及び非組換えワタの種子はともに綿毛で覆われており、脱粒性は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、図 3、p.7)。

35

また、収穫直後及び収穫後 3 ヶ月間室温条件下で風乾した種子の発芽率に関して、本組換えワタと非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 7、p.10)。さらに、供試種子、収穫種子の発芽率はともに、本組換えワタと非組換えワタとの間に統計学的有意差は認めら

40

れず(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 1 及び表 7、p.4 及び p.10)、休眠性に差はないものと考えられた。

f 交雑率

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

g 有害物質の産生性

10 本組換えワタと非組換えワタの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

< 後作試験 >

15 収穫期の本組換えワタ及び非組換えワタの根域土壌を各区 4 ヶ所から採取し混和後、篩にかけて石等の夾雑物を取り除き、セルトレイ(25 穴)に詰めた。各セルにハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、8 日後に発芽率、29 日後に草丈及び乾燥重量の調査を行った。

その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えワタと非組換えワタの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 8、p.12)。

20

< 鋤込み試験 >

25 収穫期の本組換えワタ及び非組換えワタの植物体地上部を刈取り(6 株/区)、6 株分を 1 サンプルとし、乾燥及び粉碎した後、園芸培土とよく混和した(乾燥粉末の重量比約 0.6%)。セルトレイ(25 穴)に混和した土壌を入れ、ハツカダイコンの種子を 1 粒ずつ播種し、播種 9 日後に発芽率、21 日後に草丈、乾燥重量の調査を行った。

その結果、検定植物であるハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重量のいずれも本組換えワタと非組換えワタの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 9、p.12)。

30

< 土壌微生物相試験 >

35 本組換えワタ及び非組換えワタの収穫後の土壌を各区 3 ヶ所から採取した。希釈平板法により、細菌数、放線菌数及び糸状菌数を測定した。その結果、本組換えワタと非組換えワタの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表 10、p.12)。

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

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。

5

(2) 使用等の方法

(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

「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

米国(2010～2012年)の延べ221カ所のほ場において試験を行ってきたが、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。

25

なお、本組換えワタの国外における申請状況は以下のとおりである(表4、p.21)。

表 4 本組換えワタの国外における申請状況(2013年9月現在)

申請国	申請先機関	申請目的	申請状況
米国	農務省(USDA)	栽培	2013年9月申請
	連邦食品医薬品局(FDA)	食品、飼料	2013年6月申請
カナダ	保健省(Health Canada)	食品	2013年9月申請
	食品検査庁(CFIA)	飼料	2013年9月申請
オーストラリア/ ニュージーランド	食品基準機関(FSANZ)	食品、飼料	社外秘情報に つき非表示
韓国	食品医薬品安全庁(KFDA)	食品	社外秘情報に つき非表示
	農村振興庁(RDA)	飼料、環境	

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国の自然環境下におけるワタの自生は報告されていない。

5 第一の2の(6)に示したとおり、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターにおいて隔離ほ場試験を行い、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率について観察し、本組換えワタと非組換えワタの競合に関わる諸形質の相違を検討した。

10 形態及び生育の特性については、すべての調査項目で本組換えワタ及び非組換えワタとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表1～表5及び図3～図4、p.4～p.7)。

生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率についても、すべての調査項目で本組換えワタ及び非組換えワタとの間に統計学的有意差あるいは相違は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表5～表7及び図5～図7、p.6及びp.8～p.10)。

15 また、本組換えワタは、改変AAD-12 蛋白質及びPAT蛋白質が発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネート耐性が付与されているが、これらの除草剤を散布されることが想定されない自然条件下においてアリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネート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られない。

さらに、本組換えワタの供与核酸中には、タバコ由来の核マトリックス結合領域である*RB7 MAR*配列が含まれる。核マトリックス結合領域は導入遺伝子の上流もしくは両側に隣接していると導入遺伝子の発現を高めるが、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことが報告されていることから (Fukuda and Nishikawa, 2003)、*RB7 MAR*配列は導入遺伝子の発現にのみ影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、隔離ほ場試験の結果において、上述のとおり生理学的及び生態学的特性について本組換えワタと非組換えワタの相違はないと考えられた。さらに、米国(2010～2012年)の延べ221カ所のほ場において試験を行ってきたが、本組換えワタは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。よって、*RB7 MAR*配列が植物体の他の代謝系を変化させ、競合における優位性に関わる生理学的または生態学的特性について宿主との相違をもたらすことはないと考えられる。

35 したがって、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いと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えワタの競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10 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

ワタの種子には、非反芻動物に対して毒性を示すゴッシポール及び飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより鶏卵の脱色やふ化率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、野生のほ乳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、ワタには他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

本組換えワタは、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を付与する改変AAD-12蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質を生産する。改変AAD-12蛋白質及びPAT蛋白質については、ともに有害物質としては知られていない。

第一の2の(1)口 に示したとおり、改変AAD-12蛋白質にはトランス桂皮酸及びインドール-3-酢酸を酸化する可能性があるものの、その触媒効率は非常に低く、これらが植物の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。また、植物体中にはアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物の存在は知られていないことから、改変AAD-12蛋白質は植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。一方、PAT蛋白質は除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他のアミノ酸やD-グルホシネートをアセチル化することはない(OECD, 1999)。また、L型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、PAT蛋白質によるL-グルホシネートのアセチル化反応が影響を受けることはない(OECD, 1999)。したがって、PAT蛋白質が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。さらに、本組換えワタの供与核酸中には、タバコ由来の核マトリックス結合領域である*RB7 MAR*配列が含まれる。核マトリックス結合領域が導入遺伝子の上流もしくは両側に隣接していると導入遺伝子の発現を高めるが、下流に隣接している場合は導入遺伝子の発現を高めないことが報告されていることから (Fukuda and Nishikawa, 2003)、*RB7 MAR*配列は導入遺伝子の発

現にのみ影響を及ぼす可能性があると考えられる。また、第一の2の(6)に示したとおり、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターで実施したほ場試験の結果、生理学的及び生態学的特性について本組換えワタと非組換えワタの相違はないと考えられた。さらに、米国(2010~2012年)の延べ221カ所のほ場において試験を行ってきたが、本組換えワタは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。よって、RB7 MAR配列が植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。

また、改変AAD-12蛋白質またはPAT蛋白質について既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース(FARRP Allergen Database version 12、2012)を用いて調べたところ、既知アレルゲンと構造的に類似する配列を有していなかった。

なお、2012年にダウ・ケミカル日本株式会社小郡開発センターの隔離ほ場試験において、本組換えワタと非組換えワタの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。その結果、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験のいずれにおいても、本組換えワタと非組換えワタの試験区の間には統計学的有意差は認められなかった(「隔離ほ場試験結果報告書」、表8~表10、p.12)。

一方、除草剤2,4-Dの分解産物である2,4-DCPの水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験におけるLC₅₀(半数致死濃度)は淡水魚で1.7 mg/L、オオミジンコ(*Daphnia magna*)で1.4 mg/Lであり、ウキクサのEC₅₀(半数影響濃度)が1.5 mg/Lである。また、慢性毒性試験ではウキクサのNOEC(無影響濃度)が0.14 mg/L、オオミジンコのNOECが0.21 mg/Lである。さらに、陸生生物に及ぼす影響については、ミミズのLC₅₀が125 mg/kg、オオフォルソムトビムシ(*Folsomia candida*)のEC₁₀(10%影響濃度)が0.7 mg/kgである(OECD, 2006)。2,4-Dの水生生物に及ぼす影響については、急性毒性試験におけるLC₅₀は淡水魚で0.26 mg/L、オオミジンコで2.2 mg/Lであり、ウキクサのEC₅₀が0.2992 mg/Lである。また、慢性毒性試験ではウキクサのNOECが0.0476 mg/L、オオミジンコのNOECが0.20 mg/Lである(EPA, 2004)。

このように、2,4-Dの分解産物である2,4-DCPは、2,4-Dと同等もしくは2,4-Dに比べて毒性が低く、2,4-Dが散布された場合における2,4-DCPの濃度を最大に見積もっても、散布された2,4-D以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

また、除草剤グルホシネートの代謝産物であるN-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性(急性毒性、亜急性毒性、慢性毒性、発がん性、生殖発生毒性)はグルホシネートより低いことが確認されており(食品安全委員会, 2010)、グルホシネートが散布された場合におけるN-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

したがって、有害物質の産生性に起因する影響を受ける野生動植物等は特定されないと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

5

(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、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えワタの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がないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

15 本組換えワタと交雑可能な近縁野生種は我が国には存在しないことから、本組換えワタの交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

20

(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

25 以上のことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えワタの交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれがないと判断された。

4 その他の性質

30

第三 生物多様性影響の総合的評価

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

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量・脱粒性・休眠性及び発芽率)について、隔離ほ場において調査した結果、本組換えワタ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、本組換えワタはアリルオキシアルカノエート系除草剤及び除草剤グルホシネート耐性を持つが、これらの除草剤を散布されることが想定されない自然条件下において、これらの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られない。

以上のことから、本組換えワタは、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判断された。

ワタの種子には、非反芻動物に対して毒性を示すゴッシポール及び飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより鶏卵の脱色やふ化率低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸含まれている。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、ワタには、他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。さらに、改変 AAD-12 蛋白質及び PAT 蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これら蛋白質と既知アレルゲンとの間でアミノ酸配列の相同性は認められていない。有害物質の産生性について、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、いずれの項目においても、本組換えワタと非組換えワタの試験区の間には統計学的有意差は認められなかった。

水生生物に及ぼす影響についての調査結果から、2,4-D の分解産物である 2,4-DCP は、2,4-D と同等もしくは 2,4-D に比べて毒性が低く、2,4-D が散布された場合における 2,4-DCP の濃度を最大に見積もっても、散布された 2,4-D 以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。また、2,4-D を散布し生育した本組換えワタの輸入種子が野生動物に影響を及ぼすことはないと考えられた。また、除草剤グルホシネートの代謝産物である *N*-アセチル-L-グルホシネートの動物に対する毒性はグルホシネートより低いことが確認されており、グルホシネートが散布された場合における *N*-アセチル-L-グルホシネートの濃度を最大に見積もっても、散布されたグルホシネート以上に影響を及ぼす濃度にはならないと考えられる。

以上のことから、本組換えワタは、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判断された。

5 本組換えワタと交雑可能な近縁野生種は我が国には存在しないことから、本組換えワタは交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合評価として、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと結論づけられた。

参 考 文 献

- Allen, George C.; Hall Jr., Gerald; Michalowski, Susan; Newman, Winnell; Spiker, Steven; Weissinger, Arthur K.; Thompson, William F. High-level
5 transgene expression in plant cells: Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *The Plant Cell*. 1996, 8(5), p.899-913.
- Allen, George C.; Spiker, Steven; Thompson, William F. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*. 2000, 43(2-3), p.361-376.
- 10 Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 1983, 2(6), p.335-350.
- Chen, Hao; Jiang, Hanxiao; Morgan, John A. Non-natural cinnamic acid derivatives as substrates of cinnamate 4-hydroxylase. *Phytochemistry*.
15 2007, 68(3), p.306-311.
- Chen, Qingfeng; Zhang, Baichen; Hicks, Leslie M.; Wang, Shiping; Jez, Joseph M. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry-based assay for indole-3-acetic acid–amido synthetase. *Analytical Biochemistry*. 2009, 390(2), p.149-154.
- 20 EPA. Environmental Fate and Effects Division’s Risk Assessment for the Reregistration Eligibility Document for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D). 2004,
<http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2004-0167-0003>, (参照 2013-2-12).
- 25 FAO. FAOSTAT, 2013, <http://faostat.fao.org/default.aspx?lang=en>, (参照 2013-5-15).
- Fukuda, Yuji; Nishikawa, Satoshi. Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. *Plant Molecular Biology*. 2003, 51,
30 p.665-675.

- Halweg, Christopher; Thompson, William F.; Spiker, Steven. The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: A flow cytometric study. *The Plant Cell*. 2005, 17(2), p.418-429.
- 5 Hausinger, Robert P. Fe () / -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, 39(1), p.21-68.
- Jenkins, Johnie N. Cotton. In: *Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern*
10 *biotechnology*. OECD. 2003, p.61-70.
- Luo, Lusong; Pappalardi, Melissa B.; Tummino, Peter J.; Copeland, Robert A.; Fraser, Marie E; Grzyska, Piotr K.; Hausinger, Robert P. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry*. 2006,
15 353(1), p.69-74.
- Norris, Susan R.; Meyer, Sandra E.; Callis, Judy. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 1993, 21(5), p.895-906.
- 20 OECD. 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. 1999. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf>, (参照 2013-7-29).
- 25 OECD. Module : Phosphinothricin. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25. 2002. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815748.pdf>, (参照 2013-7-29).
- 30 OECD. 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. 2004. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815236.pdf>, (参照 2013-7-29).

- OECD. '2,4-Dichlorophenol'. OECD Existing Chemicals Database. 2006, <http://webnet.oecd.org/HPV/UI/handler.axd?id=3d43ed35-5ef5-4323-bddd-4aa527db0765>, (参照 2013-2-12).
- 5 OECD. Consensus document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.). Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45. 2008. <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815918.pdf>, (参照 2013-7-29).
- 10 Umbeck, Paul F.; Barton, Kenneth A.; Nordheim, Erik V.; McCarty, Jack C.; Parrott, William L.; Jenkins, Johnie N. Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology*, 1991, 84(6), p.1943-1950.
- Van Deynze, Allen E.; Sundstrom, Frederick J.; Bradford, Kent J. Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science*, 2005, 45, p.1565-1570.
- 15 Verdaguer, Bertrand; de Kochko, Alexandre; Fux, Charles I.; Beachy, Roger N.; Fauquet, Claude. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 1998, 37(6), p.1055-1067.
- 20 Wohlleben, W.; Arnold, W.; Broer, I.; Hillemann, D.; Strauch, E.; Pühler, A. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene*. 1988, 70(1), p.25-37.
- 25 Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terence, Anthony; Merlo, Donald J.; Jayakumar, Pon Samuel; Lin, Gaofeng. Novel herbicide resistance genes. 2007, WO 2007/053482 A2.
- 30 Wright, Terry R.; Shan, Guomin; Walsh, Terence A.; Lira, Justin M.; Cui, Cory; Song, Ping; Zhuang, Meibao; Arnold, Nicole L.; Lin, Gaofeng; Yau, Kerm; Russell, Sean M.; Cicchillo, Robert M.; Peterson, Mark A.; Simpson, David M.; Zhou, Ning; Ponsamuel, Jayakumar; Zhang, Zhanyuan. Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107(47), p.20240-20245.

原田 重雄. 工芸作物学, 繊維料, ワタ. 栗原 浩 編. 農文協. 1981, pp.26-42.

財務省. “品別国別表”. 財務省貿易統計.

<http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm?M=01&P=0> (参照

5 2013-5-14).

食品安全委員会. 農薬評価書 グルホシネート. 2010.

<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20070717010> (参照 2013-2-12).

緊急措置計画書

平成25年8月23日

氏名 ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役 栗田 道郎
住所 東京都品川区東品川二丁目2番24号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ(改変*aad-12, pat, Gossypium hirsutum* L.)(DAS1910, OECD UI : DAS-81910-7)(以下「本組換えワタ」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、科学的に明らかである場合、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

平成25年7月現在

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非開示)

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 東京都品川区東品川二丁目2番24号 (電話番号)
*	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社
	ダウ・ケミカル日本株式会社

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、種子生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、種子取扱など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、生産農家や種子取扱業者などの取引ルートへ本組換えワタの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は米国ダウ・アグロサイエンス社の協力のもと、本組換えワタが環境中に放出されないようにリスクの程度に応じて適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えワタについては、環境中で生存しないように不活化するよう措置する。

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あると示唆された場合、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。

以上

添 付 資 料 リ ス ト

社外秘情報につき非開示

- 1 . 除草剤アリルオキシアルカノエート系及びグルホシネート耐性ワタ(改変*aad-12*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (DAS1910, OECD UI: DAS-81910-7)の隔離ほ場試験結果報告書
- 2 . 添付資料 1 : 改変 AAD-12 蛋白質が活性を示す除草剤
- 3 . 添付資料 2 : Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12)
- 4 . 添付資料 3 : pDAB4468 の塩基配列
- 5 . 添付資料 4 : 導入遺伝子のコピー数並びに世代間及び同一世代における安定性
- 6 . 添付資料 5 : pDAB4468 の作成過程
- 7 . 添付資料 6 : Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and its Flanking Border Regions of DAS-81910-7 Cotton
- 8 . 添付資料 7 : Development and Validation of an Event-Specific Real-Time PCR System for the Quantitative Detection of DAS-81910-7 Cotton