

除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロト
ポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ
(改変 *cp4 epsps*, *pat*, 改変 *dmo*, *tdo*, *H_N90 PPO*, *Gossypium hirsutum* L.)
(MON96012, OECD UI: MON-96012-6) 申請書等の概要

目 次

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	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域	4
(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	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	6
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ず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	9
(1) 供与核酸に関する情報	9
イ 構成及び構成要素の由来	9

ロ 構成要素の機能	11
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	11
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	20
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	25
(2) ベクターに関する情報	31
イ 名称及び由来	31
ロ 特性	32
① ベクターの塩基数及び塩基配列	32
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	32
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	32
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	32
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	32
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	32
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	33
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	33
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	33
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	33
(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	37
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	37
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	37
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	41
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	41
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	42
(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	42
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	42
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	42
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	42
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	43
(1) 使用等の内容	43
(2) 使用等の方法	43
(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	44
(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	45
(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	45
(6) 国外における使用等に関する情報	45
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	47
1 競合における優位性	47
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	47
(2) 影響の具体的内容の評価	48
(3) 影響の生じやすさの評価	48
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	48
2 有害物質の産生性	48
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	48
(2) 影響の具体的内容の評価	49
(3) 影響の生じやすさの評価	49
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	49
3 交雑性	49
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	49
(2) 影響の具体的内容の評価	49
(3) 影響の生じやすさの評価	50
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	50
4 その他の性質	50
第三 生物多様性影響の総合的評価	51
参考文献	53

緊急措置計画書	65
隔離ほ場試験計画書	67
別添資料リスト	79

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

資料 1

第一種使用規程承認申請書

2025 年 5 月 26 日

農林水産大臣 殿

5 環境大臣 殿

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社

申請者 代表取締役社長 大島 美紀

10 住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 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、
15 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	除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ (改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>pat</i> , 改変 <i>dmo</i> , <i>tdo</i> , <i>H_N90 PPO</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (MON96012, OECD UI: MON-96012-6)
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	<p>所在地：茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地名 称：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場</p> <p>使用期間：承認日から 2031 年 12 月 31 日まで</p> <p>1 隔離ほ場の施設</p> <p>(1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <p>(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、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えワタ及び比較対象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。</p> <p>(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。</p> <p>(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象のワタを隔離ほ場内に鋤込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(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。</p> <p>(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>

	<p>(6) (1) から (5) までに掲げる事項について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>
--	--

資料 2

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

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：アオイ科・ワタ属・ワタ (陸地棉)

英名：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 DP393 である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20

アオイ科の *Gossypium* 属 (以下「ワタ属」という。) 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 種が分布している (OECD, 2008)。そのうちのおよそ 45 種は二倍体種であり、その地理的分布からアメリカ・アラビア群 (*Gossypium* 亜属)、オーストラリア群 (*Sturtia* 亜属)、アメリカ群 (*Houzingenia* 亜属) に分類される。また、5 種は四倍体種 (複二倍体) であり、中南米及びガラパゴス諸島、ハワイ諸島に分布し、アメリカ・太平洋群 (*Karpas* 亜属) に分類される (OECD, 2008)。

25

G. hirsutum (以下「ワタ」という。) は四倍体種であり、中南米地域で A ゲノムをもつ旧大陸のアジア綿の近縁種と D ゲノムをもつ新大陸の *G. raimondi* との交雑で生じたと考えられている (堀田, 1989; 巽, 2000; Wendel and Cronn, 2003)。自生個体は世界的に広く見られるが、群生していることは希で、海岸沿いや小島に分散して生育している (Lee, 1984)。

30

また、ワタ属の栽培種にはワタ (*G. hirsutum*) の他に、海島棉とも呼ばれる四倍体種のピマ綿 (*G. barbadense*) と、二倍体種のアジア綿 (*G. herbaceum*、*G. arboreum*) がある。*G. barbadense* は南米の北西部が原産で、南米のペルーやエクアドル、ブラジル、カリブ海沿岸各国及びアメリカ南部で自生している。

35

G. herbaceum (シロバナワタ) は南アフリカのサバンナ地帯で生じ、野生化した系統がアフリカに分布しており、また、*G. arboreum* (キダチワタ) はインド原産でアジア地域に自生している (堀田, 1989; OECD, 2008)。

5 我が国の自然界において、ワタ及びワタと交雑可能な他のワタ属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

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

10

ワタは世界におけるワタ属栽培種 4 種全体の作付面積のうち 90%以上を占めている (OECD, 2008)。メキシコ及びグアテマラを中心とする地域で古くから栽培され、18 世紀にはアメリカに導入、その後世界各地に広まった (巽, 2000)。

15

我が国では古来、ワタ属は栽培されておらず、16 世紀から 18 世紀にかけて二倍体品種である *G. arboreum* が全国的に栽培されたが、19 世紀に入り急速に減少し、現在は地域振興や観賞の用途としてわずかに栽培されているのみとなっている (原田, 1981; 堀田, 1989)。

20

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

ワタは、工芸作物の中では最大の栽培面積をもち、世界で広く栽培されている。2022/23 年における全世界のワタの栽培面積は 3,171 万 ha であり、上位国はインド 1,293 万 ha、中国 315 万 ha、米国 295 万 ha 及びパキスタン 180 万 ha となっている (USDA, 2024)。我が国では、現在、商業用栽培は行われていない。

25

ワタの栽培には排水性及び保水性が高く有機質を多く含んだ土壌が適している。温度はワタの成長や収量を左右する重要な因子であり、深さ 10 cm における地温が 14℃以上の日が少なくとも 3 日続く時期に播種を行う (OECD, 2008)。生育初期における地上部の成長は極めて緩やかである (Robertson et al., 2007)。主要産地における大規模栽培ほ場では機械による収穫が行われるが、葉片等の混入を防ぐために、収穫に先立って薬剤により落葉させる。また、落葉させることによりさく果が日光にさらされ、さく果の裂開が促進される (巽, 2000)。

30

我が国では綿実が搾油用及び飼料用として輸入されており、2022 年の綿実の輸入量は 106,955 トンである。主な輸入相手国はオーストラリア (49,287

35

トン)、米国 (41,104 トン) 及びギリシャ (11,910 トン) であった (財務省, 2024)。なお、我が国では、大阪府内の製油会社が唯一種子を海外から輸入し、搾油している。

また、2022 年の綿実油の輸入量は 897 トンであり、主な輸入相手国はトルコ (582 トン) 及びギリシャ (315 トン)、同年の綿実油粕の輸入量は 411 トンで輸入相手国は中国 (323 トン)、インド (74 トン) 及び米国 (14 トン) であった (財務省, 2024)。

ワタの主な用途は繊維であり、綿花は糸に紡がれる。また、地毛は短いため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、直接飼料としても用いられる他、抽出した油 (綿実油) は食用油として、また、搾油粕 (綿実油粕) 及び種子は家畜の飼料として重要であり、肥料としての需要も高い (巽, 2000)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ワタは潜在的には多年生で高さ 1.5~2.0 m まで成長するが、通常栽培においては一年生作物として栽培され、高さは 1.0~1.5 m に抑えられる。主茎から単軸性の発育枝と双軸性の結果枝が生じ、結果枝にはそれぞれ 6~8 個の花が形成される (堀田, 1989; OECD, 2008)。さく果は内部が 3~5 室に分かれており、完熟すると裂開する (巽, 2000)。種子は成熟するにつれて種皮細胞の一部を伸長させ、1 つの細胞からなる綿毛を形成する。綿毛は、リントと呼ばれる長いものと、リントと呼ばれる粗く短いものの 2 種類に分けられる (OECD, 2008)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育の最適温度は 30~35℃であり (OECD, 2008)、生育のためには 15℃以上の年平均気温及び 180~200 日以上が無霜期間が必要である (巽, 2000)。通常、年降水量が 1,000~1,500 mm のところで栽培されるが、灌漑ができれば降雨は少ない方がよい (原田, 1981)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

- 5 種子は綿毛で覆われているため、脱粒性は低い。ワタ属の原種では 2~3 か月の休眠性をもつが、栽培種は育種によって休眠性は最小限に抑えられている、ないしは完全に失っている (OECD, 2008)。ほ場に散布された種子は、多湿の環境下においては、通常次のシーズンまで生存しない (Jenkins, 2003)。
- 10 また、国内(本州及び九州)の隔離ほ場で実施した越冬性試験において非遺伝子組換えワタ(以下「非組換えワタ」という。)、遺伝子組換えワタ(以下「組換えワタ」という。)ともに越冬した事例は報告されていない。

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

- 15 ワタは基本的に栄養繁殖せず、種子繁殖する。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 (OGTR, 2008)。

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

- 20 ワタは、主に自家受粉を行う植物であるが、媒介昆虫により他家受粉し、他家受粉率は 5~30%とされている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

- 25 ワタの花粉の生産量は 1 花当たり約 45,000 粒である。ワタの花粉は直径 100~140 μm と大きく、重い。また、粘性があるため風により飛散する可能性は低く、自然交雑はマルハナバチ (*Bombus* 属) やミツバチ (*Apis* 属) 等の媒介により起きる (McGregor, 1976; OECD, 2008)。オーストラリアで行われた野外試験では、ワタのほ場から 1 m 離れた場合の同ワタとの交雑率は 0.4%以下であり、16m 離れると 0.03%以下まで減少した (Llewellyn and Fitt, 1996)。一方で、ミツバチが多く存在するワタほ場において、花に蛍光粒子を付着させて
- 30 蛍光粒子の飛散を追跡した結果、約 45~60 m 離れた箇所において約 1.6% のワタの花から蛍光粒子が発見され、ミツバチの存在によって花粉が飛散す
- 35

る可能性が示唆された (Johansson, 1959)。花粉の寿命については、オーストラリアでの試験において、生存率が 32 時間で初期の 95%から 10%に低下したとの報告がある (Richards et al., 2005)。

5 ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

10

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 (マルバリン酸、ステルクリン酸等) が含まれている (OECD, 2008)。そのため、ワタ種子の給餌は制限されているものの、反芻動物はこれらの物質を第一胃で消化して無毒化できるため、影響を受けにくい (Kandylis et al., 1998)。ゴッシポールは非反芻動物や鳥類、昆虫、微生物に毒性を示し、哺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 (OECD, 2008)。

15

シクロプロペン脂肪酸は、種子の総脂質中のおよそ 0.5~1.0%を占める。本物質は鶏において卵黄の変色及びふ化率の低下等の有害な影響を及ぼすと考えられているものの、搾油工程の脱臭過程において著しく減少することが知られている (OECD, 2004; OECD, 2008)。

20

ワタの種子中に含まれるこれらの有害物質や、種子が大量の繊維に覆われていること等から、鳥類や野生の哺乳動物はワタ種子の摂食を避けると考えられる。

25

ト その他の情報

我が国では、食品や飼料としての使用等について承認された組換えワタが、飼料用や製油用として、こぼれ落ちた際に発芽可能な種子の形態で輸入されている。輸入されたワタの種子が流通する際にこぼれ落ち、それに由来すると考えられる個体について、当該種子を使用する加工施設等の周辺で、2014年に1個体、2015年に4個体、2016年に1個体の計6個体報告されている (農林水産省, 2017a; 農林水産省, 2017b)。

30

35

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

バイエルグループは、複数の除草剤への耐性が付与された除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ（改変 *cp4 epsps*, *pat*, 改変 *dmo*, *tdo*, *H_N90 PPO*, *Gossypium hirsutum* L.）(MON96012, OECD UI: MON-96012-6) (以下「本組換えワタ」という。) を作出した。

本組換えワタに導入された遺伝子及びその発現により産生される蛋白質並びに付与された形質は次のとおりである。

導入遺伝子	産生蛋白質	付与された形質
改変 <i>cp4 epsps</i>	改変 CP4 EPSPS	除草剤グリホサート耐性
<i>pat</i>	PAT	除草剤グルホシネート耐性
改変 <i>dmo</i>	改変 DMO	除草剤ジカンバ耐性
<i>tdo</i>	TDO	トリケトン系除草剤耐性
<i>H_N90 PPO</i>	PPO	プロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) 阻害型除草剤耐性

本組換えワタは、作用機序の異なる複数の除草剤を組み合わせた使用を可能にすることで、農業生産者に対し、難防除雑草や除草剤抵抗性雑草を効果的に管理するための複数の選択肢を提供する。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

本組換えワタの作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を図 1 (p12) 及び表 1 (p13~19) に示した。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えワタには、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) 蛋白質を発現する。本組換えワタで発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は、既に第一種使用規程の承認を受けている除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の CP4

EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、クローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。

本組換えワタにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。なお、本組換えワタにおいて、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、N 末端側に *Waxy* 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドが付加された前駆蛋白質として産生される。前駆蛋白質は、葉緑体輸送ペプチドによって葉緑体に輸送された後、葉緑体輸送ペプチドが全て切り離され、455 アミノ酸からなる改変 CP4 EPSPS 蛋白質となる (別添資料 1 の図 1, p1)。

【PAT 蛋白質】

本組換えワタには、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されており、ホスフィノスリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (PAT) 蛋白質を発現する。本組換えワタで発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は、プロセシングにより N 末端のメチオニンが取り除かれていること以外、野生型 PAT 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、自然界においても多くの蛋白質で起こっている (Meinzel and Giglione, 2008)。

本組換えワタにおいて発現する PAT 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。

【改変 DMO 蛋白質】

本組換えワタには、*Stenotrophomonas maltophilia* 由来の改変 *dmo* 遺伝子が導入されており、改変ジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) 蛋白質を発現する。本組換えワタで発現する改変 DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、N 末端のメチオニンの直後にロイシンが挿入されていること以外、野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

本組換えワタにおいて発現する改変 DMO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。なお、本組換えワタにおいて、改変 DMO 蛋白質は N 末端側に *Albino or pale green 6 (Apg6)* 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドが付加された前駆蛋白質として産生される。前駆蛋白質は、葉緑体輸送ペプチドによって葉緑体に輸送された後、葉緑体輸送ペプチドが全て切り離され、340 アミノ酸からなる改変 DMO 蛋白質となる (別添資料 1 の図 3, p2)。

【TDO 蛋白質】

本組換えワタには、イネ (*Oryza sativa*) で同定された *HPPD INHIBITOR*

SENSITIVE 1 (HIS1) 遺伝子 (Maeda et al., 2019) をコドン最適化した *tdo* 遺伝子が導入されており、トリケトンジオキシゲナーゼ (TDO) 蛋白質を発現する。本組換えワタで発現する TDO 蛋白質のアミノ酸配列は、プロセッシングにより N 末端のメチオニンが取り除かれていること以外、イネで発現する TDO 蛋白質

5

のアミノ酸配列と同一である。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、自然界においても多くの蛋白質で起こっている (Meinzel and Giglione, 2008)。
本組換えワタにおいて発現する TDO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。

10 【PPO 蛋白質】

本組換えワタには細菌の一種である *Enterobacter cloacae* 由来の *H_N90 PPO* 遺伝子が導入されており、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) 蛋白質を発現する。本組換えワタで発現する PPO 蛋白質のアミノ酸配列は、野生型 PPO 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

15

本組換えワタにおいて発現する PPO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。なお、本組換えワタにおいて、PPO 蛋白質は N 末端側に *Apg6* 遺伝子由来の葉緑体輸送ペプチドが付加された前駆蛋白質として産生される。前駆蛋白質は、葉緑体輸送ペプチドによって葉緑体に輸送された後、葉緑体輸送ペプチドが全て切り離され、179 アミノ酸からなる PPO 蛋白質となる (別添資料 1 の図 5, p3)。

20

ロ 構成要素の機能

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

25

本組換えワタの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能を、表 1 (p13~19) に示した。

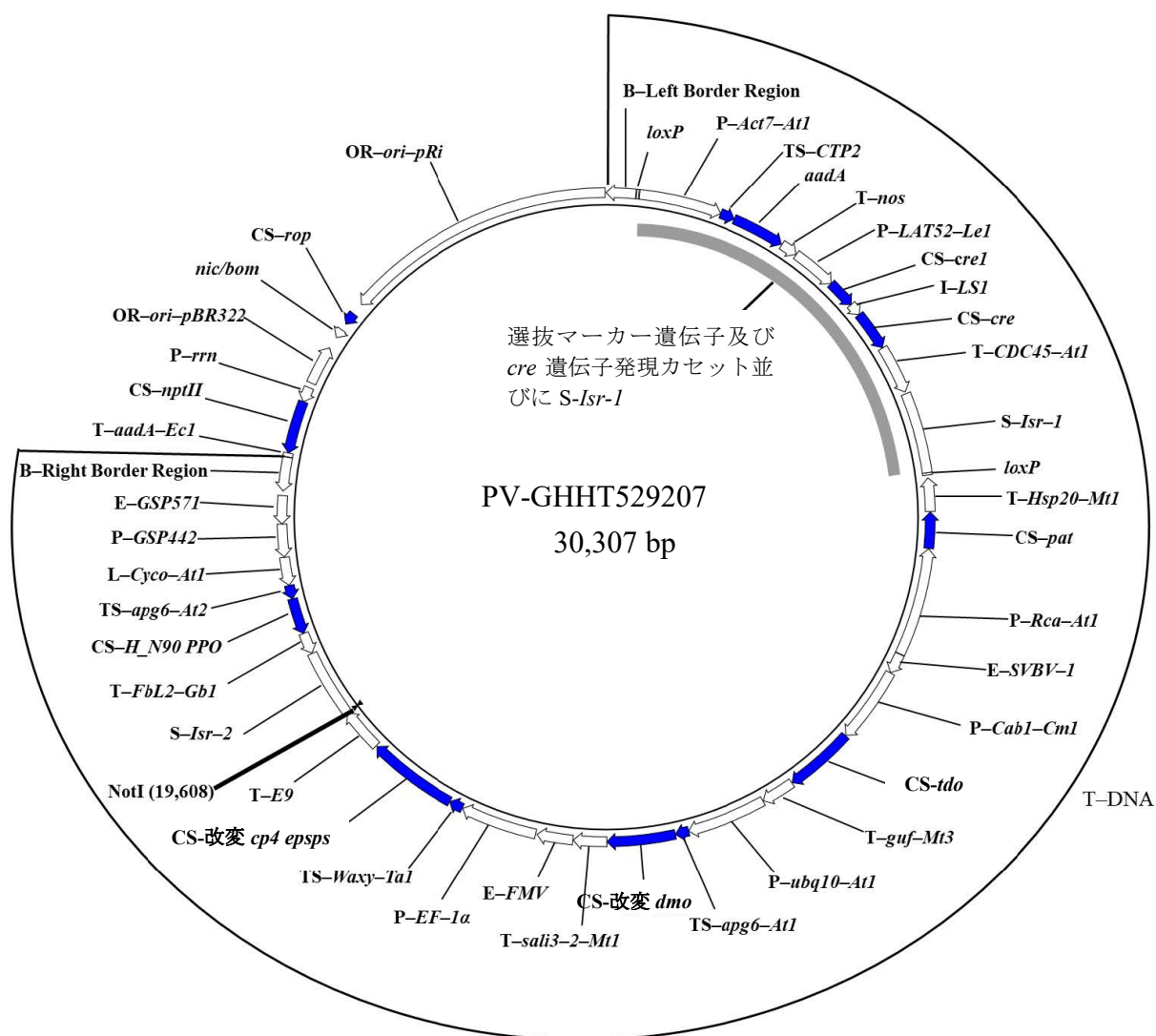


図1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT529207 のプラスミドマップ*

T-DNA 領域のうち選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセット (P-Act7-At1、TS-CTP2、*aadA*、T-nos、P-LAT52-Le1、CS-cre1、I-LS1、CS-cre 及び T-CDC45-At1) 並びに S-Isr-1 並びに *loxP* 配列の 1 つは、Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法により除去されるため、本組換えワタには存在しない。

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT529207 の各構成要素の由来及び機能*

構成要素	由来及び機能
T-DNA領域*	
その他	
B ¹ -Left Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<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左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>loxP</i>	バクテリオファージP1由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Creリコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>aadA</i>遺伝子発現カセット	
P ² - <i>Act7-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>Act7</i> 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であり、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (McDowell et al., 1996)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS ³ - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
<i>aadA</i>	トランスポゾンTn7由来の3''(9)- <i>O</i> -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) のコード配列 (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で、特別な機能を有さない。
T ⁴ - <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi由来のノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている <i>nos</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>cre</i>遺伝子発現カセット	
P- <i>LAT52-Le1</i>	トマト (<i>Solanum lycopersicum</i>) 由来の薬特異的 <i>LAT52</i> 遺伝子のプロモーター及び5'末端非翻訳領域の配列で、主に花粉での転写を誘導する (Twell et al., 1989)。
CS ⁵ - <i>creI</i>	バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ遺伝子の第1エキソンの部分配列 (Zhang et al., 2003)。

*本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えワタの作出に用いたPV-GHHT529207の各構成要素の由来及び機能* (つづき)

構成要素	由来及び機能
I ⁶ - <i>LSI</i>	ジャガイモ (<i>Solanum tuberosum</i>) 由来の <i>LSI</i> 遺伝子 (<i>light inducible gene</i>) の第2イントロン配列であり、目的遺伝子の発現制御に関わる (Rose, 2008)。
CS- <i>cre</i>	バクテリオファージP1由来のCreリコンビナーゼ遺伝子の第2エキソンの部分配列 (Zhang et al., 2003)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-CDC45- <i>AtI</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>cell division cycle 45</i> (<i>CDC45</i>) 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Stevens et al., 2004; Ye et al., 2023)。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
S ⁷ - <i>Isr-1</i>	隣接する遺伝子が互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化するためのスペーサーとして設計された非コード配列 (Casini et al., 2014) (GenBank accession: MT611522)。
<i>loxP</i>	バクテリオファージP1由来の <i>loxP</i> 組換え部位の配列であり、Creリコンビナーゼにより認識される (Russell et al., 1992)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
T- <i>Hsp20-MtI</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) の熱ショック蛋白質をコードする推定 <i>Hsp20</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: OK149196) で、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS- <i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシンN-アセチルトランスフェラーゼ (PAT) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P- <i>Rca-AtI</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のRubiscoアクチベース遺伝子のプロモーター及び5'末端非翻訳領域の配列で (DeRidder et al., 2012)、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
その他	

*本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えワタの作出に用いたPV-GHHT529207の各構成要素の由来及び機能* (つづき)

構成要素	由来及び機能
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>tdo</i> 遺伝子発現カセット	
<i>E⁸-SVBV-1</i>	Strawberry Vein Banding Virus (SVBV) 由来のエンハンサーで、植物細胞内での転写を高める (Petrzik et al., 1998)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>P-Cab1-Cml</i>	メロン (<i>Cucumis melo</i>) の <i>chlorophyll a/b binding gene (Cab1)</i> 遺伝子のプロモーター及び5'末端非翻訳領域の配列 (GenBank accession: PP436396) で、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>CS-tdo</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>) 由来のトリケトンジオキシゲナーゼ (TDO) のコード配列で、トリケトン系除草剤であるメソトリオンに対する耐性を付与する (Maeda et al., 2019)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>T-guf-Mt3</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の機能未知遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank accession: PP829209) で、転写の終結及びmRNAのポリアダデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
改変 <i>dmo</i> 遺伝子発現カセット	
<i>P-ubq10-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子 <i>ubq10</i> のプロモーター、リーダー及びイントロンで (Norris et al., 1993)、植物細胞における転写を誘導する。
<i>TS-apg6-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の熱ショック蛋白質 (Hsp101) ホモログをコードしている <i>Albino or pale green 6 (Apg6)</i> 遺伝子のターゲティング配列。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する (Myouga et al., 2006)。
<i>CS-改変dmo</i>	<i>Stenotrophomonas 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 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。

表1 本組換えワタの作出に用いたPV-GHHT529207の各構成要素の由来及び機能* (つづき)

構成要素	由来及び機能
T- <i>sali3-2-MtI</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) のアルミニウム誘導性遺伝子 <i>sali3-2</i> の3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank accession: ON111455)、転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
E- <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNAのエンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P- <i>EF-1α</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の伸長因子 <i>EF-1α</i> 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で目的遺伝子の植物体内での恒常発現に関与する (Axelos et al., 1989)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS- <i>Waxy-TaI</i>	コムギ (<i>Triticum aestivum</i>) のWaxy蛋白質をコードする <i>Waxy</i> 遺伝子のターゲティング配列で (GenBank accession: PP829208)、目的蛋白質を葉緑体へ輸送する (Clark et al., 1991; Murai et al., 1999)。
CS-改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4株由来の5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T- <i>E9</i>	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブロー-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の3'末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
S- <i>Isr-2</i>	隣接する遺伝子が互いの発現に及ぼす潜在的な影響を最小化するためのスペーサーとして設計された非コード配列 (Casini et al., 2014) (GenBank accession: PP829207)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

*本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えワタの作出に用いたPV-GHHT529207の各構成要素の由来及び機能* (つづき)

構成要素	由来及び機能
<i>H_N90 PPO</i> 遺伝子発現カセット	
T- <i>FbL2-Gb1</i>	ピマワタ (<i>Gossypium barbadense</i>) 由来の <i>FbLate-2</i> (<i>FbL2</i>) 遺伝子の3'末端非翻訳領域の配列で (Rinehart et al., 1996)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
CS- <i>H_N90 PPO</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> 由来のプロトポルフィリノーゲン酸化酵素 (PPO) のコード配列で、PPO阻害型除草剤耐性を付与する (Larue et al., 2020)。
TS- <i>apg6-At2</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の熱ショック蛋白質 (Hsp101) ホモログをコードしている <i>Albino or pale green 6</i> (<i>Apg6</i>) 遺伝子のターゲティング配列。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する (Myouga et al., 2006)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
L ⁹ - <i>Cyco-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の <i>Cytochrome c oxidase</i> (<i>Cyco</i>) 遺伝子の5'末端非翻訳領域及びイントロンの配列 (GenBank accession: PP829205)で、目的遺伝子の発現制御に関わる (To et al., 2021)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P- <i>GSP442</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の複数のプロモーター及び5'末端非翻訳領域の配列を基に作成されたプロモーター及び5'末端非翻訳領域の配列で (GenBank accession: PP829204)、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (To et al., 2021)。
E- <i>GSP571</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の複数のエンハンサー配列を基に作成されたエンハンサーで (GenBank accession: PP829203)、植物細胞内での転写を高める (To et al., 2021)。
その他	
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<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右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
ベクターバックボーン (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で、特別な機能を有さない。
T- <i>aadA-Ecl</i>	トランスポゾンTn7由来の3''(9)- <i>O</i> -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3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する (Fling et al., 1985)。

表1 本組換えワタの作出に用いたPV-GHHT529207の各構成要素の由来及び機能* (つづき)

構成要素	由来及び機能
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾンTn5に由来し、ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼII (NPTII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
P- <i>rrn</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のリボソームRNAオペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。細菌において恒常的な転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR ¹⁰ - <i>ori</i> -pBR322	プラスミドpBR322由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>nic/bom</i>	プラスミドpBR322に由来し、接合伝達においてシス位に必要な配列 (Finnegan and Sherratt, 1982)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS- <i>rop</i>	プラスミドColE1に由来するrepressor of primer (<i>rop</i>) 蛋白質のコード配列であり、 <i>E. coli</i> 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で、特別な機能を有さない。
OR- <i>ori</i> -p <i>Ri</i>	プラスミドp <i>Ri</i> に由来する複製開始領域。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye et al., 2011)。
Intervening Sequence	DNAクローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

¹ B-Border (境界配列)

² P-Promoter (プロモーター)

³ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

⁴ T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

5 ⁵ CS-Coding Sequence (コード配列)

⁶ I-Intron (イントロン)

⁷ S-Spacer (スペーサー)

⁸ E-Enhancer (エンハンサー)

⁹ L-Leader (リーダー配列)

10 ¹⁰ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

* T-DNA 領域のうち選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセット (P-*Act7-At1*、TS-*CTP2*、*aadA*、T-*nos*、P-*LAT52-Lel*、CS-*cre1*、I-*LS1*、CS-*cre* 及び T-*CDC45-At1*) 並びに S-*Isr-1* 並びに *loxP* 配列の1つは、

Cre/lox 組換えを利用した自己切除法により除去されるため、本組換えワタには存在しない。なお、本組換えワタに存在する構成要素のみを、別添資料 5 の Appendix Table 2 (p45~48) に示している。

- 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 CP4 EPSPS 蛋白質の機能】**

改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、本組換えワタに除草剤グリホサート耐性を付与する。

10 除草剤グリホサートは、植物内在性の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の 1 つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS 蛋白質) を阻害し、細胞死を引き起こす (Franz et al., 1997)。一方で、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成経路が正常に機能して生育することができる。

15 なお、改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する遺伝子組換え農作物は、これまでにワタ、トウモロコシ、ダイズ、セイヨウナタネ等を宿主とする複数の系統において第一種使用規程の承認を受けており (農林水産省, 2024)、いずれの系統も、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。また、本組換えワタで発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は、既に第一種使用規程
20 の承認を受けている除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 (環境省, 2006) で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

【PAT 蛋白質の機能】

PAT 蛋白質は、本組換えワタに除草剤グルホシネート耐性を付与する。

25 除草剤グルホシネートは、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 (OECD, 2006a; OECD, 2006b)。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が蓄積し、枯死する。PAT 蛋白質はグル
30 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 (OECD, 2006a; OECD, 2006b)。グルホシネートは、この酵素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 蛋白質の産生により、
35 除草剤グルホシネートが散布されても枯死しない。

なお、PAT 蛋白質を発現する遺伝子組換え農作物は、これまでにワタ、ト

ウモロコシ、ダイズ、セイヨウナタネ等を宿主とする複数の系統において第一種使用規程の承認を受けており (農林水産省, 2024)、いずれの系統も、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。また、本組換えワタで発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は、既に第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換えワタ DAS1910 (環境省, 2015b) で発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

【改変 DMO 蛋白質の機能】

改変 DMO 蛋白質は、本組換えワタに除草剤ジカンバ耐性を付与する。

除草剤ジカンバは、合成オーキシンの除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって除草活性を示す (Ahrens, 1994)。DMO 蛋白質は、除草剤ジカンバを脱メチル化し、除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (3,6-dichlorosalicylic acid) 及びホルムアルデヒド (HCHO) へと変換する (Chakraborty et al., 2005)。この作用により、改変 DMO 蛋白質は本組換えワタに除草剤ジカンバ耐性を付与している。

なお、改変 DMO 蛋白質を発現する遺伝子組換え農作物は、これまでにワタ、トウモロコシ、ダイズ、セイヨウナタネ等を宿主とする複数の系統において第一種使用規程の承認を受けており (農林水産省, 2024)、いずれの系統も、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。また、本組換えワタで発現する改変 DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、N 末端側に輸送ペプチド由来の付加配列が存在しないことを除き、遺伝子組換えワタ MON88701 系統 (環境省, 2015a) で発現する改変 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。なお、輸送ペプチドに由来する付加配列を N 末端に有する改変 DMO 蛋白質は、N 末端に付加されたアミノ酸配列によらず、N 末端に付加配列をもたない DMO 蛋白質と同等の物理化学的特性及び機能を示すことが実験的に確認されている (Wang et al., 2024a)。

【TDO 蛋白質の機能】

TDO 蛋白質は、本組換えワタにトリケトン系除草剤耐性を付与する。

トリケトン系除草剤は、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPPD) 阻害型除草剤を構成する化学グループの一種である。HPPD は、植物のチロシン代謝経路に関与する酵素であり、HPPD の阻害によって下流の代謝産物であるプラストキノンやトコフェロール類等の欠乏が引き起こされる (Mitchell et al., 2001)。プラストキノンは、光

化学系 II の機能及びカロテノイド生合成に必須であり、カロテノイド及びトコフェロール類は光合成機構の抗酸化に重要な役割を果たしている。感受性植物に対して HPPD 阻害型除草剤を処理することにより、植物においてこれらの防御分子が欠乏し、白化症状を呈し枯死する。

5 ジャポニカ型イネの特定の栽培種は、トリケトン系除草剤に対する自然耐性を有している。この原因蛋白質として二価鉄/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの一種である TDO 蛋白質が同定され、トリケトン系除草剤を酸化することが報告されている (Maeda et al., 2019)。TDO 蛋白質は、他の二価鉄/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼと同様に、鉄と α -ケトグルタル酸を補因子として基質を酸化し、コハク酸と酸化物を生成する。トリケトン系
10 除草剤であるメソトリオン¹を基質とした生化学的試験により、TDO 蛋白質は、メソトリオンの 5 位の炭素を酸化し、HPPD 阻害活性が低下したヒドロキシメソトリオンへ、続いて同じ炭素をさらに酸化し、HPPD 阻害活性が認められないオキシメソトリオンへ変換することが示されている (図 2, p23) (Duff et al.,
15 2024)。また、最終的に、オキシメソトリオンは非酵素的反応によりヒドロキシサントンへと変換された後、グルコシル及びマロニル抱合体へ速やかに代謝されることが報告されている (Dai et al. (2022) の Figure 5(b), p9 及び Figure S6)。TDO 蛋白質は、このようにトリケトン系除草剤を連続的に 2 段階酸化することによって、本組換えワタにトリケトン系除草剤耐性を付与すると考え
20 られる。

 なお、TDO 蛋白質を発現する遺伝子組換え農作物としてこれまでに除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系耐性ダイズ MON94313 が第一種使用規程 (隔離ほ場における栽培等) の承認を受けており (農林水産省, 2024)、承認された第一種使用規程に従って使用し
25 た場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。

¹ 本組換えワタに使用可能なトリケトン系除草剤として、メソトリオンを種子販売時に指定する予定である。

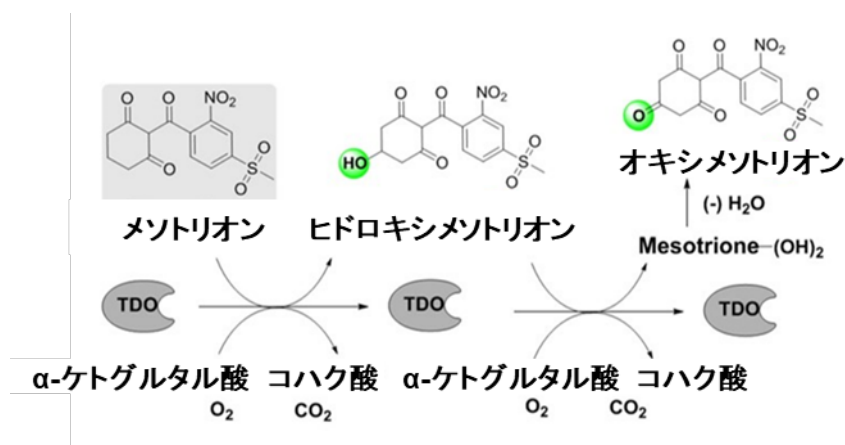


図2 TDO蛋白質の生化学的作用機序*

Duff et al. (2024) の Fig. 5F を改変。

5 【PPO蛋白質の機能】

PPO蛋白質は、原核生物及び真核生物において保存されており、ヘムやクロロフィル等の環状テトラピロールの生成における酵素反応段階であるプロトポルフィリノーゲンIXからプロトポルフィリンIXへの酸化を触媒する(図3, p24)。植物において、PPO蛋白質はPPO阻害型除草剤の標的であり、活性部位にPPO阻害型除草剤が結合することが報告されている(Koch et al., 2004; Corradi et al., 2006)。PPO阻害型除草剤を感受性植物に散布すると、色素体内でのヘム及びクロロフィルの生合成経路におけるプロトポルフィリノーゲンIXの酸化が阻害され(図3, p24)、プロトポルフィリノーゲンIXが蓄積し、色素体から漏出する。細胞質ゾルでプロトポルフィリノーゲンIXはプロトポルフィリンIXに非特異的に酸化され、酸素と光の存在下で急速に活性酸素種を生成する。その結果、制御不能な細胞膜脂質の過酸化が生じ、細胞膜の完全性が喪失し膜崩壊が発生することで細胞死が引き起こされ、最終的に植物は死に至る(Dayan and Duke, 2010)。

PPO蛋白質にはHemY型やHemG型が存在し、これらは相同蛋白質ではないが同一の機能を有する(O'Brian, 2009)。HemY型PPO蛋白質は真核生物及び原核生物に遍在し、陸生植物においてPPO阻害型除草剤の標的である。HemY型PPO蛋白質は、膜結合二量体を形成する酸素依存性の酵素であり、フラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)を補因子とする。一部の細菌はHemY型PPO蛋白質をもたず、その代わりHemG型PPO蛋白質を有している。HemG型PPO蛋白質は、膜結合オリゴマーを形成する酸素非依存性の酵素であり、非共有的に結合したフラビンモノヌクレオチド(FMN)を補因子とする(Boynton et al., 2009; Wang et al., 2024b)。本組換えワタに導入されているE.

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任23バイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

cloacae 由来の *H_N90* PPO 遺伝子から発現する PPO 蛋白質は HemG 型 PPO 蛋白質であり、PPO 阻害型除草剤に対する耐性が調査された結果、PPO 阻害型除草剤の存在下でも継続的に作用し、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酵素的酸化が維持されることが明らかにされている (Larue et al., 2020) (図 3, p24)。実際に、同蛋白質を発現する遺伝子組換えワタ、トウモロコシ、ダイズ、セイヨウナタネは、いずれも PPO 阻害型除草剤に対する耐性を示すことが報告されている (Larue et al., 2020)。このように、*H_N90* PPO 遺伝子から発現する PPO 蛋白質は、PPO 阻害型除草剤の存在下においても、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酸化を触媒することによって、本組換えワタに PPO 阻害型除草剤耐性を付与している。

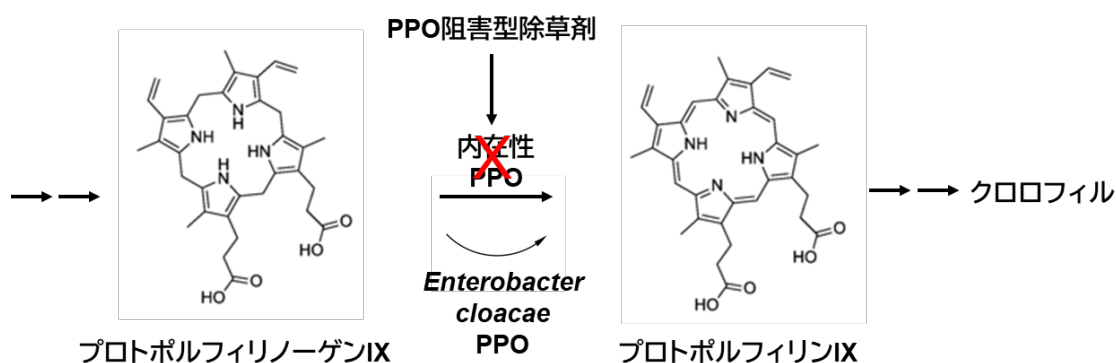


図 3 本組換えワタのクロロフィル生合成経路における *E. cloacae* 由来の PPO 蛋白質の作用機序*

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質と既知のアレルゲンの相同性】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質が既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、AD_2024²に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

²AD_2024: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) データベースに登録されている配列から構成されるデータベースで、2,748 件のアミノ酸配列が含まれる (2024 年 2 月 2 日更新)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下「S3P」という。) と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外には S3P の類似体であるシキミ酸が唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られている。しかしながら、酵素の触媒効率を示す特異性定数 k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS 蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS 蛋白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。

以上のことから、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い特異性を有することが知られている。グルホシネートはアミノ酸ホスフィノスリシンの D 体と L 体のラセミ混合物であるが、グルホシネートの除草剤活性は L 体のアミノ酸である L-ホスフィノスリシンが有している (OECD, 2006b; OECD, 2006a)。PAT 蛋白質は L-ホスフィノスリシンに特異的に活性を示し、その他の L 体アミノ酸及び D-ホスフィノスリシンは、PAT 蛋白質によりアセチル化されることはないと報告されている (Wehrmann et al., 1996; OECD, 2006a)。グルホシネート及び高濃度のその他 L 体アミノ酸を基質として供試した競合アッセイでは、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化の阻害は認められなかった (Wehrmann et al., 1996)。なお、近年の代謝プロファイリングにおいて、シロイヌナズナ及び複数の植物で 2 つのアミノ酸 (アミノアジピン酸及びトリプトファン) の PAT 蛋白質を介した非特異的なアセチル化が報告されている (Christ et al., 2017)。しかしながら、これら 2 つのアミノ酸に対する PAT 蛋白質の活性は、L-ホスフィノスリシンに対する活性と比べて非常に低い³ものであり、PAT 蛋白質の L-ホスフィ

³ PAT蛋白質のL-ホスフィノスリシンに対する活性の指標となる V_{max}/K_m は $1.96E-03$ であるのに対し、アミノアジピン酸及びトリプトファンに対する V_{max}/K_m はそれぞれ $8.38E-08$ (前者の20,000分の1以下) 及び $1.08E-08$ (同180,000分の1以下) と報告されている (Christ et al., 2017)。

ノスリシンに対する高い基質特異性を否定するものではない。

以上のことから、PAT 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

5 【改変 DMO 蛋白質】

DMO 蛋白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。ジカンバは、フェニル環上のカルボキシ基及びクロロ基を介して、DMO 蛋白質の触媒部位のアミノ酸と相互作用することが知られており、このクロロ基がジカンバの代謝に必須である (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。植物及び他の真核生物において、ジカンバのようにクロロ基を含むフェニル環からなる化合物の存在は限定的であることが知られていることから (Gribble, 2010)、改変 DMO 蛋白質が植物の内在性化合物を代謝することは考え難い。実際に、クロロ基を有さず、カルボキシ基及びメトキシ基のみを有するフェニル環からなる植物内在性化合物のうち、最も構造的にジカンバに類似している *o*-アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) についても、DMO 蛋白質によって代謝されないことを、除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 (2013 年 10 月 31 日承認) の生物多様性影響評価において確認している (環境省, 2013)。

以上のことから、改変 DMO 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

20 【TDO 蛋白質】

TDO 蛋白質については、TDO 蛋白質を発現する組換えダイズ MON94313 の生物多様性影響評価において、その植物内在性化合物に対する特異性を精査している。その中で、*in silico* スクリーニングにより植物代謝産物データベースから選定⁴され、かつ入手可能であった 32 の植物内在性化合物、メソトリオン及び他の HPPD 阻害型除草剤に対する TDO 蛋白質の活性を生化学的解析により評価した結果、TDO 蛋白質は、選定したいずれの植物内在性化合物に対しても活性を示さず、HPPD 阻害型除草剤のうちトリケトン系除草剤 (メソトリオン、テンボトリオン、スルコトリオン) に対してのみ特異的な活性を示したことから、TDO 蛋白質が内在性化合物を代謝して宿主であるダイズの代謝系に影響を及ぼすことは極めて低いと評価している。

⁴ TDO蛋白質の既知の基質であるメソトリオンとの構造的類似性及びTDO蛋白質の活性部位へのメソトリオンの予想立体配座を基準とした*in silico*スクリーニングにより、トウモロコシ、ナタネ、ワタ、コムギ、ダイズを含む様々な生物学的資源に由来する天然物のデータベースNAPRALERT (<https://pharmacognosy.pharmacy.uic.edu/napralert/>) から、潜在的な基質となりうる植物内在性化合物を選定した。

以上のことから、本組換えワタにおいても TDO 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

【PPO 蛋白質】

5 本組換えワタは、*E. cloacae* 由来の *H_N90 PPO* 遺伝子から HemG 型 PPO 蛋白質を発現する。上述のとおり、HemY 型及び HemG 型 PPO 蛋白質は、いずれもヘム及びクロロフィル生合成経路においてプロトポルフィリノーゲン IX を基質とするが (O'Brian, 2009)、PPO 阻害型除草剤に対する感受性において差を有している。実際に、*H_N90 PPO* 遺伝子から発現する HemG 型 PPO 蛋白質は、HemY 型 PPO 蛋白質とは対照的に PPO 阻害型除草剤に対して顕著な非感受性を示す一方で、プロトポルフィリノーゲン IX に対して HemY 型 PPO 蛋白質と同様の *Km* 値を示すことが明らかにされている (Larue et al., 2020)。

10 PPO 蛋白質は、ヘム及びクロロフィル生合成経路の律速酵素として知られておらず、同経路の制御においては、最終産物であるヘム及びクロロフィルによってフィードバック阻害を受けるグルタミル tRNA レダクターゼ (GluTR, Glutamyl t-RNA Reductase) が重要とされている (Tanaka and Tanaka, 2007) (図 4, p28)。実際に、同経路におけるアミノレブリン酸 (ALA) 合成以降の中間体は、いずれも過剰に蓄積した場合、光の下で植物体にとって潜在的に有害な活性酸素種を生成するおそれがあるため、GluTR のフィードバック阻害により

15 ALA 合成を制御する生理的な利点は大きいとされている (Tanaka and Tanaka, 2007)。さらに、本経路に関与する遺伝子の発現誘導によって、クロロフィルや中間体の過剰蓄積を引き起こした事例はこれまでに報告されていない (Tanaka and Tanaka, 2007)。これらのことから、本組換えワタにおいて内在性の HemY 型 PPO 蛋白質に加えて HemG 型 PPO 蛋白質が発現することで、本経路

20 の最終産物であるヘム及びクロロフィルの濃度が従来ワタにおける変動の範囲を超えて高まることは想定し難い。

25

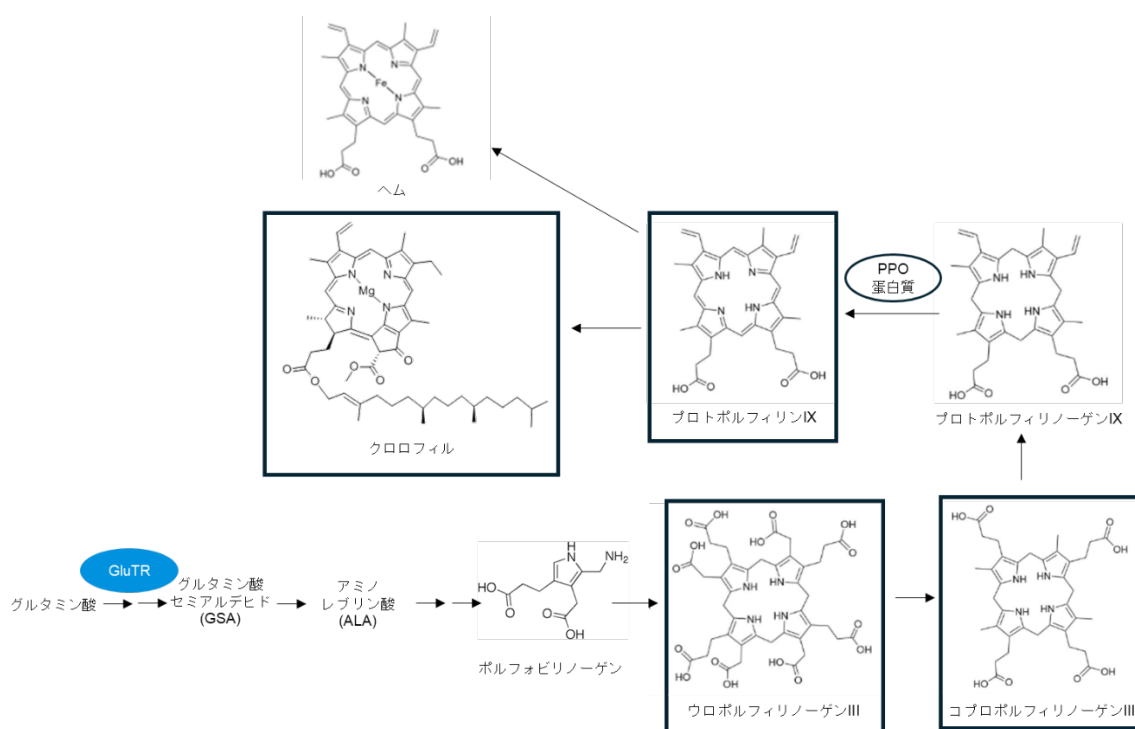


図4 ヘム及びクロロフィル生合成経路*

四角で囲まれた化合物のうち、クロロフィルはそれ自体が、クロロフィル以外の 3 化合物はその誘導体が植物代謝産物データベースに対する *in silico* スクリーニングにより同定された (詳細は本文を参照)。本経路の制御においては、最終産物であるヘム及びクロロフィルによってフィードバック阻害を受ける GluTR (グルタミル tRNA レダクターゼ、図内に青円で示す。) が重要であるとされている (Tanaka and Tanaka, 2007)。PPO 蛋白質は、プロトポルフィリノーゲン IX からプロトポルフィリン IX への酸化を触媒する。

10

HemG 型 PPO 蛋白質は、HemY 型 PPO 蛋白質と同様に、ポルフィリノーゲン化合物であるプロトポルフィリノーゲン IX を、補因子の助けにより環状テトラピロール構造をエナミンからイミンへ互変異性化することで、ポルフィリン化合物であるプロトポルフィリン IX へと酸化する (Koch et al., 2004; Boynton et al., 2009)。また、HemG 型 PPO 蛋白質については、これまでに精製蛋白質を用いた酵素活性試験により、プロトポルフィリノーゲン IX、コプロポルフィリノーゲン III 及びその類縁体メソポルフィリノーゲンの 3 種類のポルフィリノーゲン化合物のうち、プロトポルフィリノーゲン IX にのみ活性を示し、コプロポルフィリノーゲン III 及びメソポルフィリノーゲンに対しては活性を示さないことが報告されている (Boynton et al., 2009)。このことから、ヘム及びクロロフィル生合成経路において、HemG 型 PPO 蛋白質は、プロトポルフィリノーゲン IX に特異的な活性を有することが示唆される。

20

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

HemG 型 PPO 蛋白質の潜在的基質となりうる、プロトポルフィリノーゲン IX と類似したワタ内在性化合物の有無を確認するために、ワタ内在性化合物を含む上述の植物代謝産物データベース中の全化合物 (155,000 超) を対象に、化合物間の類似性の尺度である Tanimoto スコア⁵を算出することにより、プロトポルフィリノーゲン IX と分子的類似性の高い化合物の *in silico* スクリーニングを実施した。その結果、データベース中の全化合物のうち、最も Tanimoto スコアが高い化合物のスコアは 0.47 であり、プロトポルフィリノーゲン IX とスコア 0.85 を超える分子的類似性を示す化合物は同定されなかった (表 2, p29 及び図 5, p30)。

表 2 プロトポルフィリノーゲン IX と Tanimoto スコア 0.2 以上の分子的類似性を示した植物代謝産物データベース中の化合物とそのスコア*

Compound ID	IUPAC 名又は慣用名	Tanimoto スコア
169785	イソコプロポルフィリン	0.47
11103	ヘマトポルフィリン	0.44
96772	コプロポルフィリン I	0.35
72424	ウロポルフィリン	0.26
6433192	クロロフィル	0.24
15086398	カンナビシン A	0.23
3085061	6-メトキシゴッシポール	0.22
3503	ゴッシポール	0.22
44144519	diethyl [(5 <i>R</i> ,6 <i>R</i>)-6-[2-(methoxymethoxy)-5-prop-2-enylphenyl]-2-methyl-5-prop-1-en-2-ylcyclohexen-1-yl] phosphate	0.22
375713	6,6'-メトキシゴッシポール	0.21
25202994	4-formyl-3-hydroxy-8a-methyl-7-(4-methylpent-3-enyl)-9,10-dioxo-1-propan-2-yl-8,10a-dihydro-5H-anthracen-2-olate	0.20

⁵ Tanimotoスコアは、2種類の化合物間の分子的類似性を0~1で表す尺度である。化合物Aと化合物B間のTanimotoスコアは、化合物Aと化合物Bのフィンガープリント (化合物内の特定の部分構造や構造的特徴の有無を0又は1で表現したもの) の積集合の要素数を、和集合の要素数で割ることで算出する。本解析では、フィンガープリントとして化合物内の原子の種類、結合の種類、原子間距離を考慮したアトムペアフィンガープリントを用いて Tanimotoスコアを算出した。Tanimotoスコアが0.85より大きければ、2種類の化合物が類似である確率が高いことを示す (Patterson et al., 1996)。

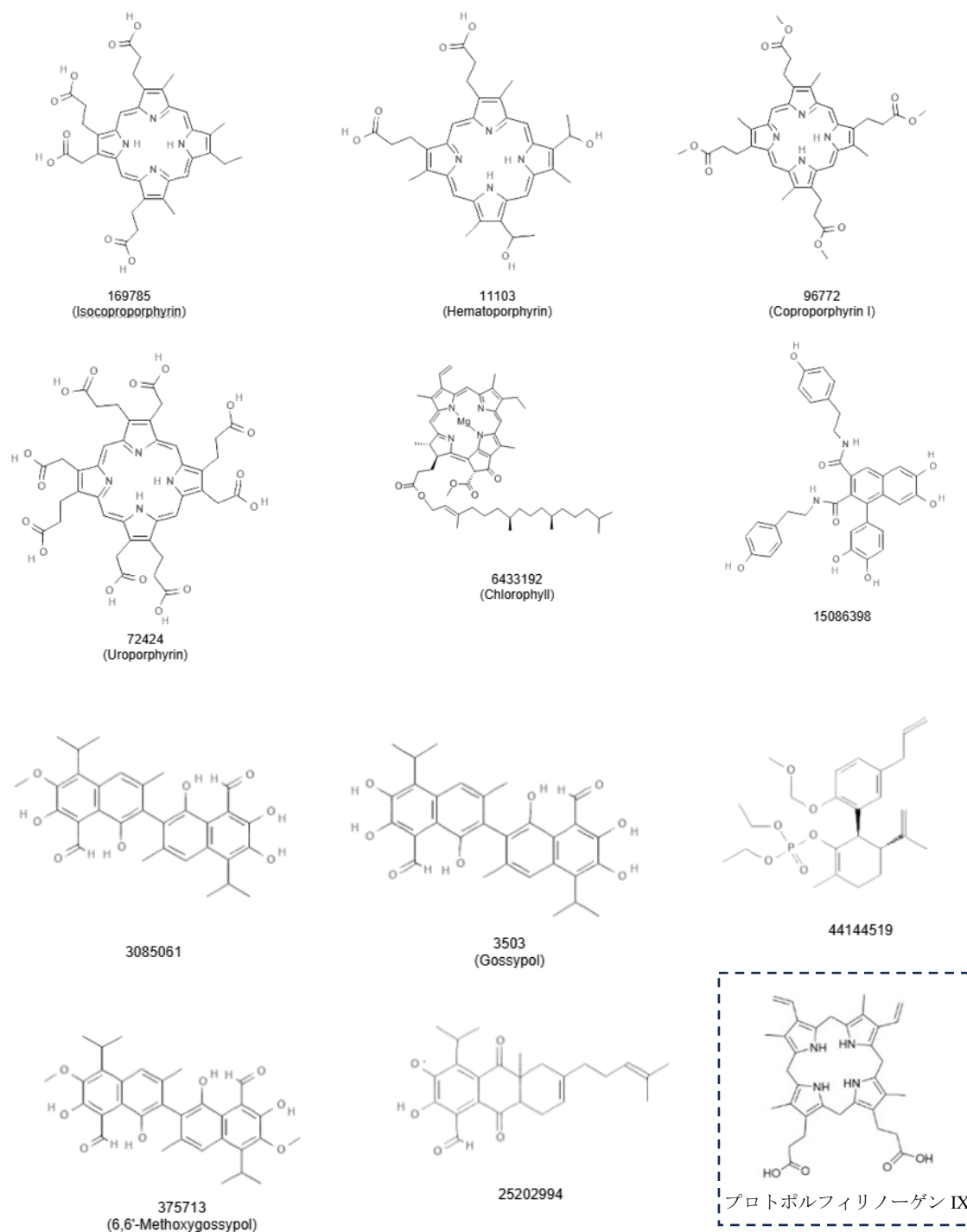


図5 プロトポルフィリノーゲン IX と Tanimoto スコア 0.2 以上の分子的類似性を示した植物代謝産物データベース中の化合物の構造式*

- 5 各構造式下の数字は表 2 に記載された Compound ID を示す。スクリーニングに用いたプロトポルフィリノーゲン IX の構造式を破線で囲み右下に示す。

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

また、Tanimoto スコア上位 5 化合物 (イソコプロポルフィリン⁶、ヘマトポ
ルフィリン⁷、コプロポルフィリン I⁸、ウロポルフィリン⁹及びクロロフィル)
はいずれもポルフィリン化合物であった (表 2, p29 及び図 5, p30)が、酸化され
た環状テトラピロールを有するこれらポルフィリン化合物が、HemG 型 PPO 蛋
白質によってさらに酸化されることは考え難い。加えて、環状テトラピロー
ルを有するポルフィリノーゲン化合物であるプロトポルフィリノーゲン IX の
構造的 특異性を考慮すると、HemG 型 PPO 蛋白質が他の植物内在性化合物に
対して活性を示すことは想定し難い。

以上のことから、PPO 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて
低いと考えられる。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び
PPO 蛋白質間の相互作用】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び
PPO 蛋白質はいずれも基質特異性が高い上、各蛋白質の基質は異なり、関与
する代謝経路も互いに独立している。よって、本組換えワタで発現している
これら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。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT529207 は、*Escherichia coli* 由来のプラ
ズミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) 等をもとに構築した。詳細を表 1 (p13~19) に記載
した。

⁶ コプロポルフィリノーゲン III の酸化物であるコプロポルフィリン I の異性体。

⁷ プロトポルフィリン IX の誘導体。

⁸ コプロポルフィリノーゲン III の酸化物。

⁹ ウロポルフィリノーゲン III の酸化物。

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た PV-GHHT529207 の全塩基数は 30,307 bp である。なお、PV-GHHT529207 の塩基配列を別添資料 2 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

- 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、ネオマイシン及びカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子がベクターバックボーンに存在している。

- 15 形質転換体の選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域に存在している。なお、本組換えワタの育成の過程で *aadA* 遺伝子は除去されるので、本組換えワタには存在しない (第一の 2-(3)-ハ-③, p33~36)。

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

- 20 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

25 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-GHHT529207 の構成要素を表 1 (p13~19) 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を図 1 (p12) に示した。

30 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-GHHT529207 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えワタ品種 DP393 の種子から採取した分裂組織に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

5 非組換えワタ品種 DP393 の種子から採取した分裂組織と PV-GHHT529207 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AB33 株を共存培養した後、スペクチノマイシン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。

10 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

カルベニシリン、セフトキシム及びチメンチン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を除去した。さらに、本組換えワタの R₃ 世代の種子¹⁰において、形質転換に用いた PV-GHHT529207 のベクターバックボーンを標的とした PCR を行ったところ、本組換えワタには PV-GHHT529207 のベクターバックボーンは存在しなかった (別添資料 3 の Table 1, p12)。このことから、本組換えワタには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことを確認した。

20 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

25 形質転換に用いた PV-GHHT529207 の T-DNA 領域は、形質転換体の選抜マーカー遺伝子である *aadA* 遺伝子を含むが、形質転換当代 (R₀ 世代) において、Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法によって *aadA* 遺伝子を含む領域を除去した (図 6, p35)。そのため、形質転換体に導入された PV-GHHT529207 の T-DNA 領域のうち、Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法を経て最終的に本組換えワタに残った領域を本組換えワタの導入遺伝子領域という。

ここで、Cre/*lox* 組換えを利用した選抜マーカー遺伝子の除去について説明する。Cre/*lox* 組換えでは、Cre リコンビナーゼを介した部位特異的組換えによって、2つの *lox* と呼ばれる標的配列の間に位置する DNA 配列がゲノムから切

¹⁰バルクにした収穫種子の中からランダムに約50粒取り、DNAを抽出しPCRに用いた。

り出され、1つの *lox* 配列が残る (Hare and Chua, 2002; Zhang et al., 2003)。Cre リコンビナーゼを発現する系統と、目的遺伝子及び *lox* 配列間に選抜マーカー遺伝子を有する系統を交配することで Cre/*lox* 組換えを誘導し、選抜マーカー遺伝子を除去する手法 (交配による Cre/*lox* 組換え法) は、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ MON95379 等の第一種使用規程の承認を受けている複数の遺伝子組換え農作物の育成に既に利用されている (環境省, 2022)。

従来の交配による Cre/*lox* 組換え法に対し、本組換えワタの育成には Cre/*lox* 組換えを利用した自己切除法を用いている。この手法の概略を図 6 (p35) に示す。本手法では、目的遺伝子、選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子を有する T-DNA を導入した形質転換体において、生殖期の生殖細胞系列で Cre リコンビナーゼの発現を誘導することで選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子をゲノムから除去しており、交配による Cre/*lox* 組換え法と比べて 1 世代早い段階で選抜マーカー遺伝子が除去された世代を育成することが可能である。

形質転換された再分化個体 (R_0 世代) を自殖し、 R_1 世代を作出した。 R_1 世代において、選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子のいずれも有さず、導入遺伝子領域をホモで有する個体を、定量的 PCR により選抜した。こうして得られた R_1 個体の後代から、望ましい農業特性 (意図しない性質や生産者にとって望ましくない性質を示さず、宿主と同等の収量等を示すこと)、形質の有効性、表現型、導入遺伝子領域の存在状態等を指標に最終的に本組換えワタを選抜した。

本組換えワタの育成図を図 7 (p36) に示した。なお、本申請の対象は、 R_4 世代及び同世代から派生する全ての交雑後代系統である。

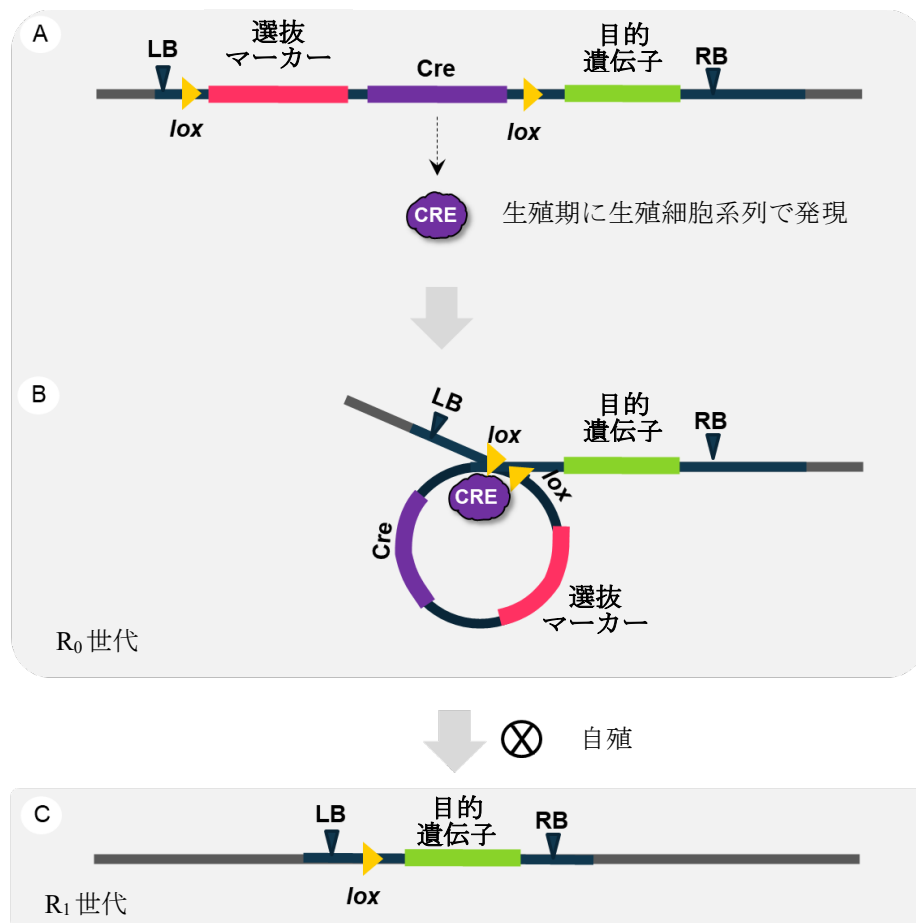


図6 Cre/lox組換えを利用した自己切除法の概略*

A. 目的遺伝子に加え、*lox* 配列の間に選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセットを有する T-DNA 領域を導入した形質転換体を作成する。

- 5 B. 選抜マーカーを利用した選抜を経て、形質転換当代 (R₀ 世代) において、Cre リコンビナーゼの発現が生殖期の生殖細胞系列において誘導され、*lox* 配列間の選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセット並びに *loxP* 配列の 1 つがゲノムから切除される。

C. R₀ 世代の自殖により得られた R₁ 世代は、選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセットをもたず、目的遺伝子及び *loxP* 配列の 1 つのみを有する。

10

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

5

【社外秘につき非開示】

10

図 7 本組換えワタの育成図

【社外秘につき非開示】

15

(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 本組換えワタの導入遺伝子領域が染色体上に存在するか否かを調べるため、
本組換えワタ (R₃ 世代) の導入遺伝子領域の 5'及び 3'末端近傍配列をクエリー
配列として、FASTA 型アルゴリズムによりワタのゲノムデータベース
(GHI_2024¹¹) に対して相同性検索を行った (別添資料 4)。その結果、本組換
えワタの導入遺伝子領域はゲノムの D08 番染色体に座乗していることを確認
10 した (別添資料 4 の Figure 2, p10)。

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

15 本組換えワタにおける導入遺伝子領域の挿入箇所数及びコピー数、ベクタ
ー由来の非意図的な配列の有無、導入遺伝子領域及びその近傍配列の塩基配
列並びに複数世代における伝達の安定性を確認するために、次世代シーケン
シング (NGS, Next Generation Sequencing)¹² 並びに導入遺伝子領域の PCR 及
び塩基配列解析を実施した (別添資料 5)。

20 NGS では、本組換えワタ及び対照の非組換えワタから抽出したゲノムを
ランダムに断片化し、断片の両端から約 150 bp ずつの短い塩基配列 (リード)
をシーケンシングするペアエンド法により、全ゲノムの解析に十分な量を解
析した。その結果、本組換えワタ (R₃ 世代) で 311.6 Gb (平均リード深度¹³137)、
25 対照の非組換えワタで 288.0 Gb (平均有効リード深度 98) の塩基配列を解析
し、いずれも平均有効リード深度が 75 を超えること¹⁴を確認した (別添資料

¹¹ GHI_2024: ワタのリファレンスゲノム (GCF_007990345.1_Gossypium_hirsutum_v2.1、ダウ
ンロード日: 2024年1月16日) から抽出されたデータベースである。

¹² NGS解析は、塩基配列解析とバイオインフォマティクスにより、サザンブロッティング
と同等の分子特性解析を可能とする技術である。NGS解析においては、フラグメント化し
た大量のサンプルゲノムDNAの配列を解析することで、全ゲノム解析を行う。次に、これ
らのフラグメントの塩基配列情報を用い、T-DNA領域と宿主の内在性配列との接合領域を
特定することで、T-DNA領域の導入箇所数及び配列並びに非意図的な断片の有無を決定する
(Kovalic et al., 2012)。

¹³ 平均リード深度は、ワタゲノムに1コピーで存在する内在性座位 (NC-053432.1) について
読まれた塩基数から算出した。

¹⁴ 平均リード深度が75以上であれば導入遺伝子領域の全ての配列を検出することが可能で
あること (Kovalic et al., 2012) 及び平均リード深度が11であっても25塩基長の短い導入遺伝
子領域の配列及び非意図的な配列を検出できることが報告されている (Cade et al., 2018)。

5 の Appendix Table 3, p49)。

本組換えワタ (R₃ 世代) に由来するリードを PV-GHHT529207 の塩基配列とアライメント¹⁵した結果、導入遺伝子領域の全ての配列が検出されていることを確認した (別添資料 5 の Appendix Figure 4, p54)。なお、導入遺伝子領域のうち *T-FbL2-Gb1* 領域に大量のリードのマッピングが認められたが、同様の結果が対照の非組換えワタに由来するリードを PV-GHHT529207 の塩基配列とアライメントした場合にも認められたことから、この領域の塩基配列とワタ内在性塩基配列との一致を示したものであると考えられた (別添資料 5 の Appendix Figure 4, p54 及び Appendix Figure 16, p97)。また、T-DNA 領域のうち *Cre/lox* 組換えを利用した自己切除法により除去された領域の一部 (*P-LAT52-Le1*、*T-CDC45-At1* と *S-Isr-1* にまたがる 30 bp) にリードのマッピングが認められたが、同様に、この領域の塩基配列とワタ内在性塩基配列の一致を示したものであると考えられた (別添資料 5 の Appendix Figure 4, p54 及び Appendix Figure 16, p97)。加えて、PV-GHHT529207 のベクターバックボーンにある *OR-ori-pBR322* 領域において1つのリードがマッピングされたが、*OR-ori-pBR322* 領域を含むベクター由来の配列の散発的かつ少数のリードの検出は過去にも報告されていることから (Zastrow-Hayes et al., 2015)、このマッピングはゲノム DNA の調製中に混入した環境に遍在する細菌に由来するものであると考えられた。この解析から、本組換えワタには、*Cre/lox* 組換えを利用した自己切除法により除去された選抜マーカー遺伝子及び *cre* 遺伝子発現カセット領域を含め、PV-GHHT529207 に由来する非意図的な配列が挿入されていないことを確認した。

また、導入遺伝子領域の挿入箇所数を決定するため接合領域の解析を行った結果、本組換えワタでは2つの接合領域が特定された (別添資料 5 の p29)。これらはそれぞれ導入遺伝子領域の 5' 及び 3' 末端を含む配列であった (別添資料 5 の Appendix Figure 30, p111~112, 末尾の confidential attachment に収録)。対照の非組換えワタでは、接合領域は特定されなかった (別添資料 5 の p29)。

以上の解析から、本組換えワタの核ゲノム中 1 か所に 1 コピーの導入遺伝子領域が組み込まれており、ベクター由来の非意図的な配列は挿入されていないことを確認した。

また、本組換えワタ (R₃ 世代) において検出された導入遺伝子領域、接合領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、

¹⁵ Bowtie 2 v2.3.4.1 (Langmead and Salzberg, 2012) を使用して、解析した塩基配列をアライメントした。Bowtie 2 でフラグメントの片側の配列に対するアライメントを行う場合、30 bp 以上の相同性を検出基準としている。

目的の遺伝子が導入されていることを確認した (別添資料 5 の Appendix Figure 6, p56~62 及び Appendix Figure 7, p63~86, 末尾の confidential attachment に収録)。なお、本組換えワタにおける導入遺伝子領域の模式図を図 8 (p40) に示した。

- 5 さらに、複数世代 (R_3 、 R_4 、 R_5 、 R_6 及び R_7 世代) の本組換えワタを対象にした NGS において、導入遺伝子領域が安定して後代に遺伝していることを確認した (別添資料 5 の p33)。

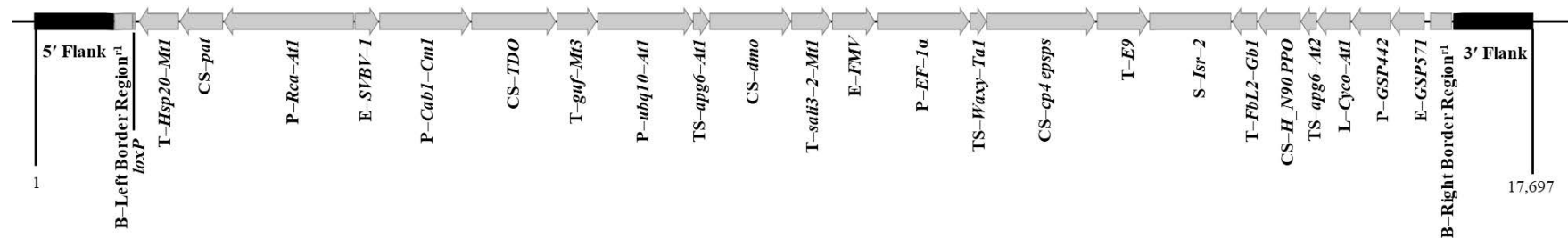


図8 本組換えワタにおける導入遺伝子領域の模式図*

本組換えワタにおける導入遺伝子領域中の構成要素の大きな位置と配列の方向を示す。黒い太線は近傍配列を示す。なお、本組換えワタにおける導入遺伝子領域の配列は、PV-GHHT529207 における該当領域の配列と一致している。図中の「rl」の表記は、本組換えワタに導入された B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が、PV-GHHT529207 の当該エレメントと比較して短くなっていることを示す。

5

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- 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 コピーのため該当しない (別添資料 5 の p29)。

5

- 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

10 本組換えワタの複数世代 (R₃、R₄、R₅、R₆及び R₇ 世代) の種子において、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質が安定して発現していることを、ウエスタンブロッティングにより確認した (別添資料 6 の Figure 2~6, p16~20)。

15 また、2023 年に米国の 1 か所 (ミシシッピ州) で行ったほ場試験において本組換えワタ (R₅ 世代) の葉のサンプルを採取し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 7)。その結果、全ての蛋白質について、本組換えワタの葉における発現を確認した (表 3, p41)。

20

表 3 本組換えワタの葉における除草剤耐性を付与する蛋白質の発現量 (2023 年、米国)*

蛋白質	生育段階 ¹	平均値 (SE) 範囲 (µg/g DW) ²	LOQ/LOD (µg/g DW) ³
改変CP4 EPSPS 蛋白質	花芽形成期	260 (7.8) 240 - 280	0.156/0.066
PAT 蛋白質	花芽形成期	18 (0.66) 17 - 20	0.312/0.132
改変 DMO 蛋白質	花芽形成期	86 (5.5) 75 - 97	0.050/0.020
TDO 蛋白質	花芽形成期	70 (2.3) 64 - 75	0.100/0.054
PPO 蛋白質	花芽形成期	18 (0.13) 18 - 18	0.376/0.084

¹ 発現量分析に供した葉の採取時における生育段階。

25 ² 蛋白質の発現量は組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (µg) の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値 - 最大値) として表示している (n=4)。平均値及び範囲は有効数字 2 桁に四捨五入している。SE=標準誤差、DW=乾燥重。

³ LOQ=limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)。

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、EndPoint TaqMan PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 8)。検定に用いる葉の DNA 量は、PCR の 1 反応当たり 5~20 ng であることが推奨されている。

15 本法の再現精度は、ポジティブサンプルとして供試した本組換えワタ 45 サンプル及びネガティブサンプルとして供試したワタ 45 サンプルを用いて確認されている (別添資料 8 の Table 1, p13)。

(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 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子、改変 *dmo* 遺伝子、*tdo* 遺伝子及び *H_{N90} PPO* 遺伝子は、それぞれ改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質を発現することにより、除草剤グリホサート耐性、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、トリケトン系除草剤耐性及び PPO 阻害型除草剤耐性を付与する。

30 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

宿主であるワタについて、我が国に交雑可能な近縁野生種は存在しない。

35 現在、我が国では、ワタの商業用栽培は行われておらず、観賞用等の目的で栽培されているのみである。また、これまでに我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、我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。

第一の 2-(1)-ロ-③ (p25~31) で論じたとおり、本組換えワタで発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質が、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は極めて低い。加えて、いずれの蛋白質も基質特異性が高い上、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立していることから、これら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 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子、改変 *dmo* 遺伝子、*tdo* 遺伝子及び *H_N90 PPO* 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除草剤グリホサート耐性、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、トリケトン系除草剤耐性及び PPO 阻害型除草剤耐性以外に及ぶとは予想されにくい。

以上のことから、本組換えワタの隔離ほ場試験を行うに当たっては、これまでに海外で得られた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考えられる。

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。

①形態及び生育の特性、②成体の越冬性、③花粉の稔性及びサイズ、④種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、⑤有害物質の産生性

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。

(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：バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場

使用期間：承認日から 2031 年 12 月 31 日まで

① 隔離ほ場の施設

- 1) 部外者の立入を防止するため、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。
- 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、播種時には防鳥網等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) 本組換えワタ及び比較対象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。
- 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象のワタを隔離ほ場内に鋤込む等により、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。
- 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) までに掲げる事項について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。

(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

- (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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

5

- (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

—

10

- (6) 国外における使用等に関する情報

これまで本組換えワタについて2019~2024年の間に米国において延べ99か所のほ場試験が行われているが(表4, p46)、対照の非組換えワタと比較して生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

15

なお、本組換えワタの海外における申請予定は表5 (p46) のとおりである。

表 4 国外において本組換えワタのほ場試験を行ったほ場の数及び国*

年	ほ場の数	国
2019	12	米国
2020	31	米国
2021	13	米国
2022	20	米国
2023	15	米国
2024	8	米国

表 5 本組換えワタの海外における申請予定*

5

2025 年 8 月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2025年6月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2025年6月
米国農務省 (USDA)	環境	【申請予定】
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2025年7月
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	【申請予定】

*本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス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

第一の 2-(6)-② (p42) に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入した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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

10

ワタの種子は綿毛で覆われているため脱粒性は低く、ワタ栽培種は育種によって休眠性は最小限に抑えられている、又は完全に失っている (OECD, 2008)(第一の 1-(3)-ニ-①, p7)。また、我が国には、こぼれ落ちた際に発芽可能な種子の形態で飼料用や製油用としてワタが輸入されているが、2014 年から 2016 年にかけて行われた農林水産省の調査においては、輸入されたワタの種子の流通時のこぼれ落ちに由来すると考えられる個体が自生していた例は確認されていない (農林水産省, 2017b)。

15

自生能力をもたない栽培作物を宿主とした遺伝子組換え農作物が競合における優位性を獲得するには、まず自生能力を獲得することが必要であり、それには自生能力に必須の特性である種子の脱粒性及び休眠性の変化が必要であると考えられている (後藤ら, 2018)。

20

本組換えワタには、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質の発現により除草剤グリホサート耐性、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、トリケトン系除草剤耐性及び PPO 阻害型除草剤耐性が付与されているが、これらが上述した自生能力に必須の特性に関与することは考え難い。

25

加えて、除草剤が散布されることが想定されにくい自然条件下において、これらの形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、これらの形質の付与により栽培作物であるワタが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

30

以上のことから、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

—

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

2 有害物質の産生性

15

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ワタの種子中には、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 (マルバリン酸、ステルクリン酸等) が含まれている (OECD, 2008)。ワタの種子中にこれらの有害物質が含まれていることや、種子が大量の繊維に覆われていること等から、鳥類や野生の哺乳動物はワタ種子の摂食を避けると考えられる (第一の 1-(3)-へ, p8)。また、我が国では、現在、ワタの商業用栽培は行われておらず、地域振興や観賞の用途としてわずかに栽培されているのみとなっている (第一の 1-(2), p5~6)。加えて、農林水産省の調査では、輸入されたワタの種子の流通時のこぼれ落ちに由来すると考えられる個体が我が国で自生化した例は確認されていない (第二の 1-(1), p47)。したがって、ワタを主要な食餌植物とする野生動物等が我が国に生息するとは考え難い。

本組換えワタでは除草剤グリホサート耐性、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、トリケトン系除草剤耐性及び PPO 阻害型除草剤耐性をそれぞれ付与する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質が発現しているが、いずれも有害物質としては知られておらず、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を確認している (第一の 2-(1)-ロ-②, p20~24)。

また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p25~31) に記載したように、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、

PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質は、いずれも高い基質特異性を有し、構造的に類似する植物内在性化合物を基質とすることは想定し難いため、これらの蛋白質が宿主の代謝系に作用して新たな有害物質を産生することは考えにくい。加えて、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立していることから、これら蛋白質が、植物体において相互に影響し、予期しない有害物質を産生することも考えにくい。

以上のことから、有害物質の産生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

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では、本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の近縁野生種は自生していない。よって、交雑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

—

(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、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。

10 4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

- 第一の 2-(6)-② (p42~43) に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入した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は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：

- ワタの脱粒性は低く、栽培種の休眠性は最小限に抑えられている、又は完全に失われている。2014年から2016年にかけて行われた農林水産省の調査においても、我が国に輸入されたワタの種子の流通時のこぼれ落ちに由来すると考えられる個体が自生していた例は確認されていない。

- 本組換えワタには除草剤グリホサート耐性、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、トリケトン系除草剤耐性及び PPO 阻害型除草剤耐性が付与されているが、これらが自生能力に必須の特性に関与することは考え難い。加えて、除草剤が散布されることが想定されにくい自然条件下において、これらの形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。そのため、これらの形質の付与により栽培作物であるワタが自然条件下で自生し、さらに競合における優位性が高まるとは考えにくい。

- したがって、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。

有害物質の産生性：

- ワタの種子中には、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おり、これらの有害物質が含まれていることや、種子が大量の繊維に覆われていること等から、鳥類や野生の哺乳動物はワタ種子の摂食を避けると考えられる。また、我が国では、現在、ワタの商業用栽培は行われておらず、観賞用途等でわずかに栽培されているのみとなっている。加えて、輸入されたワタの種子の流通時のこぼれ落ちに由来すると考えられる個体が我が国で自生化した例は確認されていない。したがって、ワタを主要な食餌植物とする野生動物等が我が国に生息するとは考え難い。

- 本組換えワタでは改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質は有害物質としては知られておらず、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を確認している。また、これらの蛋白質は、いずれも高い基質特異性を有し、宿主の代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる上、植物体において相互に影響することも考え難いことから、宿主の代謝系に作用して新た

な有害物質を産生するとは考えにくい。

したがって、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 交雑性：

我が国では、本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属に属する近縁野生種は自生していないため、交雑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。

したがって、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。

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、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.

Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. Molecular and General Genetics 219: 106-112.

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.

Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. Nucleic Acids Research Supplement (2): 91-92.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327-336.

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.

Boynton, T.O., L.E. Daugherty, T.A. Dailey and H.A. Dailey. 2009. Identification of *Escherichia coli* HemG as a novel, menadione-dependent flavodoxin with protoporphyrinogen oxidase activity. Biochemistry 48: 6705-6711.

Cade, R., K. Burgin, K. Schilling, T.-J. Lee, P. Ngam, N. Devitt and D. Fajardo. 2018. Evaluation of whole genome sequencing and an insertion site characterization method for

molecular characterization of GM maize. *Journal of Regulatory Science* 6(1):1-14.

Casini, A., G. Christodoulou, P.S. Freemont, G.S. Baldwin, T. Ellis and J.T. MacDonald. 2014. R2oDNA designer: Computational design of biologically neutral synthetic DNA sequences. *ACS Synthetic Biology* 3: 525-528.

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.

Christ, B., R. Hochstrasser, L. Guyer, R. Francisco, S. Aubry, S. Hörtensteiner and J.-K. Weng. 2017. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. *Nature Plants* 3: 937-945.

Clark, J.R., M. Robertson and C.C. Ainsworth. 1991. Nucleotide sequence of a wheat (*Triticum aestivum* L.) cDNA clone encoding the *waxy* protein. *Plant Molecular Biology: An International Journal on Molecular Biology, Molecular Genetics and Biochemistry* 16: 1099-1101.

Corradi, H.R., A.V. Corrigall, E. Boix, C.G. Mohan, E.D. Sturrock, P.N. Meissner and K.R. Acharya. 2006. Crystal structure of protoporphyrinogen oxidase from *Myxococcus xanthus* and its complex with the inhibitor Acifluorfen. *Journal of Biological Chemistry* 281: 38625-38633.

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.

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. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.

Dai, S., N. Georgelis, M. Bedair, Y.-J. Hong, Q. Qi, C.T. Larue, B. Sitoula, W. Huang, B. Krebel, M. Shepard, W. Su, K. Kretzmer, J. Dong, T. Slewinski, S. Berger, C. Ellis,

A. Jerga and M. Varagona. 2022. Ectopic expression of a rice triketone dioxygenase gene confers mesotrione tolerance in soybean. *Pest Management Science*.

Dayan, F. and S. Duke. 2010. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. Pages 1733-1751 in *Handbook of Pesticide Toxicology*. United States Department of Agriculture, University of Mississippi.

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.

DeRidder, B.P., M.E. Shybut, M.C. Dyle, K.A.G. Kremling and M.B. Shapiro. 2012. Changes at the 3'-untranslated region stabilize Rubisco activase transcript levels during heat stress in *Arabidopsis*. *Planta* 236: 463-476.

Duff, S.M.G., M. Zhang, F. Zinnel, T. Rydel, C.M. Taylor, D. Chen, G. Tilton, P. Mamanella, D. Duda, Y. Wang, B. Xiang, B. Karunanandaa, R. Varagona, J. Chittoor, Q. Qi, E. Hall, G. Garvey, J. Zeng, J. Zhang, X. Li, T. White, A. Jerga and J. Haas. 2024. Structural and functional characterization of triketone dioxygenase from *Oryza Sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1868: 130504.

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. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.

Finnegan, J. and D. Sherratt. 1982. Plasmid ColE1 conjugal mobility: The nature of *bom*, a region required in *cis* for transfer. *Molecular and General Genetics* 185: 344-351.

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 Research* 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.

Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Pages 521-535 in Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington, D.C.

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.

Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.

Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.

Hare, P.D. and N.-H. Chua. 2002. Excision of selectable marker genes from transgenic plants. *Nature Biotechnology* 20: 575-580.

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: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.

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

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

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.

Johansson, T.S.K. 1959. Tracking honey bees in cotton fields with fluorescent pigments. *Journal of Economic Entomology* 52: 572-577.

Kandylis, K., P.N. Nikokyris and K. Deligiannis. 1998. Performance of growing-fattening lambs fed whole cotton seed. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 78: 281-289.

Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium* L. 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.

Koch, M., C. Breithaupt, R. Kiefersauer, J. Freigang, R. Huber and A. Messerschmidt. 2004. Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: A key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *The EMBO Journal* 23: 1720-1728.

Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.

Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 9: 357-359.

Larue, C.T., J.E. Ream, X. Zhou, F. Moshiri, A. Howe, M. Goley, O.C. Sparks, S.T. Voss, E. Hall, C. Ellis, J. Weihe, Q. Qi, D. Ribeiro, X. Wei, S. Guo, A.G. Evdokimov, M.J. Varagona and J.K. Roberts. 2020. Microbial HemG-type protoporphyrinogen IX oxidase enzymes for biotechnology applications in plant herbicide tolerance traits. *Pest Management Science* 76: 1031-1038.

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.

Maeda, H., K. Murata, N. Sakuma, S. Takei, A. Yamazaki, M.R. Karim, M. Kawata, S. Hirose, M. Kawagishi-Kobayashi, Y. Taniguchi, S. Suzuki, K. Sekino, M. Ohshima, H. Kato, H. Yoshida and Y. Tozawa. 2019. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides. *Science* 365: 393-396.

McDowell, J.M., Y.Q. An, S. Huang, E.C. McKinney and R.B. Meagher. 1996. The arabidopsis *ACT7* actin gene is expressed in rapidly developing tissues and responds to several external stimuli. *Plant Physiology* 111: 699-712.

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

Meinzel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* 8: 626-649.

Mitchell, G., D.W. Bartlett, T.E.M. Fraser, T.R. Hawkes, D.C. Holt, J.K. Townson and R.A. Wichert. 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science* 57: 120-128.

Murai, J., T. Taira and D. Ohta. 1999. Isolation and characterization of the three *Waxy* genes encoding the granule-bound starch synthase in hexaploid wheat. 234: 71-79.

Myouga, F., R. Motohashi, T. Kuromori, N. Nagata and K. Shinozaki. 2006. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *The Plant Journal* 48: 249-260.

Norris, S.R., S.E. Meyer and J. Callis. 1993. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology* 21: 895-906.

O'Brian, M.R. 2009. Heme biosynthesis. Pages 194-209 in Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). Moselio Schaechter (ed.). Academic Press, Oxford.

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. 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.

OECD. 2006a. Pages 360-369 in Part 2 Consensus document on traits. Section 3 General Information Concerning the Genes and their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Safety Assessment of Transgenic Organisms, Volume 1: OECD Consensus Documents OECD Publishing, Paris.
<https://doi.org/10.1787/9789264095380-en>.

OECD. 2006b. Pages 370-377 in Part 2 Consensus document on traits. Section 4 Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin) - Tolerant Transgenic Plants. Safety Assessment of Transgenic Organisms, Volume 1: OECD Consensus Documents. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264095380-en>.

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.

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

Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup ReadyTM gene. Pages 53-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Patterson, D.E., R.D. Cramer, A.M. Ferguson, R.D. Clark and L.E. Weinberger. 1996. Neighborhood Behavior: A Useful Concept for Validation of “Molecular Diversity” Descriptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 39: 3049-3059.

Petrzik, K., V. Beneš, I. Mráz, J. Honetšlegrová-Fránová, W. Ansorge and J. Špak. 1998. Strawberry vein banding virus—Definitive member of the genus *Caulimovirus*. *Virus Genes* 16: 303-305.

Richards, J.S., J.N. Stanley and P.C. Gregg. 2005. Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: Implications for spread of transgenes and pollination ecology. *Ecological Entomology* 30: 327-333.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.

Rinehart, J.A., M.W. Petersen and M.E. John. 1996. Tissue-specific and developmental regulation of cotton gene *FbL2A*. Demonstration of promoter activity in transgenic plants. *Plant Physiology* 112: 1331-1341.

Robertson, B., C. Bednarz and C. Burmester. 2007. Growth and development – First 60 days. *Cotton Physiology Today: Newsletter of the Cotton Physiology Education Program*. Volume 13. National Cotton Council, Memphis, Tennessee.

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Rose, A.B. 2008. Intron-mediated regulation of gene expression. *Current Topics in Microbiology and Immunology*: 277-290.

Russell, S.H., J.L. Hoopes and J.T. Odell. 1992. Directed excision of a transgene from the plant genome. *Molecular and General Genetics* 234: 49-59.

Stevens, R., M. Grelon, D. Vezon, J. Oh, P. Meyer, C. Perennes, S. Domenichini and C. Bergounioux. 2004. A *CDC45* homolog in Arabidopsis is essential for meiosis, as shown by RNA interference-induced gene silencing. *The Plant Cell* 16: 99-113.

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

Tanaka, R. and A. Tanaka. 2007. Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants. Annual Review of Plant Biology 58: 321-346.

To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression elements derived from plant sequences provide effective gene expression regulation and new opportunities for plant biotechnology traits. Frontiers in Plant Science 12: e712179.

Twell, D., R. Wing, J. Yamaguchi and S. McCormick. 1989. Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. Molecular & General Genetics 217: 240-245.

USDA. 2024. Production, Supply and Distribution Online. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/home> [Accessed January 18, 2024].

Wang, C., J. Calcaterra, B. Anderson, T. Rydel, R. Wang, L. Bertho, S.A. Saracco, K. Hodge-Bell, L. Burzio, T. White and B. Li. 2024a. Risk assessment of homologous variants of biotech trait proteins using a bridging approach. GM Crops & Food 15: 336-351.

Wang, C., M. Zheng, C. Est, R. Lawal, W. Liang, D.A. Korasick, M.J. Rau, S.A. Saracco, V. Johnson, Y. Wang, T. White, W. Li, J. Zhang, X. Gu and F. Liu-Gontarek. 2024b. Production and characterization of homologous protoporphyrinogen IX oxidase (PPO) proteins: Evidence that small N-terminal amino acid changes do not impact protein function. PLOS ONE 19: e0311049.

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.

Wendel, J.F. and R.C. Cronn. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. Advances in Agronomy 78: 139-186.

Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.

Ye, X., Z. Vaghchhipawala, E.J. Williams, C. Fu, J. Liu, F. Lu, E.L. Hall, S.X. Guo, L. Frank and L.A. Gilbertson. 2023. Cre-mediated autoexcision of selectable marker genes in soybean, cotton, canola and maize transgenic plants. Plant Cell Reports 42: 45-55.

Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. Transgenic Res 20: 773-786.

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.

Zastrow-Hayes, G.M., H. Lin, A.L. Sigmund, J.L. Hoffman, C.M. Alarcon, K.R. Hayes, T.A. Richmond, J.A. Jeddeloh, G.D. May and M.K. Beatty. 2015. Southern-by-sequencing: A robust screening approach for molecular characterization of genetically modified crops. The Plant Genome 8: 1-15.

Zhang, W., S. Subbarao, P. Addae, A. Shen, C. Armstrong, V. Peschke and L. Gilbertson. 2003. Cre/*lox*-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. Theoretical and Applied Genetics 107: 1157-1168.

環境省. 2006. 除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*、*Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI:MON-88913-8) 申請書等の概要 .
https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=683&ref_no=1
[Accessed February 5, 2025]

環境省. 2013. 除草剤ジカンバ耐性ダイズ (改変 *dmo*, *Glycine max* (L.) Merr.)(MON87708, OECD UI : MON-87708-9) 申請書等の概要. https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1643&ref_no=1
[Accessed December 12, 2024]

環境省. 2015a. 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. https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1803&ref_no=1
[Accessed February 5, 2025]

環境省. 2015b. 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. https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1720&ref_no=1
[Accessed February 17, 2025]

環境省. 2022. チョウ目害虫抵抗性トウモロコシ (*cry1B.868*, 改変 *cry1Da*, *Zea mays* subsp. *mays* (L.) Ittis) (MON95379, OECD UI: MON-95379-3) 申請書等の概要. https://www.biodic.go.jp/bch/lmo/OpenDocDownload.do?info_id=1994&ref_no=1
[Accessed December 12, 2024]

後藤秀俊・黒川俊二・笠井美恵子・福田美雪・高橋靖幸・井上公一・中井秀一・山根精一郎・津田麻衣・大澤良. 2018. 遺伝子組換え作物の生物多様性影響の競合における優位性に関する考察. 育種学研究 20: 105-114

財務省. 2024. 財務省貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed January 18, 2024]

巽二郎. 2000. ワタ 石井 龍一 (編) 作物学 (Ⅱ) - 工芸・飼料作物 -. 文永堂出版 東京

農林水産省. 2017a. 「平成 26 年度及び平成 27 年度ワタの生育実態等調査」の結果について. <https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-59.pdf> [Accessed January 18, 2024]

農林水産省. 2017b. 「平成 28 年度ワタの生育実態等調査」の結果について.
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-115.pdf>

[Accessed January 18, 2024]

農林水産省. 2024. カルタヘナ法に基づき第一種使用規程を承認した遺伝子組換え農作物一覧（作物別、特性等別）.
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-76.pdf>

[Accessed January 21, 2025]

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

堀田満. 1989. 世界有用植物事典. 平凡社 東京

資料 3

緊急措置計画書

2025 年 5 月 26 日

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 大島 美紀
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ (改変 *cp4 epsps, pat*, 改変 *dmo, tdo, H_N90 PPO, Gossypium hirsutum* L.) (MON96012, OECD UI: MON-96012-6) (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、科学的に判断された場合、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。

2025 年 5 月現在

社内委員	
【個人情報につき非開示】*	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 部長 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 社外広報マネジャー
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T
【個人情報につき非開示】	バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラトリーアフェアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー

*：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、バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場実験従事者から得られた情報により把握する。

5

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

10 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

15

具体的措置として、本組換えワタを隔離ほ場内で鋤込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換えワタ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ワタ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。

20

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

25 弊社は信頼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込まれた場合、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。

除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポルフ
ィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ MON96012 の
隔離ほ場試験計画書

5

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

10 1. 名称

バイエルクロップサイエンス株式会社河内試験圃場

2. 住所

15

茨城県稲敷郡河内町生板字小川 4717 番地

3. 電話番号

20

0297-60-4011

4. 地図

図 9 (p74) 参照

25

II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

30

【個人情報につき非開示】 (バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラ
トリーアフエアーズ S&T)

2. 隔離ほ場管理責任者

35

【個人情報につき非開示】 (バイエルクロップサイエンス株式会社 レギュラ
トリーアフエアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー)

III. 試験期間

承認日から 2031 年 12 月 31 日まで

5 IV. 施設概要

部外者の立入を防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の氏名を明示するための標識、洗い場を設置している (図 10, p75)。

10 V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

約 6,292 m²

15

2. 試験に使用する面積

約 1,000 m²

20 3. 試験区の配置図

図 11 (p75) 参照

VI. 隔離ほ場の周辺環境

25

1. 地形

茨城県の最南端、常総平野に位置する (図 12, p76)。

30 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

- 5 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

- 10 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 6 (p69) に示した。

表 6 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

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	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020	1991～2020
資料年数	30	30	30	30	30	30
1 月	55.4	3.3	9.4	-2.3	2.4	190.8
2 月	52.9	4.3	10.2	-1.2	2.7	172.3
3 月	103.3	7.8	13.5	2.3	3.0	174.3
4 月	109.0	13	18.6	7.5	3.4	178.4
5 月	122.6	17.8	22.9	13.5	3.2	179.9
6 月	135.1	21.0	25.4	17.5	2.8	125.7
7 月	128.1	24.6	29.4	21.2	2.7	155.7
8 月	99.4	25.8	30.9	22.2	2.6	183.5
9 月	182.8	22.5	27.2	18.8	2.7	133.9
10 月	212.8	16.9	21.8	12.6	2.4	134.0
11 月	87.5	10.9	16.7	5.6	2.0	148.4
12 月	53.4	5.5	11.7	0.0	2.1	169.1
年	1352.8	14.5	19.8	9.8	2.7	1927.9

気 象 庁 ホ ー ム ペ ー ジ 、 過 去 の 気 象 デ ー タ 検 索 、
 15 http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&block_no=1014&year=&month=&day=&view、アクセス日: 2024 年 11 月 12 日。

5. 台風の襲来暦

① 平年値

- 5 隔離ほ場のある関東甲信地方への台風接近数¹⁶の平年値(1991年~2020年の30年平均)は、3.3個である(気象庁ホームページ、台風の平年値、<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>、アクセス日:2024年11月12日)。

10 ② 過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数

- 15 関東甲信地方に台風が接近し¹⁶、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15 m/sを超えた個数¹⁷を隔離ほ場周辺への台風の接近個数とした。過去10年の隔離ほ場周辺への台風の接近個数は、合計5個(2016年8月、2017年10月、2018年10月、2019年9月、2019年10月)¹⁸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。
- 20 ・補助支柱などの資材は常に準備しておき、気象状況により取り付ける。

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。

¹⁶ 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等から300 km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(気象庁ホームページ、関東地方および甲信地方への接近数、http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html、アクセス日:2024年11月12日)。

¹⁷ 台風の強風域の定義が平均風速15 m/sであることによる(気象庁ホームページ、気圧配置 台風に関する用語、http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html、アクセス日:2024年11月12日)。

¹⁸ 過去の気象データ検索(気象庁ホームページ、<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>、アクセス日:2024年11月12日)から、地点として龍ヶ崎を、さらに関東甲信越地方に台風が接近した年月を選択し、該当年月における日ごとの最大風速が15 m/sを超えた日の有無を確認した。該当年月において、日ごとの最大風速が15 m/sを超える日が認められた場合、隔離ほ場周辺に台風が接近したと判断した。

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

過去にほ場が冠水したことはない。

5

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。

10 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)

河内町の洪水ハザードマップによると、現時点の河道 (利根川・小貝川・霞ヶ浦) 及び洪水調節施設の整備状況 (利根川・小貝川) を勘案して、想定最大規模降雨に伴う洪水により氾濫した場合の隔離ほ場の浸水の状況は、水深 0.5 m 以上~3.0 m 未満となると想定されている (茨城県河内町ホームページ、洪水ハザードマップ、<http://www.town.ibaraki-kawachi.lg.jp/page/page000262.html>、アクセス日: 2024 年 11 月 12 日)。

15

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

20

鳥獣害の被害報告はない。

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

25 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。

30 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

我が国には交雑可能な近縁野生種は存在しない。

VIII. 栽培管理等

1. 栽培履歴

5 隔離ほ場における栽培履歴は図 13 (p77) に示したとおりである。

2. 気象災害時の対応

10 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)

15 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、除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ MON96012 (以下「本組換えワタ」という。) 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。

20 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)~(4) の設備を備えている。

- (1) 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- 25 (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
- 30 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、播種時には防鳥網等を用いた鳥害防止策を講じる。

5. 作業要領

- 35 (1) 本組換えワタ及び比較対象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。

- 5
- (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。
- (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象のワタを隔離ほ場内に鋤込む等により、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。
- 10 (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) までに掲げる事項について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。
- 15

以上

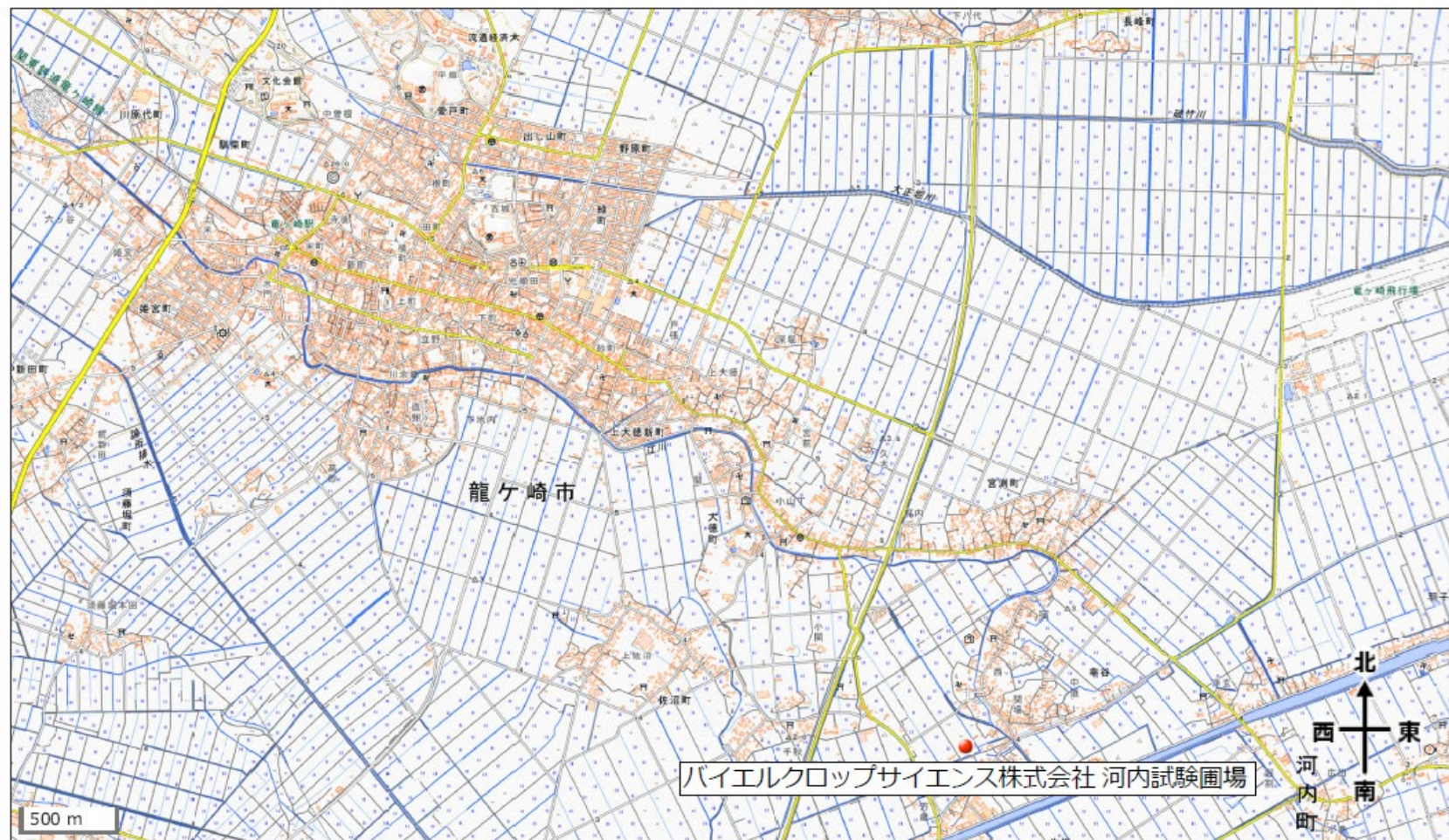


図9 バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場の位置



図 10 隔離ほ場の設備*

(左) 立入禁止であることを明示するための標識、(右) 洗い場

5

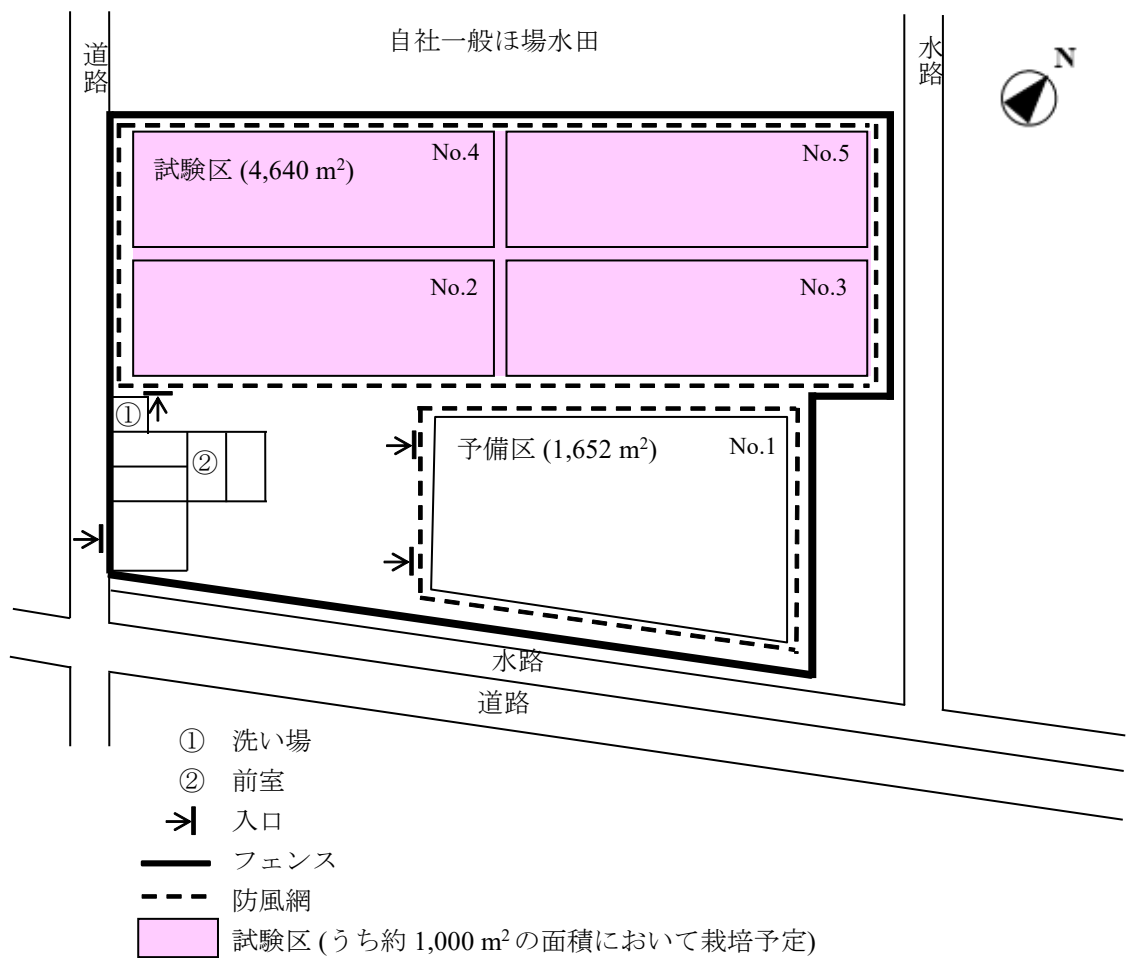


図 11 試験区の配置図*

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

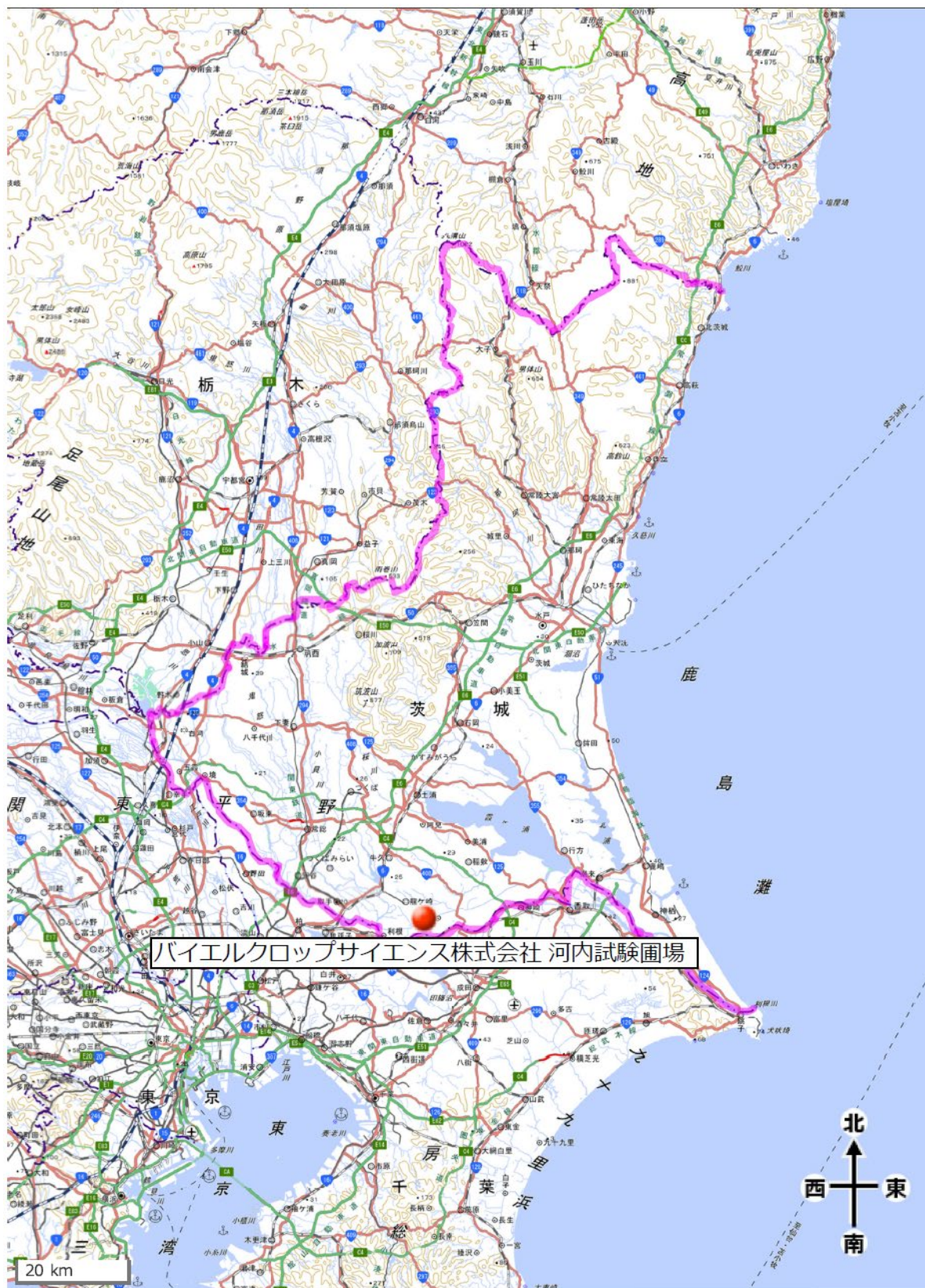


図 12 隔離ほ場の位置 (広域図)

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2022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			→								←	
No.2	非遺伝子組換え ライムギ											←	
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	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 トウモロコシ						←						
	遺伝子組換え トウモロコシ						←						

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2023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			→								←	
No.2	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え トウモロコシ					←							
	遺伝子組換え トウモロコシ					←							
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え ライムギ			→									
	非遺伝子組換え テンサイ					←							
	遺伝子組換え テンサイ					←							
No.5	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	

ほ場 No.	作物	栽培期間 (2024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			→								←	
No.2	非遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	遺伝子組換え トウモロコシ	→											
	非遺伝子組換え ダイズ						←						
	遺伝子組換え ダイズ						←						
No.3	非遺伝子組換え ライムギ			→								←	
No.4	非遺伝子組換え テンサイ				→								
	遺伝子組換え テンサイ				→								
	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 ダイズ						←						
	遺伝子組換え ダイズ						←						

図 13 隔離ほ場における栽培履歴*

*本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はパイエルクロップサイエンス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】

除草剤グリホサート、グルホシネート、ジカンバ、トリケトン系及びプロトポ
ルフィリノーゲン酸化酵素阻害型耐性ワタ (改変 *cp4 epsps*, *pat*, 改変 *dmo*, *tdo*,
H_N90 PPO, *Gossypium hirsutum* L.) (MON96012, OECD UI: MON-96012-6) の
別添資料リスト

- 5
- 別添資料 1 本組換えワタで発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質、改
変 DMO 蛋白質、TDO 蛋白質及び PPO 蛋白質の推定アミノ酸配列
(社外秘)
- 10 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-GHHT529207 (社外秘)
- 別添資料 3 PCR Analysis to Confirm the Absence of *Agrobacterium tumefaciens* Used
to Produce MON 96012 (M-861674-01-1) (社外秘)
- 15 別添資料 4 Updated Bioinformatics Evaluation of the MON 96012 Insertion Site
Utilizing the GHI_2024 Database (M-859138-01-1) (社外秘)
- 別添資料 5 Molecular Characterization of Herbicide-Tolerant Cotton MON 96012
(M-861658-01-1) (社外秘)
- 20 別添資料 6 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, PAT, DMO, TDO and PPO
Proteins in Cotton Seed Samples Across Multiple Generations of
MON 96012 (M-858621-01-1) (社外秘)
- 25 別添資料 7 Assessment of CP4 EPSPS, PAT (*pat*), DMO, TDO, and PPO Protein
Levels in Cotton Leaf Tissue Collected from MON 96012 Produced in
United States Field Trials During 2023 (M-859938-01-1) (社外秘)
- 30 別添資料 8 Summary of Method for Detecting the Presence of the Cotton MON 96012
Event in Genomic DNA Extracted from Leaf Tissue (M-864930-01-1) (社
外秘)