

チョウ目害虫抵抗性及びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ (改変 *cry1F*, 改変 *cry1Ac*, 改変 *vip3A*, *pat*, 改変 *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006×COT102×MON88913, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5×SYN-IR102-7×MON-88913-8) 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	3
(3) 生理的及び生態学的特性	4
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	6
(1) 供与核酸に関する情報	7
(2) ベクターに関する情報	16
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の 安定性	21
(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	22
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	22
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	24
(1) 使用等の内容	24
(2) 使用等の方法	24
(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	24
(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	24
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類 似の環境での使用等の結果	25
(6) 国外における使用等に関する情報	25
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	26
1 競合における優位性	26
2 有害物質の産生性	27
3 交雑性	27
4 その他	27

第三 生物多様性影響の総合的評価.....	28
参考文献.....	29
緊急措置計画書.....	35
資料 1.....	38
資料 2.....	40
資料 3.....	42

第一種使用規程承認申請書

平成25年1月24日

5

農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

10

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

15

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

20

遺伝子組換え生物等の種類の名称	チョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ（改変 <i>cry1F</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , 改変 <i>vip3A</i> , <i>pat</i> , 改変 <i>cp4 epsps</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.） (281×3006×COT102× MON88913, OECD UI : DAS-24236-5×DAS-21023-5× SYN-IR102-7× MON-88913-8)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

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：ワタ

英名：cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

15 ② 宿主の品種名又は系統名

親系統の宿主はアオイ科 (*Malvaceae*) ワタ属 (*Gossypium*) に属する四倍体栽培ワタ (*G. hirsutum* L.) である。親系統の作出に使った品種名は以下のとおりである。

20

ワタ 281 は品種 GC510 を用いた。

ワタ 3006 は品種 GC510 を用いた。

COT102 は品種 Coker312 を用いた。

MON88913 は品種 Coker312 を用いた。

25

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

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。

30

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 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*

35

及び *G. herbaceum* は旧大陸(アフリカ・アジア)において、一方、四倍体種のワタ及び *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)。

5 (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

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)には関東以南を中心に約10万haに栽培されていた。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年頃のワタの栽培化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)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2010年の世界における綿実の生産量は約4,239万トンであり、最大生産国は中国(約1,194万トン)、ついでインド(約1,157万トン)、米国(約553万トン)、パキスタン(約370万トン)の順である(FAOSTAT, 2012)。

栽培方法については、畝立てを行い、深さ10cmにおける地温が14℃以上、3日間以上続く時期に十分な土壤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)。

2011年の我が国における搾油用綿実の輸入量は、約11万トンであり、主な輸入先はオーストラリア(約8万トン)及び米国(約3万トン)である。また、2011年の綿実油かすの輸入量は約3,515トンであり、主な輸入先は中国(約2,150トン)、インド(約919トン)、米国(約446トン)である(財務省, 2012)。

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) 生理的及び生態学的特性

イ 基本的特性

5 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)。

10 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
15 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500mm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)。

20

ハ 捕食性又は寄生性

25 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

 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
30 ~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ヵ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、通常次のシーズンまで生存しない(Jenkins, 2003)。

35

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

 ワタは種子繁殖であり、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖はしない。また、
40 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。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生じる特性を有する場合はその程度

ワタ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
5 (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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 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20m以上風で移動することはほとんどないこ
15 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、0.3mで7.65%か
ら9mで0.67%に低下し、30m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、0.3mで4.86%から1mで0.30%にまで低下した
(Van Deynze *et al.*, 2005)。

20 実験室での飽和湿度条件下における花粉の発芽率は、8時間後で90%、16時
間後で31%、32時間後で7.5%に低下した。また、蛾(*Helicoverpa armigera*)
の口吻に付着した花粉の寿命は8時間後に19%であり、短いものであった
(OECD, 2008)。

25 ホ 病原性

へ 有害物質の産生性

30

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
35 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
て毒性を示し、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
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。また、遊離型ゴッシポールは、綿実油の加工中に除去されるため、
40 綿実油中にはほとんど含まれない(OECD, 2008)。

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、精製油の脱臭工程中に大幅に減少する(OECD, 2004)。

- 5 ワタの種子中には、これらの有害物質が含まれているが、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

10 ————

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

15 チョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ(改変 *cry1F*, 改変 *cry1Ac*, 改変 *vip3A*, *pat*, 改変 *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006×COT102×MON88913, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5×SYN-IR102-7×MON-88913-8) (以下「本スタック系統ワタ」という。)は、以下の3つの遺伝子組換えワタを従来の交雑育種法を用いて交配させた交配後代品種である。なお、本スタック系統ワタは、標的となるチョウ目害虫における受容体が異なる Bt 蛋白質(Lee *et al.*, 2003)を発現する2系統のチョウ目害虫抵抗性ワタ(ワタ 281/3006 及び COT102)を掛け合わせることにより、抵抗性害虫の発生予防としての利用が考えられる。また、本スタック系統ワタはホモ系統として使用されるため、分離した後代系統が使用されることはない。

25

- チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ(改変 *cry1F*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281, OECD UI: DAS-24236-5) (以下「ワタ 281」という。)とチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ(改変 *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (3006, OECD UI: DAS-21023-5) (以下「ワタ 3006」という。)を従来の交雑育種法を用いて交配させたチョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ(改変 *cry1F*, 改変 *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI: DAS-24236-5×DAS-21023-5) (以下「ワタ 281/3006」という。) ¹
- チョウ目害虫抵抗性ワタ(改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.) (COT102, OECD UI: SYN-IR102-7) (以下「COT102」という。)
- 除草剤グリホサート耐性ワタ(改変 *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI: MON-88913-8) (以下「MON88913」という。)

35

¹ ワタ 281 及びワタ 3006 は使用せず、スタック系統のワタ 281/3006 のみ使用されている。ワタ 281/3006 はホモ系統として使用されるため、分離した後代系統が使用されることはない。よって、ワタ 281/3006 の隔離ほ場試験を行い、2006 年 4 月に第一種使用規程の承認を得た。

以下ではワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 の調製等に関する情報について概要等を記載した。

5 (1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来は、表 1～表 4 (p. 7～11) に示したとおりである。

表 1 ワタ 281 の作出に用いた pAGM281 の各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
改変 <i>cry1F</i> カセット		
(4ocs)DeltaMas 2'	610	pTiAch5 (Ellis <i>et al.</i> , 1987) (GenBank Accession Numbers I05704 to I05712) 由来のオクトピン合成酵素 (OCS) のエンハンサー 4 コピーを含む pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491) 由来のマンノピン合成酵素のプロモーターであり、ワタの葉における発現量が多い特徴を持つ。
改変 <i>cry1F</i>	3447	<i>B.t.</i> var. <i>aizawai</i> 由来の <i>cry1F</i> 遺伝子をもとに合成した。タバコバッドワーム (<i>Heliothis virescens</i>)、ビートアーミーワーム (<i>Spodoptera exigua</i>)、コットンボールワーム (<i>Helicoverpa zea</i>) 等のワタの主要害虫に対して殺虫活性を示す改変 Cry1F 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	720	<i>R.radiobacter</i> (<i>A.tumefaciens</i>) pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491) 由来の双方向ターミネーター
<i>pat</i> カセット		
UbiZm1 (intron)	1990	第 1 エクソン (翻訳されないエンハンサー) 及び第 1 インtron を加えたトウモロコシ <i>Zea mays</i> のユビキチン 1 プロモーターであり、ワタの綿実さやでの発現量が多い特徴を持つ。(Christensen <i>et al.</i> , 1992) (米国特許第 5614199 号、GenBank Accession I18571)
<i>pat</i>	552	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のフォスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子 (Eckes <i>et al.</i> , 1989)。選抜マーカーとして使用した PAT 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	720	<i>R.radiobacter</i> (<i>A.tumefaciens</i>) pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491) 由来の双方向ターミネーター

(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)

表 2 ワタ 3006 の作出に用いた pMYC3006 の各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
改変 <i>cry1Ac</i> カセット		
Ubi Zm1(intron)	1990	第1エクソン及び第1イントロンを加えたトウモロコシ <i>Zea mays</i> のユビキチン 1 プロモーターであり、ワタの綿実さやでの発現量が多い特徴を持つ。(Christensen <i>et al.</i> , 1992) (米国特許第 5614199 号、GenBank Accession I18571)
改変 <i>cry1Ac</i>	3471	<i>B.t. var. kurstaki</i> 由来の <i>cry1Ac</i> 遺伝子をもとに合成した。タバコバッドワーム (<i>Heliothis virescens</i>)、ビートアーミーワーム (<i>Spodoptera exigua</i>)、コットンボールワーム (<i>Helicoverpa zea</i>)、ピンクボールワーム (<i>Pectinophora gossypiella</i>) 等のワタの主要害虫に対して殺虫活性を示す改変 <i>Cry1Ac</i> 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	720	<i>R.radiobacter (A.tumefaciens)</i> pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491)由来の双方向ターミネーター
<i>pat</i> カセット		
(4ocs)DeltaMas 2'	610	pTiAch5 (Ellis <i>et al.</i> , 1987) (GenBank Accession Numbers I05704 to I05712) 由来のオクトピン合成酵素 (OCS) のエンハンサー 4 コピーを含む pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491) 由来のマンノピン合成酵素のプロモーターであり、ワタの葉における発現量が多い特徴を持つ。
<i>pat</i>	552	<i>S. viridochromogenes</i> 由来のフォスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子 (Eckes <i>et al.</i> , 1989)。選抜マーカーとして使用した PAT 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	720	<i>R.radiobacter (A.tumefaciens)</i> pTi15955 (Barker <i>et al.</i> , 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491)由来の双方向ターミネーター

(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)

表 3 COT102 の作出に用いた pCOT1 の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
害虫抵抗性遺伝子カセット		
Act2 プロモーター	1,408	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のアクチン遺伝子 (<i>actin-2</i> 遺伝子) の第1エクソン及びイントロンを含むプロモーター領域 (An <i>et al.</i> , 1996)。目的遺伝子 (改変 <i>vip3A</i> 遺伝子) を恒常的に発現させる。
改変 <i>vip3A</i> 遺伝子	2,370	一般に土壌に生息するグラム陽性細菌である <i>Bacillus thuringiensis</i> strain AB88由来の <i>vip3A</i> 遺伝子 (Estruch <i>et al.</i> , 1996) を、植物における発現に適したコドン (Murray <i>et al.</i> , 1989) に改変した遺伝子。チョウ目昆虫に殺虫活性を示す改変Vip3A蛋白質をコードする。改変Vip3A蛋白質では、そのアミノ酸配列の284番目のアミノ酸がリシンからグルタミンに置換されている。
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNAの転写を終結させる (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
形質転換体選抜マーカー遺伝子カセット		
Ubg3 プロモーター	1,721	<i>A. thaliana</i> 由来のポリユビキチン遺伝子 (<i>ubi3</i>) の第1イントロンを含むプロモーター領域 (Norris <i>et al.</i> , 1993)。目的遺伝子 (<i>aph4</i>) を恒常的に発現させる。
<i>aph4</i> 遺伝子	1,026	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来のリン酸基転移酵素 (ハイグロマイシンBリン酸基転移酵素) 遺伝子。ハイグロマイシンといくつかの類縁アミノグリコシドをリン酸化することから (Waldron, 1997)、ハイグロマイシン耐性を付与する。本組換え体作出の際の形質転換細胞の選抜マーカー。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。ポリアデニル化により、mRNAの転写を終結させる。
その他の領域 (=外骨格領域)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリンTi-プラスミドのT-DNAレフトボーダー領域 (Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
<i>spec</i>	789	<i>E. coli</i> 由来のトランスポゾンTn7のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 (<i>aadA</i>) (Fling <i>et al.</i> , 1985)。ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与するため、ベクターの選抜マーカーとして用いた。
<i>repA</i>	1,074	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミドpVS1由来のレプリコン (DNAの複製を制御する最小機能複製単位) 領域。 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子 (Heeb <i>et al.</i> , 2000)。
VS1 ori	405	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミドpVS1の複製起点共通配列。 <i>A. tumefaciens</i> における複製起点となる (Itoh <i>et al.</i> , 1984)。
ColE1 ori	807	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点 (Itoh and Tomizawa, 1978)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリンTi-プラスミドのT-DNAライトボーダー領域 (Wang <i>et al.</i> , 1984)。

(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)

表 4 MON88913 の作出に用いた PV-GHGT35 の各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
P-FMV/TSF1により制御される改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット		
P-FMV/TSF1	1,040	シロイヌナズナ TSF1 プロモーターに Figwort Mosaic Virus(FMV) 35S プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター(Axelos <i>et al.</i> , 1989; Richins <i>et al.</i> , 1987)。目的遺伝子の生殖器官及び栄養器官での恒常的発現に参与する。尚、FMV が属する <i>Caulimovirus</i> 属のウイルスが <i>Gossypium</i> 属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた(日本モンサント株式会社, 2005)。
L-TSF1	46	翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードするシロイヌナズナ TSF1 遺伝子のリーダー配列(exon 1) (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
I-TSF1	622	翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードするシロイヌナズナ TSF1 遺伝子のイントロン配列(Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	228	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4 EPSPS 蛋白質を輸送するシロイヌナズナ EPSPS 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列(Klee <i>et al.</i> , 1987; Herrmann, 1995)。
CR-改変 <i>cp4 epsps</i>	1,368	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(Padgett <i>et al.</i> , 1996a; Barry <i>et al.</i> , 2001)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関しては N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。
T-E9	643	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域(Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
P-35S/ACT8により制御される改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット		
P-35S/ACT8	1,175	シロイヌナズナ ACT8 プロモーターにカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35S プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター(An <i>et al.</i> , 1996; Kay <i>et al.</i> , 1987)。目的遺伝子の栄養器官での恒常的発現に参与する。尚、CaMV が属する <i>Caulimovirus</i> 属のウイルスが <i>Gossypium</i> 属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた(日本モンサント株式会社, 2005)。
L-ACT8	141	シロイヌナズナの ACT8 遺伝子のリーダー配列。目的遺伝子の発現を高める(An <i>et al.</i> , 1996)。
I-ACT8	472	シロイヌナズナの ACT8 遺伝子のイントロンと、その近傍のエクソン配列(An <i>et al.</i> , 1996)。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	228	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4 EPSPS 蛋白質を輸送するシロイヌナズナ EPSPS 由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列(Klee <i>et al.</i> , 1987; Herrmann, 1995)。
CR-改変 <i>cp4 epsps</i>	1,368	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子(Padgett <i>et al.</i> , 1996a; Barry <i>et al.</i> , 2001)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関しては N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。
T-E9	643	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。

注) *Tsfl* は、近年 *EF-1α* として広く知られている。

(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)

表 4 MON88913 の作出に用いた PV-GHGT35 の各構成要素の由来及び機能
(続き)

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
T-DNA の外骨格構成		
B-Left Border (左側境界配列)	442	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する左側境界配列を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
OR-ORI V	638	広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker <i>et al.</i> , 1981)。
CR-rop	473	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマータンパク質を抑制するコーディング配列 (Giza and Huang, 1989)。
OR-ORI-PBR322	629	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
CR- <i>aad</i>	789	大腸菌のトランスポゾン Tn7 に由来するアミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ (AAD) をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する (Fling <i>et al.</i> , 1985)。
B-Right Border (右側境界配列)	331	<i>A. tumefaciens</i> に由来する、ノパリン型 T-DNA の右側境界配列を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>A. tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。

(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)

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

5

ワタ281、ワタ3006、COT102及びMON88913のそれぞれの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、それぞれ表1～表4(p.7～11)に示したとおりである。

- 10 ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

a. 目的遺伝子の発現により産生される蛋白質の機能

15

—害虫抵抗性蛋白質—

20 土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* が産生する結晶性の蛋白質(Cry蛋白質)であるプロトキシンは、感受性昆虫に摂食されると腸管内のプロテアーゼにより消化され、殺虫活性のある毒素となる。この活性毒素(コア蛋白質)は、中腸上皮にある特異的な受容体と結合し、不可逆的に細胞膜に侵入する。さらに、いくつかの受容体と毒素の複合体による凝集体が形成され、これらが中腸細胞膜に細孔構造をつくることによって、細胞の破壊が誘導され昆虫を死に至らしめる(OECD, 2007)。

25

<チョウ目害虫抵抗性蛋白質>

【改変 Cry1F 蛋白質】

30 ワタ281/3006で発現する改変Cry1F蛋白質は、ワタを加害するチョウ目害虫であるタバコバッドワーム (*Heliothis virescens*)、ビートアーミーワーム (*Spodoptera exigua*)、コットンボールワーム (*Helicoverpa zea*)、ソイビー
35 ンルーパー (*Psuedoplusia includens*)の幼虫に高い殺虫活性を示す(社内報告書1)。また、非標的生物であるオオミジンコ、ニッポンクサカゲロウ、テントウムシ、ミツバチ、キョウソヤドリコバチ、ミミズ、ニジマスに対する安全性は確認されている(OECD, 2007)。

40

【改変 Cry1Ac 蛋白質】

ワタ 281/3006 で発現する改変 Cry1Ac 蛋白質はタバコバッドワーム、ビート
アーミーワーム、コットンボールワーム、ソイビーンルーパー、ピンクボール
5 ワーム (*Pectinophora gossypiella*) の幼虫に高い殺虫活性を示す(社内報告書
1)。また、非標的生物であるオオミジンコ、ニッポンクサカゲロウ、テントウ
ムシ、ミツバチ、キョウソヤドリコバチ、ミミズ、ニジマスに対する安全性が
確認されている(OECD, 2007)。

10 【改変 Vip3A 蛋白質】

Vip3A 蛋白質は、チョウ目害虫であるコットンボールワーム(社内報告書 2)、
タバコバッドワーム(社内報告書 2; 社内報告書 3)等に殺虫活性を示すことが確
認されている。チョウ目昆虫以外のコウチュウ目、ハチ目、アミメカゲロウ目
15 及びトビムシ目等の昆虫、並びに哺乳類、鳥類、魚類等の非標的生物に対する
毒性は認められていない(社内報告書 2)。

なお、COT102 で発現する改変 Vip3A 蛋白質は、アミノ酸配列の 284 番目の
リシンがグルタミンに置換されている。

20

—除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質—

【PAT 蛋白質】

25 ワタ 281/3006 で発現する PAT 蛋白質 (ホスフィノスリシンアセチルトラン
スフェラーゼ) は、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。除草剤グ
ルホシネートは、グルタミン酸とアンモニアからグルタミンを合成するグルタ
ミン合成酵素を阻害し、その結果、植物体内にアンモニアが蓄積して植物を枯
死させる。PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセ
30 チルグルホシネートに変えることで、植物体にグルホシネートに対する耐性を
付与する。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

35 MON88913 で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、除草剤グリホサートに耐
性を持つ。植物はグリホサートを処理すると 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リ
ン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下「EPSPS 蛋白質」という。) が阻
害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり、
枯れてしまう。改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害
40 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

が正常に機能して生育することができる。

なお、MON88913には、それぞれ異なるプロモーターによって制御された2つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが導入されている。また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、野生型 CP4 EPSPS 蛋白質の機能活性を変更せずに植物中での発現量を高めるために野生型 *cp4 epsps* 遺伝子の塩基配列に改変を加えたものであり、改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列に関しては N 末端から二番目のセリンがロイシンに改変されているのみである。

【APH4 蛋白質】

10

COT102 で発現する APH4 蛋白質（ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素）は、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を付与する。APH4 蛋白質は基質特異性が高く、アミノグリコシド系抗生物質のハイグロマイシン B、ハイグロマイシン B2、さらに構造が類似したデストマイシン A、デストマイシン B をリン酸化することが知られているが、他のアミノシクリトール系やアミノグリコシド系の抗生物質（ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン、アミカシン等）はリン酸化しない (Rao *et al.*, 1983; EPA, 2003)。APH4 蛋白質はハイグロマイシンをリン酸化して無毒化するため、この蛋白質を有する細胞はハイグロマイシン耐性を示すことから (Rao *et al.*, 1983)、遺伝子が導入された細胞を選抜するマーカーとして利用した。

b. 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の相同性

25 改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、改変 Vip3A 蛋白質、PAT 蛋白質、APH4 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかを以下のデータベースを用いて比較したところ、既知アレルゲンと類似の配列は共有していなかった。

30 FARRP Allergen Database version 12 (2012) : 改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、PAT 蛋白質

FARRP Protein AllergenOnline Database version 12 (2012) : 改変 Vip3A 蛋白質、APH4 蛋白質

AD_2012 (2012) : 改変 CP4 EPSPS 蛋白質

35 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質は、いずれも Bt 蛋白質である。これらの Bt 蛋白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており (OECD, 2007)、これまでのところ Bt 蛋白質

が他の機能を有するとの報告はない。よって、これらの Bt 蛋白質が酵素活性を持つとは考えられず、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの有効成分である L 型ホスフィノスリン (L 型アミノ酸に分類) をアセチル化するが、他の L 型アミノ酸をアセチル化することはなく、特に構造の類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどない (Thompson *et al.*, 1987)。また、各種アミノ酸が過剰に存在する条件下においても PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転移反応は阻害されることがないことから、グルホシネートに対して極めて高い基質特異性を有することが報告されている (OECD, 1999)。よって、その基質特異性の高さから、PAT 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

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蛋白質であるが、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 (Padgett *et al.*, 1996b; Ridley *et al.*, 2002)。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 (以下「PEP」という。) 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)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こり易さを示す特異性定数 (Specificity constant) 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。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

APH4 蛋白質は、ハイグロマイシン B と一部の類縁アミノグリコシド系抗生物質をリン酸化する酵素である。極めて基質特異性が高く、アミノグリコシド系抗生物質のハイグロマイシン B、ハイグロマイシン B2、さらに構造が類似したデストマイシン A、デストマイシン B をリン酸化することが知られているが、他のアミノシクリトール系やアミノグリコシド系の抗生物質 (ネオマイシン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン、アミカシン等) はリン酸化しない (Rao *et al.*, 1983; EPA, 2003)。よって、その基質特異性の高さから、APH4 蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

- 5 親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターは以下のとおりである。
ワタ 281 : 広域宿主プラスミド RK2 をもとに構築された pAGM281
ワタ 3006 : 広域宿主プラスミド RK2 をもとに構築された pMYC3006
COT102 : *E.coli* 由来の pBluescript II SK(+) をもとに構築された pCOT1
MON88913 : *E. coli* 由来のベクター pBR322 等をもとに構築された
10 PV-GHGT35

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

- 15 親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターの塩基数は以下のとおりである。
ワタ 281 : pAGM281; 14,950 bp
ワタ 3006 : pMYC3006; 15,337bp
20 COT102 : pCOT1; 11,801bp
MON88913 : PV-GHGT35; 13,741bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

- 25 選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。
これらの抗生物質耐性遺伝子のうち、COT102 の *aph4* 遺伝子のみが宿主に導入
されている。
ワタ 281 : エリスロマイシン耐性を付与する *ery^R* 遺伝子
ワタ 3006 : エリスロマイシン耐性を付与する *ery^R* 遺伝子
30 COT102 : ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与する *spec*
遺伝子及びハイグロマイシン耐性を付与する *aph4* 遺伝子
MON88913 : スペクチノマイシン又はストレプトマイシン耐性を付与する
aadA 遺伝子

- 35 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

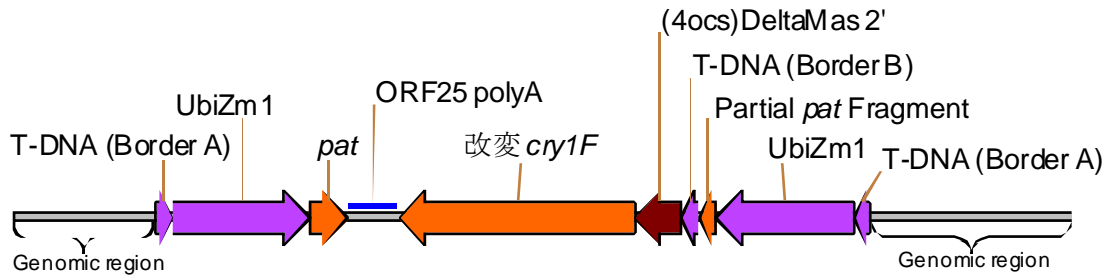
pAGM281、pMYC3006、pCOT1 及び PV-GHGT35 の感染性はいずれも知られていない。

40

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

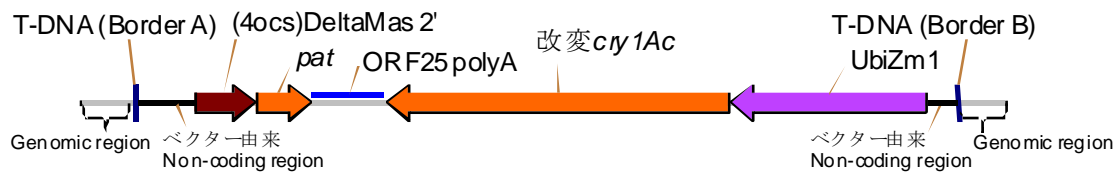
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

- 5 ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 のそれぞれに移入された核酸全体の構成図をそれぞれ図 1～図 4 (p.17～18) に示した。



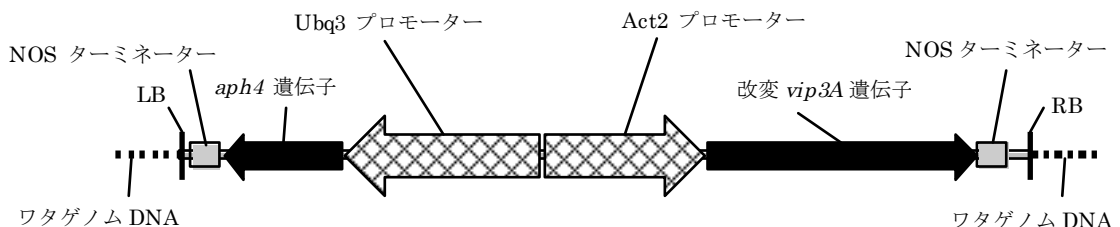
10 図 1 ワタ 281 に移入された核酸全体の構成図

(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)



15 図 2 ワタ 3006 に移入された核酸全体の構成図

(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)



20 図 3 COT102 に移入された核酸全体の構成図

(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)

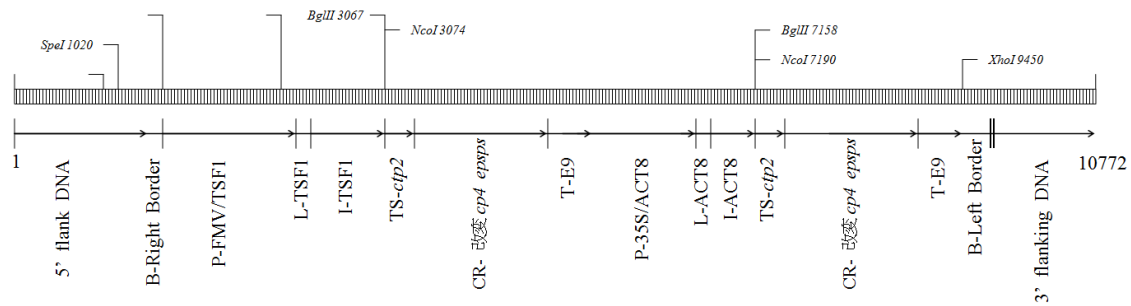


図 4 MON88913 に移入された核酸全体の構成図

注) *Tsfl* は、近年 *EF-1α* として広く知られている。

(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)

5

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10 宿主内への核酸の移入については、ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 のいずれの場合もアグロバクテリウム法を用いて行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

15

形質転換細胞の選抜は、以下を添加した培地を用いて行った。

ワタ 281：グルホシネート

ワタ 3006：グルホシネート

COT102：ハイグロマイシン

20

MON88913：グリホサート

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

25 ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 にアグロバクテリウム菌体が残存していないことは、それぞれの親系統の評価において確認されている。

すなわち、ワタ 281 及びワタ 3006 においては、カルスを誘導する段階で、抗生物質カルベニシリンを添加することにより残存アグロバクテリウムを除菌し、菌が増殖しないことの確認により菌体が残存していないことを確認している。また、COT102 につ
30 いては、形質転換細胞の選抜培養培地に抗生物質セフトキシムを添加することにより形質転換に用いたアグロバクテリウムを除菌し、その後、セフトキシムを含まない培地で培養し、菌が増殖しないことの確認により菌体の残存のないことを確認している。一方、MON88913 については、形質転換細胞の選抜培養培

地に抗生物質カルベニシリン及びセフトキシムを添加することにより形質転換に用いたアグロバクテリウムを除菌し、その後、カルベニシリン及びセフトキシムを含まない培地で培養し、菌が増殖しないことの確認により菌体の残存のないことを確認している。

5

- 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

10 本スタック系統ワタは、ワタ 281/3006、COT102 及びMON88913 を交雑育種法により掛け合わせて育成したスタック系統である。図 5 (p. 20) に本スタック系統ワタの育成例を示す。なお、以下にワタ 281/3006、COT102、MON88913 及び本スタック系統ワタの我が国における申請・認可状況を記載した (表 5、p. 19)。

15

表 5 ワタ 281/3006、COT102、MON88913 及び本スタック系統ワタの我が国における申請・認可状況 (2013 年 1 月現在)

	食品 ¹⁾	飼料 ²⁾	環境 ³⁾
ワタ 281/3006	2005年10月 安全性確認	2006年3月 安全性確認	2006年4月 第一種使用規程承認
COT102	2012年7月 安全性確認	2012年7月 安全性確認	2012年9月 第一種使用規程承認
MON88913	2005年4月 安全性確認	2006年2月 安全性確認	2006年2月 第一種使用規程承認
本スタック系統 ワタ	2013 年 申請予定	2013 年 届出予定	2013 年 1 月 申請

1) 食品衛生法

2) 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律

20 3) 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

5
10
15
20
25

社外秘情報につき非開示

図 5 本スタック系統ワタの育成図

(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 ワタ 281、ワタ 3006、COT102(社内報告書 4)及び MON88913 の導入遺伝子は染色体上に存在することが確認されている。

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

10

 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、ワタ 281/3006 (Green *et al.*, 2002; Green *et al.*, 2005)、COT102(社内報告書 5)及び MON88913 (Burns, 2004)のワタ染色体上の 1 ヶ所にそれぞれの目的遺伝子が 1 コピー存在することが親系統の評価で確認されている。また、親系統の評価において、導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示されている。

15

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

20

 ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 は全て 1 コピーなので該当しない。

④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

25

 親系統の発現の安定性については以下のように親系統の評価で確認されている。

30

 ワタ 281/3006 : ELISA 法による蛋白質の発現確認 (Phillips *et al.*, 2003; McCormick and Phillips, 2005)、チョウ目害虫を用いた生物検定(社内報告書 1)及び除草剤グルホシネート散布試験(隔離ほ場試験報告書)

 COT102 : ELISA 法による蛋白質の発現確認(社内報告書 6)及びチョウ目害虫を用いた生物検定

35

 MON88913 : ELISA 法による蛋白質の発現量の確認、及び除草剤グリホサートに対する耐性能により、改変 CP4 EPSPS 蛋白質の個体間及び世代間での発現の安定性を確認した (Burns, 2004)。

- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

ワタ 281、ワタ 3006、COT102 及び MON88913 に移入された核酸の配列には、伝達を可能とする配列を含まないため、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。

10 (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

ワタ 281 及びワタ 3006 を検出及び識別するための方法として、導入遺伝子及びその周辺の核ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いたワタ 281 及びワタ 3006 の特異的検出法が開発されている (Mazzara *et al.*, 2006)。

15 COT102 を検出及び識別するための方法として、導入遺伝子及びその周辺の核ゲノムの DNA 配列をプライマーとして用いた COT102 の特異的検出法が開発されている (社内報告書 7)。

20 MON88913 を検出及び識別するための方法として、挿入遺伝子及びその周辺の核ゲノムの DNA 配列をプライマーとした定性的 PCR 法を開発しており、本法により MON88913 を特異的に検出することが可能である (Burns, 2004)。

本スタック系統ワタを検出及び識別するためには、上記の方法をワタの種子一粒ごとに行う必要がある。

25 (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

- 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

30 本スタック系統ワタには各親系統に由来する以下の特性が付与されている。

ワタ 281/3006 : 導入遺伝子に由来する改変 Cry1F 蛋白質及び改変 Cry1Ac 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性並びに PAT 蛋白質による除草剤グルホシネート耐性

35 COT102 : 導入遺伝子に由来する改変 Vip3A 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性及び APH4 蛋白質によるハイグロマイシン耐性

MON88913 : 導入遺伝子に由来する改変 CP4 EPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性

これらの蛋白質の機能的な相互作用の可能性について、害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質間の各観点から検討した。

害虫抵抗性蛋白質間での機能的な相互作用について

- 5 改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質はチョウ目害虫に殺虫活性を示す。本スタック系統ワタにおいて、これらの導入した遺伝子により発現する蛋白質は殺虫効果の特異性に関与する領域の構造に変化が生じているとは考え難いため、殺虫効果に対する影響はないと考えられる。したがって、本スタック系統ワタにおいて各親系統が有する殺虫効果が相加的に高まることはあり得るが、お互いの作用に影響を及ぼし合うことによる相乗効果や拮抗作用が生じることは考え難い。

除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質間での機能的な相互作用について

- 15 PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び APH4 蛋白質は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、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。したがって、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質間での機能的な相互作用について

害虫抵抗性蛋白質、除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質は、それぞれの有する機能が異なるため、相互に影響を及ぼす可能性は考え難い。

- 25 以上のことから、本スタック系統ワタにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

したがって、本スタック系統ワタと宿主の属する分類学上の種であるワタとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統であるワタ 281/3006、

- 30 COT102 及び MON88913 を個別に調査した結果に基づき評価した。

- 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

- 各親系統の生物多様性影響評価は終了しており、以下の生理学的又は生態学的特性について、各親系統とそれぞれの対照の非組換えワタとの間に相違がないことが確認されている。なお、生理学的又は生態学的特性に関する情報は日

本版バイオセーフティクリアリングハウスホームページ² から参照できる。

- 5
- a 形態及び生育の特性
 - b 生育初期における低温又は高温耐性
 - c 成体の越冬性又は越夏性
 - d 花粉の稔性及びサイズ
 - e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
 - f 交雑率
 - g 有害物質の産生性

10

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

15

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。

(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

25

(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

30

緊急措置計画書を参照。

²DAS-24236-5× DAS-21023-5

https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=730&ref_no=1

SYN-IR102-7

https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=1576&ref_no=1

MON-88913-8

https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=683&ref_no=1

- (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

5

- (6) 国外における使用等に関する情報

ワタ 281、ワタ 3006、COT102、MON88913 及び本スタック系統ワタの諸外国における申請・認可状況は以下の表 6 (p. 25) に示したとおりである。

10

表 6 ワタ 281、ワタ 3006、COT102、MON88913 及び本スタック系統ワタの諸外国における申請・認可状況 (2013 年 1 月現在)

	ワタ 281	ワタ 3006	COT102	MON88913	本スタック系統ワタ
FDA	2004年5月 安全性確認	2004年8月 安全性確認	2005年7月 安全性確認	2005年3月 安全性確認	該当せず
USDA	2004年7月 安全性確認	2004年7月 安全性確認	2005年7月 安全性確認	2004年12月 安全性確認	該当せず
Health Canada	2005年7月 安全性確認	2005年7月 安全性確認	2011年4月 安全性確認	2005年11月 安全性確認	該当せず
CFIA	2005年7月 安全性確認	2005年7月 安全性確認	2011年3月 安全性確認	2005年11月 安全性確認	*
EFSA	2011年12月 安全性確認 ^{注)}	2011年12月 安全性確認 ^{注)}	*	2007年4月 安全性申請	*
FSANZ	2005年2月 安全性確認	2005年2月 安全性確認	2005年2月 安全性確認	2006年2月 安全性確認	*
KFDA	2005年8月 安全性確認 ^{注)}	2005年8月 安全性確認 ^{注)}	*	2006年4月 安全性確認	*
RDA	2008年1月 安全性確認 ^{注)}	2008年1月 安全性確認 ^{注)}	*	2006年11月 安全性確認	*
MOA	2012年11月 申請	2012年11月 申請	*	2007年12月 安全性確認	*

注) ワタ 281/3006 として安全性確認

* : 社外秘情報につき非開示

15

FDA: 米国食品医薬品庁(食品・飼料)

USDA: 米国農務省(環境)

Health Canada: カナダ保健省(食品)

CFIA: カナダ食品検査庁(環境・飼料)

20

EFSA: 欧州食品安全機関(食品・飼料)

FSANZ: オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(食品)

KFDA: 韓国食品医薬品庁(食品)

RDA: 韓国農村振興庁(環境・飼料)

MOA: 中国農業部(環境・食品・飼料)

25

また、ワタ 281/3006、COT102、MON88913 及び本スタック系統ワタの我が国における申請・認可状況は表 5 (p. 19) に記載した。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統ワタはワタ 281/3006、COT102 及び MON88913 から交雑育種法により作出した。

5

本スタック系統ワタにおいて発現する Bt 蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）は、殺虫効果の特異性に関与する領域の構造に変化が生じているとは考え難いため、殺虫効果に対する影響はないと考えられ、害虫抵抗性蛋白質間で相互作用が生じることは考え難い。また、Bt

10

蛋白質は酵素活性を持たないため、植物代謝経路に影響はないと考えられた。次に、本スタック系統ワタにおいて発現する PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び APH4 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。また、PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び APH4 蛋白質はそれぞれ高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響はないと考えられ、除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

15

さらに、害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質は、それぞれの有する機能が異なるため、相互に影響を及ぼす可能性は考え難い。

20

このように、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統ワタの植物体内において相互に影響する可能性は低く、各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

したがって、本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価は、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。以下の「1 競合における優位性」、「2 有害物質の産生性」、「3 交雑性」の各項目について、資料 1～3 のとおり、各親系統において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論されている。このため、本スタック系統ワタは、競合における優位性、有害物質の産生性及び交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

30

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

35

(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

2 有害物質の産生性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

(2) 影響の具体的内容の評価

10

(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

15

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

(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

4 その他

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 本スタック系統ワタにおいて発現する Bt 蛋白質（改変 Cry1F 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び改変 Vip3A 蛋白質）は、殺虫効果の特異性に関与する領域の構造に変化が生じているとは考え難いため、殺虫効果に対する影響はないと考えられ、害虫抵抗性蛋白質間で相互作用が生じることは考え難い。また、Bt 蛋白質は酵素活性を持たないため、植物代謝経路に影響はないと考えられた。

10 次に、本スタック系統ワタにおいて発現する PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び APH4 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。また、PAT 蛋白質、改変 CP4 EPSPS 蛋白質及び APH4 蛋白質はそれぞれ高い基質特異性を有することから植物代謝経路に影響はないと考えられ、除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

15 さらに、害虫抵抗性蛋白質と除草剤耐性蛋白質及び抗生物質選抜マーカー蛋白質は、それぞれの有する機能が異なるため、相互に影響を及ぼす可能性は考え難い。

このように、各親系統由来の発現蛋白質が本スタック系統ワタの植物体内において相互に影響する可能性は低く、各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

20 本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価を、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した結果、本スタック系統ワタを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと総合的に判断した。

参 考 文 献

- 5 An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S.,
Meagher, R.B. (1996) Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis*
ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal*, **10**,
107-121.
- 10 Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C., Lescure, B.
(1989) The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation
elongation factor EF-1a: Molecular cloning, characterization and
expression. *Molecular and General Genetics*, **219**, 106-112.
- Barker, R.F., Idler, K.B., Thompson, D.V., Kemp, J.D. (1983) Nucleotide
sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens*
octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*, **2**, 335-350.
- 15 Barry, G.F., Kishore, G.M., Padgett, S.R., Stallings, W.C. (2001)
Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases.
Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- Burns, A. (2004) Petition for the determination of Nonregulated Status for
Roundup Ready Flex Cotton Mon88913. (社内報告書).
- 20 Christensen, A.H., Sharrock, R.A., Quail, P.H. (1992) Maize polyubiquitin
genes : Structure, thermal perturbation of expression and transcript
splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by
electroporation. *Plant Molecular Biology*, **18**, 675-689.
- 25 Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C., Chua, N.H. (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.
- 30 Depicker, A., Stachel S., Dhaese P., Zambryski P., Goodman, H.M. (1982)
Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of*
Molecular and Applied Genetics, **1**, 561-573.
- Eckes, P., Uijtewaal, B., Donn, G. (1989) Synthetic gene confers resistance
against the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants.
Journal of Cellular Biochemistry, **Suppl. 13D**, 334.
- 35 Ellis, J.G., Llewellyn, D.J., Walker, J.C., Dennis, E.S., Peacock, W.J. (1987)
The ocs element: a 16 base pair palindrome essential for activity of the

octopine synthase enhancer. *The EMBO Journal*, **6**, 3203-3208.

EPA (2003) Notice of Filing a Pesticide Petition to Establish a Tolerance for a Certain Pesticide Chemical in or on Food. *Federal Register*, **68**, 34959-34962.

- 5 Estruch, J.J., Warren, G.W., Mullins, M.A., Nye, G.J., Craig, J.A., Koziel, M.G. (1996) Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 5389-5394.
- 10 FAOSTAT (2012) <http://faostat.fao.org> (参照 2012 年 12 月 14 日)
- Fling, M.E., Kopf J., Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research*, **13**, 7095-7106.
- 15 Giza, P.E., Huang, R.C.C. (1989) A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene*, **78**, 73-84.
- Green, S.B., Ernest, A.D., Bevan, S.A. (2002) Molecular characterization of Cry1F (synpro)/Cry1Ac (synpro) stacked transgenic cotton line 281-24-236/3006-48-81. Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana 「社外秘」
- 20 Green, S.B., Embrey, S.K. (2005) Molecular Characterization of WideStrike X Round-up Ready Cotton. Dow AgroSciences LLC, Indianapolis, Indiana 「社外秘」
- Gruys, K.J., Walker, M.C., Sikorski, J.A. (1992) Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from
25 *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **31**, 5534-5544.
- Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C., Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., Haas, D. (2000) Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 232-237.
- 30 Herrmann, K.M. (1995) The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, **7**, 907-919.
- Itoh, T. and Tomizawa, J. (1978) Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H and DNA polymerase I. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, **43**, 409-418.

- Itoh, Y., Watson, J. M., Haas, D., Leisinger, T. (1984) Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid*, **11**, 206-220.
- Jenkins, J.N. (2003) Cotton. In: Traditional crop breeding practices: an historical review to serve as a baseline for assessing the role of modern biotechnology. OECD, 61-70.
- Kay, R., Chan, A., Daly, M., McPherson, J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science*, **236**, 1299-1302.
- 10 Klee, H.J., Muskopf, Y.M., Gasser, C.S. (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.
- Lee, M.K., Walters, F.S., Hart, H., Palekar, N., Chen, J.-S. (2003) The mode of action of the *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein Vip3A differs from that of Cry1Ab δ -endotoxin. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**, 4648-4657.
- 15 Mazzara, M., Larcher, S., Savini, C., Charles, Delobel C., Van Den Eede, G. (2006) Event-Specific Methods for the Quantitation of the Hybrid Cotton Line 281-24-236/3006-210-23 Using Real-Time PCR - Validation Report and Protocol- Sampling and DNA Extraction of Cotton Seeds. EUR 22473 EN. JRC33249.
- 20 McCormick, R.W., Phillips, A.M. (2005) Protein Expression and Nutrient Composition of Transgenic Cottonseed and Cottonseed Processed Products in Cotton Lines Containing *cry1F*, *cry1Ac* and *pat* genes. Dow Agrosiences LLC, Indianapolis, Indiana (社内報告書)
- 25 Murray, E.E., Lotzer, J., Eberle, M. (1989) Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Research*, **17**, 477-498.
- Norris, S.R., Meyer, S.E., Callis, J. (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.
- 30 OECD (1999) Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 11: Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to
- 35

phosphinothricin herbicide.

- 5 OECD (2004) Series on the Safety of Novel Foods and Feeds, No.11, Consensus Document on compositional considerations for new varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and Anti-nutrients.
- OECD (2007) Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 42: Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-driven insect control proteins.
- 10 OECD (2008) Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45, Consensus Document on the Biology of Cotton (*Gossypium* spp.).
- 15 Padgett, S.R., Re, D.B., Barry, G.F., Eichholtz, D.E., Delannay, X., Fuchs, R.L., Kishore, G.M., Fraley, R.T. (1996a) New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ 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.
- 20 Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R., Fuchs, R.L. (1996b) The Composition of Glyphosate-Tolerant Soybean Seeds is Equivalent to That of Conventional Soybeans. *Journal of Nutrition*, **126**, 702-716.
- 25 Phillips, A.M., Embrey, S.K., Shan, G., Korjagin, V.A. (2003) Field expression of Cry1F (synpro), Cry1Ac (synpro) and phosphinothricin acetyltransferase (PAT) proteins in transgenic cotton plants, cottonseed and cottonseed processed products; and compositional analysis of cottonseed and cottonseed processed products. Dow Agrosciences LLC, Indianapolis, Indiana (社内報告書)
- 30 Rao, R.N., Allen, N.E., Hobbs Jr., J.N., Alborn Jr., W.E., Kirst, H.A., Paschal, J.W. (1983) Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **24**, 689-695.
- Richins, R.D., Scholthof, H.B., Shepherd, R.J. (1987) Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research*, **15**, 8451-8466.

- Ridley, W.P., Sidhu, R.S., Pyla, P.D., Nemeth, M.A., Breeze, M.L., Astwood, J.D. (2002) Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That of Conventional Corn (*Zea mays* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**, 7235-7243.
- 5 Stalker, D.M., Thomas, C.M., Helinski, D.R. (1981) Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics*, **181**, 8-12.
- Sutcliffe, J.G. (1979) Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on
10 Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.
- Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal*, **6**, 2519-2523.
- 15 Umbeck, P.F., Barton, K.A., Nordheim, E.V., McCarty, J.C., Parrott, W.L., Jenkins, J.N. (1991) Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. *Journal of Economic Entomology*, **84**, 1943-1950.
- Van Deynze, A.E., Sundstrom, F.J., Bradford, K.J. (2005) Pollen-mediated
20 gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Science*, **45**, 1565-1570.
- Waldron, C. (1997) Selectable marker for development of vectors and transformation systems in plants. United States Patent No. 5,668,298.
- Wang, K., Herrera-Estrella L., Van Montagu, M., Zambryski, P. (1984) Right
25 bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to the plant genome. *Cell*, **38**, 455-462.
- Zambryski, P., Depicker, A., Kruger, K., Goodman, H.M. (1982) Tumor
30 induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, **1**, 361-370.
- 原田重雄 (1981) II 繊維料 ワタ、工芸作物学 栗原 浩 編 農山漁村文化協会
東京 p26 - 42
- 財務省(2012) 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp>. (参照 2012 年 12 月
14 日)

日本モンサント株式会社 (2005) 除草剤グリホサート耐性ワタ (MON88913) に使用されている *Figwort mosaic virus 35S* プロモーター及びカリフラワーモザイクウィルス 35S プロモーターのエンハンサー配列について

5 社内報告書 1 : 改変型 *Cry1F* 蛋白質及び改変型 *Cry1Ac* 蛋白質の殺虫スペクトル及び非標的生物に対する影響 (社内報告書)

社内報告書 2 : *Vip3A* 蛋白質の殺虫スペクトラム (社内報告書)

社内報告書 3 : COT102 : 本組換え体を用いた標的昆虫に対する抵抗性試験 (社内報告書)

社内報告書 4 : COT102 : 分離比による挿入遺伝子の安定性評価 (社内報告書)

10 社内報告書 5 : COT102 : 挿入遺伝子のコピー数及び複数世代における安定性 (社内報告書)

社内報告書 6 : COT102 : ELISA による蛋白質の発現量測定 (社内報告書)

社内報告書 7 : COT102 : 系統特異的検出方法 (社内報告書)

15 隔離ほ場試験報告書 : チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ (改変型 *cry1F*, 改変型 *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI : DAS-24236-5×DAS-21023-5) の隔離ほ場における安全性評価試験報告書 (社内報告書)

緊急措置計画書

平成25年1月24日

5 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

10 第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性並びに除草剤グル
 ホシネート及びグリホサート耐性ワタ（改変 *cry1F*, 改変 *cry1Ac*, 改変 *vip3A*,
pat, 改変 *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006×COT102×
 MON88913, OECD UI : DAS-24236-5×DAS-21023-5×SYN-IR102-7×
 MON-88913-8) (以下「本スタック系統ワタ」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、科学的根拠に基づき立証された
 15 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

(個人名・所属・電話番号は個人情報のため非表示) 平成25年1月現在

社内委員	
	ダウ・ケミカル日本株式会社 代表取締役 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がある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

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スタック系統ワタの適切な管理、取扱いなどの

10

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を取り、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、本スタック系統ワタが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本スタック系統ワタは、環境中で生存しないように不活化する。

15

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが見出された場合、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。

20

25

以上

資料一覧

5

資料 1 : 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ (*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI:DAS-24236-5×DAS-21Ø23-5)」【総合検討会 : 2005 年 11 月 25 日】

10

資料 2 : 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「チョウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.) (COT102, OECD UI: SYN-IR1Ø2-7)」【総合検討会 : 2008 年 8 月 21 日】

15

資料 3 : 生物多様性影響評価検討会での検討の結果「除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI:MON-88913-8)」【総合検討会 : 2005 年 6 月 9 日】

20

1 (略)

2 名称：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ

(*cryIF*, *cryIAC*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281 × 3006, OECD UI:DAS-24236-5 × DAS-21023-5)

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

申請者：ダウ・ケミカル日本（株）

(1) 生物多様性影響評価の結果について

① 競合における優位性

宿主が属する生物種であるワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の植物体は我が国の冬期には低温により枯死し、また、その種子は休眠が極めて浅いこと等から、ワタが我が国において自生化することはないと考えられる。なお、ワタは長期にわたって我が国において綿実として流通しているが、我が国において自生化しているとの報告はされていない。

我が国の隔離ほ場における調査の結果、競合における優位性に関わる諸形質については、いずれの項目においても本組換えワタと非組換えワタとの間で有意差は認められなかった。

本組換えワタには、移入された改変型 *cryIF* 遺伝子及び改変型 *cryIAC* 遺伝子によりチョウ目害虫抵抗性が、*pat* 遺伝子により除草剤であるグルホシネートへの耐性が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下で生育することを困難にさせる主な要因ではなく、グルホシネートが自然環境下で選択圧になるとは考えにくいから、本組換えワタの競合における優位性が高まり、我が国において生育し自生化することは考えられない。

これらのことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

② 有害物質の産生性

宿主が属する分類学上の種であるワタについては、野生動植物等に影響を与える有害物質を産生するとの報告はない。

本組換えワタは、除草剤グルホシネートへの耐性を有する PAT 蛋白質を産生するが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はされていない。また、PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートを特異的にアセチル化してアセチルグルホシネートに変換する酵素であるが、基質特異性が高いことから、他の代謝系に関与することは考えられ

ない。

また、本組換えワタは改変型 Cry1F 蛋白質及び改変型 Cry1Ac 蛋白質を産生するため、本組換えワタの花粉による非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念されるが、競合における優位性の項において考察しているように、本組換えワタが生育し自生化することはないと考えられる。たとえ本組換えワタがこぼれ落ち等により生育し開花したとしても、ワタの花粉は比較的重く、粘着性があるため飛散する可能性は少ない。従って、ワタを摂食しない非標的昆虫が本組換えワタの花粉に曝露される可能性は低いと考えられる。

さらに、我が国の隔離ほ場試験において、本組換えワタの有害物質（根から分泌され他の植物へ影響を与えるもの、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるもの、植物体が内部に有し枯死した後に他の植物に影響を与えるもの）の産生性の試験が行われており、非組換えワタとの間で有意差は認められていない。

これらのことから、本組換えワタが、宿主であるワタを越えて野生動植物等に影響を与えることは考えにくい。

従って、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

③ 交雑性

我が国の自然環境中にはワタと交雑可能な野生種は生育していないことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論

上記を踏まえ、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

生物多様性影響評価検討会での検討の結果

名称：チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *vip3A*, *Gossypium hirsutum* L.）
（COT102, OECD UI: SYN-IR102-7）

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

申請者：シンジェンタシード株式会社

(1) 生物多様性影響評価の結果について

ア 競合における優位性

宿主が属する生物種であるワタについては我が国における長期にわたる使用等の実績があるが、我が国において自生化することは報告されていない。

本組換えワタには、移入された改変 *vip3A* 遺伝子によりチョウ目害虫抵抗性が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではなく、抵抗性が付与されても競合における優位性に影響はないと考えられる。よって、これらの形質の付与が栽培作物であるワタを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。

我が国の隔離ほ場試験における調査の結果、競合における優位性に関わる諸形質について、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で有意差は認められなかった。

また、移入された *aph4* 遺伝子により APH4 蛋白質を発現するため、一部のアミノグリコシド系抗生物質耐性が付与されるが、これらの形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

イ 有害物質の産生性

宿主が属する生物種であるワタについては他感作用物質のような野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

本組換えワタは、チョウ目昆虫に殺虫活性を有する改変 *Vip3A* 蛋白質及び一部のアミノグリコシド系抗生物質への耐性を付与する APH4 蛋白質を産生するが、いずれの蛋白質についても既知のアレルゲンや毒素との間でアミノ酸配列に相同性はみられないことが確認されている。

改変 *Vip3A* 蛋白質は酵素活性を有するとは考えにくく、また、APH4 蛋白質は極めて基質特異性が高く、植物体中では基質となり得る物質の存在は報告されていない。

したがって、これらの蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと考えられる。なお、本組換えワタの花粉による非標的チョウ目昆虫種

への影響が懸念されるが、ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ないと考えられる。仮に飛散したとしても、その範囲は極めて限定されたものであると考えられ、輸入された種子がこぼれ落ちて、我が国の自然条件下でワタが生育あるいは自生化したという報告はない。

さらに、隔離ほ場において、本組換えワタの有害物質（根から分泌されて他の植物へ影響を与えるもの、植物体が内部に有し枯死した後に他の植物に影響を与えるもの、根から分泌されて土壌生物に影響を与えるもの）の産生性に関する試験として、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれについても、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差は認められなかった。

以上より、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

ウ 交雑性

我が国の自然環境中にはワタと交雑可能な野生植物は自生していないことから、影響を受ける可能性のある野生植物は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論

以上を踏まえ、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

名称：除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI:MON-88913-8)

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

申請者：日本モンサント(株)

(1) 生物多様性影響評価の結果について

競合における優位性

宿主が属する生物種であるワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の植物体は我が国の冬季には低温により枯死し、その種子は休眠が極めて浅いこと等から、ワタが我が国において自生化することはないと考えられる。なお、ワタは長期にわたって我が国において綿実として流通しているが、我が国において自生化しているとの報告はされていない。

本組換えワタについては、移入された改変型 *cp4 epsps* 遺伝子により除草剤であるグリホサートへの耐性が付与されているほか、我が国の隔離ほ場における調査の結果、競合における優位性に関わる諸形質のうち、発芽率及び草丈において非組換えワタとの有意差が認められている。しかし、グリホサートが自然環境下で選択圧になるとは考えにくく、発芽率及び草丈で認められた差異によって自然環境下で繁殖、生存する能力が向上し、本組換えワタが我が国において生育し自生化することは考えられない。

これらのことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

有害物質の産生性

宿主が属する分類学上の種であるワタについては、野生動植物等に影響を与える有害物質を産生するとの報告はされていない。

本組換えワタは、除草剤グリホサートへの耐性を有する改変型 CP4 EPSPS 蛋白質を産生するが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はされていない。また、EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を合成するシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、当該経路の律速酵素ではないことが明らかになっており、EPSPS 活性が増大しても本組換えワタにおいて芳香族アミノ酸が過剰に産生されることはないと考えられる。実際これまでに *cp4 epsps* 遺伝子を移入された他の遺伝子組換え作物 (ワタを含む 4 種) では芳香族アミノ酸含量に変化がないことが確認されている。更に、EPSPS 蛋白質

はホスホエノールピルビン酸及びシキミ酸 - 3 - リン酸と特異的に反応する酵素であることから、CP4 EPSPS 蛋白質が他の物質の反応を触媒して異なる物質が産生されることはないと考えられる。

また、我が国の隔離ほ場試験において、本組換えワタの有害物質の産生性（根から分泌され他の植物へ影響を与えるもの、根から分泌され土壤微生物に影響を与えるもの、植物体が内部に有し枯死した後に他の植物に影響を与えるもの）の調査が行われており、非組換えワタとの間で有意差は認められていない。

これらのことから、本組換えワタが、宿主であるワタを越えて野生動植物等に影響を与えることは考えにくい。

従って、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

交雑性

我が国の自然環境中にはワタと交雑可能な野生種は生育していないことから、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論

上記を踏まえ、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。