

除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps, Gossypium hirsutum L.*)

(1445, OECD UI : MON-Ø1445-2)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

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

- (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況..... 2
- (2) 使用等の歴史及び現状..... 2
- (3) 生理学的及び生態学的特性..... 3

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

- (1) 供与核酸に関する情報..... 4
- (2) ベクターに関する情報..... 8
- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 8
- (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... 9
- (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
- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 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..... 12
- (2) 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..... 13
- (3) 国外における使用等により得られた情報..... 13

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

- 1 競合における優位性..... 13
- 2 有害物質の産生性..... 14
- 3 交雑性..... 15

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 16

緊急措置計画書..... 18

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 4 月 6 日

農 林 水 産 大 臣 亀 井 善 之 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 殿

氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座 4-10-10
銀座山王ビル 8F

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

| | |
|-------------------------|--|
| 遺伝子組換え生物等の 種類の名称 | 除草剤グリホサート耐性ワタ (<i>cp4 epsps, Gossypium hirsutum</i> L.) (1445, OECD UI : MON-Ø1445-2) |
| 遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容 | 食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬 及び廃棄並びにこれらに付随する行為 |
| 遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法 | — |

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ 和名：ワタ。英名：Cotton。学名：*Gossypium hirsutum* L. 陸地綿。

ロ 宿主はアオイ科ワタ属に属する4倍体栽培ワタ(*Gossypium hirsutum*)の品種Coker312である。

ハ ワタ属の野生種は熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯に分布しており、野生の2倍体種はその地理的分布から、オーストラリア群(11種)、アフリカ・アラビア群(8種)及びアメリカ群(12種)の3群に分けられている。

また、野生2倍体種に加え、新大陸に自生する野生4倍体種には、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. mustelinum*(ブラジル北西部)、*G. darwinii*(ガラパゴス)、*G. lanceolatum*(メキシコ)、*G. barbadense*(アンチル列島、中南米)及び*G. hirsutum*(中米)がある。*G. hirsutum*の自生個体が群生していることは稀で、多くの場合海岸沿いないしは小島に分散して生育している。尚、わが国において*G. hirsutum*を含め4倍体栽培ワタと交雑が可能な*Gossypium*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

イ *Gossypium*に属する種、亜種は41種を数え、ワタの野生種は新旧両大陸・アフリカ及びオーストラリアに知られ、原産地はインド・メキシコおよびペルーとされる。ワタの日本への伝来は、799年にインド人によってもたらされたのが最初であるとされているが、このワタはすぐに消滅したようである。その後、文禄年間(1592~1595)にワタの種子が九州に再び伝えられ、ワタ作は関東以南に広がり、明治15~20年頃には10万ha、2万4千トンの生産をみるにいたったが、その後、外綿の輸入に押されてしだいに衰微した。現在では、ワタの日本国内における商業栽培は行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。尚、日本で古くから栽培されているのはアジア綿の*G. arboreum*と考えられている。

ロ ワタ属は41種から成るが、このうち栽培種は、旧大陸の「アジア綿」と総称される2倍体種(n=13)の*G. herbaceum*と*G. arboreum*及び、新大陸の「陸地綿」と呼ばれる4倍体種(n=26)の*G. hirsutum*と*G. barbadense*である。現在、「アジア綿」は、インド、アフリカ及びアジアの限定された地域で栽培されているのみで、世界で生産されるワタの約98%は2つの「陸地綿」で、その90%は*G. hirsutum*種となっている。

摘採した実綿には種子がついており、これを繰綿機にかけて分離した綿毛(lint)を綿花あるいは原綿と呼んでいる。綿花は綿糸・綿織物などの製綿用、あるいは綿火薬や充填用などに用いられる。実綿から綿毛を分離した残りが種子で、その表面につく平均 3~5mm の短い繊維(短毛又は地毛)を脱リンター機でかき取ったものをリンターと呼ぶ。リンターは搾油工場で副産物として生産され、人造繊維や綿火薬の原料とされ、やや長いものは太糸の原料ともされる。リンターをとった種子は 17~23%の油分を含み、これを圧搾するか溶媒で抽出するかして綿実油が得られる。種子 1t から約 130kg の綿実油が得られ、食用油のほかマーガリンや石鹼の原料などとして用いられる。搾油後の綿実粕は精製して主に飼料や肥料として用いられる。

米国農務省の統計情報に基づくと、2002 年の全世界におけるワタの栽培面積は 2,943 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 760 万 ha、米国が 503 万 ha、中国が 418 万 ha、パキスタンが 280 万 ha となっている。

2002 年のわが国における種子の輸入量は約 15 万トンであり、その内の約 96%がオーストラリアから輸入されている。輸入された種子の内、約 4 万トンが搾油用として用いられ、残りのほとんどは、牛の飼料用として用いられた。尚、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て搾油を行っている。また、現在、輸入されている栽培用種子は、そのほとんどが米国から輸入されており、主に観賞用として栽培されている。この栽培用種子はある特定の種苗会社により輸入されており、その種苗会社によると、米国において第三者に委託して輸入する栽培用種子は非組換えワタであることを PCR 法により確認しているとのことである。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性ワタは種子繁殖する多年生のアオイ科作物で、草丈は 90cm~120cm に伸び、15~20 節を有し、各節に葉と 2 芽をつけ、発育枝と結果枝を生じる。尚、多年生となるのは基本的に熱帯地方のみで、日本では一年生である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育は平均気温 25℃を最適とし、20~28℃に適する。降雨量は年 1,000~1,500mm が適しており、生育期には相当の降雨を必要とする。しかし、開花期以降の多雨は落花・落さくを増加させる。また少雨では繰綿歩合が低下する。北米のワタ作地帯は北緯 37~39° であり、北半球では一般に北緯 43° が北限で、ヨーロッパでは 42°、中央アジアでは 44.3° まで分布している。日本では奥羽南端(37.5°)までとされる。土壌は排水良好な砂質壤土に適し、アルカリ土壌に強く酸性を嫌う。また相当塩濃度の高い干拓地にも生育する。

ハ 繁殖又は増殖の様式

① 完熟した種子は開じよの際に出てくるが、基本的に綿毛に覆われているために

脱粒しにくい。種子の休眠性はきわめて浅い。

- ② ワタは栄養繁殖せず、種子繁殖する。自然条件下において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。
- ③ ワタの受粉様式に関しては、他家受粉も可能であることが知られているが、基本的には自家受粉である。尚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。
- ④ ワタの花粉重は比較的軽く、粘着性があるため風媒により交雑することは考えにくい。花粉はマルハナバチ(*Bombus* sp.)やミツバチ(*Apis mellifera*)によって媒介されることがある。しかし、虫媒により花粉が飛散する範囲は限られており、花粉に蛍光粒子を付着させて周辺の花への花粉の飛散を追跡した報告によると、意図的にハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約 45m～60m 離れた花畑でワタの花粉が付着していたのは 1.6%程度の花のみであった。また、別の試験によるとワタ畑から 1m離れた場合の交雑率は 0.4%以下であり、16m離れると 0.3%以下まで減少していたことが報告されている。更に遺伝子組換えワタのマーカー遺伝子を用いた交雑試験の結果によると、30×136m のワタ畑から 1m 離れた場所での交雑率は 5%であったのに対して、7m 離れた地点では 1%以下に減少していた。しかし 1%以下の交雑率はワタ畑から最も離れた 25mの地点でも散発的に認められた。

ニ 有害物質の生産性

他感物質等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生産性は知られていない。

ホ その他の情報

ワタには、ゴッシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、この生理活性物質は種子を含むあらゆる植物組織の分泌器官に存在する。ゴッシポールは哺乳動物の内臓器官や肺に炎症を起し、実験動物においては呼吸困難、麻痺を起こす毒性物質として知られている。しかし、野生の哺乳動物が種子を捕食するという例は報告されていない。

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

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum*) (1445, OECD UI : MON-01445-2) (以下「本組換えワタ」とする)の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は p7 と p8 の表 1 に示した通りである。

ロ 構成要素の機能

- ① 本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は p7 と p8 の表

1 に示した通りである。

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、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一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS 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。目的遺伝子である *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される 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が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-arabino-ヘプツロソニン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 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。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)から、EPSP と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 EPSPS 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が、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

CP4EPS 蛋白質が発現することにより、本組換えワタは除草剤グリホサートに耐性を持つことから、播種前に耕起を行っていない畑にグリホサートを 1 回散布した後、生育期間中に、雑草の生育にあわせて再びグリホサートを 1~2 回散布するだけで雑草の防除が可能になる。これに伴い米国のワタ農家では、年間約 3,000 トンの除草剤使用量の削減と同時に、除草剤散布などの雑草防除に関わる労力の削減が可能となった。

nptII 遺伝子によってコードされる neomycin phosphotransferase type II (NPTII) 酵素蛋白質は、アデノシン 5'-三リン酸(ATP)の末端リン酸基を抗生物質のアミノ配糖分子の水酸基に転移させる。この結果、パロモマイシン、カナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質は不活性化される。通常、これらのアミノ

グリコシド系抗生物質は、リボソーム上の蛋白質と特異的に結合して蛋白質合成を阻害し細胞を殺すが、NPTII 蛋白質によってこれらの抗生物質がリン酸化されると、リボソーム上の標的蛋白質と結合できなくなる。このため、蛋白質合成阻害が起こらず細胞を殺すことができなくなる。

- ② CP4 EPSPS 蛋白質及び NPTII 蛋白質が、既知の接触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、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, Swiss Prot)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

表 1 発現ベクターPV-GHGT07 の各構成要素

| 構成要素 | 由来及び機能 |
|----------------------------|---|
| <i>Cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット | |
| CMoVb | Figwort mosaic virus の 35S プロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。 |
| Ctp2 | シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)の <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。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。 |
| <i>Cp4 epsps</i> | <i>Agrobacterium tumefaciens</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。 |
| E9 3' | 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。 |
| <i>nptII</i> 遺伝子発現カセット | |
| P-35S | カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。 |
| <i>nptII</i> (Kan) | 大腸菌のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、neomycin phosphotransferase type II(NPTII)酵素蛋白質をコードする。 |
| NOS 3' | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。 |
| <i>Gox</i> 遺伝子発現カセット | |
| CMoVb | Figwort mosaic virus の 35S プロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に関与する。 |
| ctp1 | <i>A. thaliana</i> 由来の rubisco の small subunit 1A の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ GOX 蛋白質を輸送する。 |
| <i>Gox</i> | <i>Achromobacter</i> sp.strain LBAA のグリホサート分解酵素(glyphosate oxidoreductase ; <i>gox</i>)由来の変異体 v247 の C-末端をコードする配列。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。 |
| NOS 3' | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。 |
| その他の構成要素 | |
| <i>Ori-V</i> | 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>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。 |
| <i>Aad</i> | Tn7 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。 |
| 右側境界配列(Right Border) | Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列(25bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium 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。 |
| <i>Ori322</i> | <i>E. coli</i> 由来のプラスミド 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。 |
| <i>Rop</i> | <i>E. coli</i> 由来であり、 <i>E. coli</i> 中で複製されるプラスミドのコピー数を制御する。 |

(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られたプラスミド・ベクターは、pBR322 に由来する。pBR322 は *E.coli* 由来の合成プラスミドである。

ロ 特性

本プラスミドベクターの全塩基数は、12,032bp である。

プラスミド・ベクターpBR322 は、大腸菌での構築ベクターの選抜マーカーとしてテトラサイクリン、アンピシリン耐性、DNA 複製開始点 ori 配列を持つ 2 本鎖環状 DNA である。

本プラスミド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

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本プラスミド・ベクターの構成要素については p7 と p8 の表 1 に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド・ベクターPV-GHGT07 をアグロバクテリウム法により従来ワタ品種 Coker 312 へ導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

- ① アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHGT07 を Coker 312 の胚軸に導入した後、カナマイシンを含む培地上で再生個体を得た。
- ② 形質転換体をカルベニシリンとパロモマイシンを含む培地で培養した後、これらの抗生物質を含まない再生培地に移して培養することによって、アグロバクテリウムの残存性がないことを確認している。
- ③ 得られた再生個体について挿入遺伝子や CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外圃場での実際のグリホサート耐性及び農業形質などから総合的に判断して本組換えワタが選抜された。

諸外国における認可状況は以下の通りである。

1995 年 7 月 11 日 米国農務省(USDA)より無規制栽培の認可を得た。

1995 年 9 月 11 日 米国食品医薬品局(FDA)より食品及び飼料としての安全性認可を得た。

1996 年 2 月 21 日 米国環境省(EPA)より生育中のワタへの除草剤グリホサートの適用認可を得た。

2000 年 9 月 14 日 オーストラリア遺伝子技術規制局の暫定機関(IOGTR)から飼料

及び環境への安全性認可を得た。

2000年11月24日 オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)から食品としての安全性認可を得た。

2003年6月19日 オーストラリア遺伝子技術規制局(OGTR)から飼料及び環境への安全性認可を得た。

我が国における認可状況は以下の通りである。

1997年12月9日 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。

1997年12月16日 厚生労働省より「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第4章」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

1998年1月12日 「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。

2001年3月30日 厚生労働省より「組換えDNA技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

2003年3月27日 農林水産省より「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続き」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

(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

サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、挿入遺伝子は本組換えワタの染色体ゲノム中1ヶ所に1コピー組み込まれていることが確認された。更に、CMoVbプロモーター、*gox*遺伝子、*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、*nptII*遺伝子をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、CMoVbプロモーター、*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、そして*nptII*遺伝子は、本組換えワタ中に挿入されていたが、*gox*遺伝子は挿入されていないことが明らかとなった。このことから、本組換えワタのゲノム中には、*gox*遺伝子を除くT-DNA領域(*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、*nptII*遺伝子)が、1コピー組み込まれていることが確認された。尚、PCR法による簡単な選抜がR₀世代(本組換えワタの初代を示す。これ以降、自殖・継代した世代をRの後に付けて表現することとする。)で行われており、*gox*遺伝子に関しては、最初からワタゲノム中に導入されていなかったことが確認されている。更に挿入遺伝子の両近傍配列を決定することにより、挿入遺伝子地図を最終化した。尚、本組換えワタ中には、*E. coli*及び*Agrobacterium tumefaciens*を選抜する際のマーカーとして用いた*aad*遺伝子も導入されていたが、*aad*遺伝子は植物中で機能するプロモーターを持たない為、植物中では発現していない。実際に測定を行ったところ、*aad*遺伝子の産物であるAAD蛋白質は、ELISA検定における検出限界値(種子の生組織重1mgあたり0.025ng、葉の生組織重1mgあたり0.013ng)未満であった。

また挿入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが、R3及びR5世代のサザンブロット分析で明らかとなった。更に、CP4 EPSPS蛋白質及びNPTII蛋白質も安定して発現

していることが、R4 世代及び R5 世代の種子を ELISA 法で分析することにより明らかとなった。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えワタを検出及び識別する為の方法としては、挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとして定性的 PCR 法を開発しており、本法により本組換えワタを特異的に検出可能である。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ *cp4 epsps* 遺伝子によってコードされる CP4 EPSPS 蛋白質は本組換えワタの葉及び種子中で発現していることが確認されている。

ロ 本組換えワタの R5 世代並びに組換え母本である Coker312 を対照品種として平成 9 年 5 月～平成 9 年 10 月まで九州農業試験場の隔離ほ場において隔離ほ場試験を行った。

① 形態及び生育の特性

19 項目(発芽揃い、発芽率、草型、幹長、開花期、花色、葉形、有効花蕾数、結果枝数、開じょ期、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、収穫期、1 さくの乾燥重量、収穫期の地上部・地下部の重量)について本組換えワタ及び対照の非組換えワタ間の形態特性及び生育の差異を調査した。

その中で、草型、幹長、有効花蕾数、結果枝数、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、1 さくの乾燥重量、及び収穫期の地上部・地下部の重量については、各プロットの各列から 5 個体を選び、それぞれ調査した。ただし、さくに関する調査は 1 個体当たり 2 さくについて行った。また、発芽揃い、発芽率、開花期、開じょ期、収穫期については、全個体を調査の対象とした。その結果、発芽率、葉長及びさくの短径について、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められたが($P < 0.05$)、それ以外の項目については、差異は認められなかった。

統計学的有意差の認められた発芽率については、対照の非組換えワタの発芽率が平均で 95%であるのに対して、本組換えワタの発芽率は 3 反復の平均で 55%と低かった。しかしながら、1992 年から 1994 年の 3 年間に米国及びプエルトリコを中心に行われた約 65 ヶ所の圃場試験を通じて、本組換えワタの発芽率に非組換えワタとの間で差がないことが確認されている。また、ドミニカ共和国で栽培された 1445 系統及び Coker312 の種子を用いて、温暖条件(31°C / 24°C, Day/Night)及び冷涼条件(19°C)の 2 条件で、シャーレ内での発芽試験を行い、7 日目に発芽率を調査した結果があるが、この試験においても両者の発芽率に差異は認められていない。更に、今回の隔離圃場試験に用いた種子サンプルについて、米国本社に問い合わせたところ、両方の種子は 1996 年に同一ヶ所の試験区から採取されたものであるが、対照の非組

換えワタを収穫した後に、本組換えワタの種子を収穫する際に大雨があり、多くの収穫種子で裂皮が認められ、対照の非組換えワタと比べると品質的に劣っていたとの報告を受けた。従って、今回の隔離圃場で認められた発芽率の差は、挿入遺伝子に起因したものではなく、本組換えワタの種子サンプルの裂皮による品質低下が原因であると結論された。

また、葉長及びさくの短径については統計的有意差が認められ、本組換えワタと対照の非組換えワタの葉長の平均値はそれぞれ 17.8cm と 17.1cm であり、短径の平均値はそれぞれ 3.5cm と 3.2cm であった。

② 生育初期における低温又は高温耐性

隔離ほ場試験において、生育初期における低温耐性試験は行っていないが、発芽した幼苗が越冬し得るかについては、米国の 3 箇所のは場(Tifton, ジョージア州(GA), Starkville, ミシシッピ州(MS), Loxley, アラバマ州(AL))において、1994 年に R5 世代から収穫した種子をそのまま各ほ場に播種して、その発芽率及び越冬性を調べることにより調査している。尚、これら米国の 3 箇所のは場はいずれも米国南部の代表的なワタの栽培地帯であり、我が国の平均的な気候条件と比較して冬季の冷え込みも比較的少ないことから、我が国よりもワタが生育し易い気候条件であると判断された。

調査の結果、Loxley, AL のほ場で 10 月 18 日に播種した種子が、12 月 15 日に僅かながら発芽していたが(0.3%)、翌年の 1 月 17 日には枯死しており、その後、最終の観察日である 4 月 27 日まで、発芽してくることはなかった。尚、残りの 2 箇所のは場については、播種した種子の発芽は認められなかった。

③ 成体の越冬性又は越夏性

ワタは基本的に多年生植物であるが、これは熱帯地方で生育した場合のみであり、日本及び世界のワタの栽培地帯では、結実後、冬季には通常自然に枯死する。実際に本組換えワタの隔離ほ場試験終了時には、部分的に枯死が始まっていることを確認している。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

④ 花粉の稔性及びサイズ

我が国においては、本組換えワタの種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培自体も行われていない。更に、我が国には本組換えワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本組換えワタが我が国の生物多様性に影響を与えるとすれば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、人の管理が及ばない場所で生育或いは、自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、本組換えワタの隔離ほ場試験では、輸送中にこぼれ落ちた種子がその場で発芽し、生育或いは自生化する可能性の有無を中心に調査した。その一方で花粉に関しては、こぼれ落ちた種子が発芽した後に成体になるまで発生しないことと、これまでに、輸送中にこぼれ落ちた種子が、我が国の自然条件下で生育或いは自生化したという報告はされていないことから、花粉の稔性及びサイズの調査は行わなかった。

⑤ 種子の生産量、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、①の形態及び生育の特性で、1株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数について本組換えワタと対照の非組換えワタとの差異を調査している。その結果、これらの項目について対照の非組換えワタとの間で差異は認められなかった。

ワタの種子休眠性は極めて浅いことが知られている。またその種子の自然条件下での寿命は短く、土壌温度が15～16℃に達する前に播種されると土壌中でほとんど腐敗することが知られている。実際に②で示したように、米国の3箇所のほ場(Tifton, GA, Starkville, MS, Loxley, AL)において、秋に収穫した種子をそのまま各ほ場に播種して、翌春まで観察した結果、対照の非組換えワタと同様に発芽個体は認められず、差異はなかった。この結果から、本組換えワタの種子は、対照の非組換えワタの種子と同様に低温のために土壌中で腐敗したと考えられた。以上のことから本組換えワタの種子の低温での生存性及び越冬性能は極めて低く、我が国の冬季における低温条件下では発芽能力を維持できないと判断された為、休眠性に関する試験は行わなかった。

発芽率については、①の形態及び生育の特性の項目で調査している。その結果、対照の非組換えワタとの間で統計的有意差が認められ、本組換えワタの平均発芽率は55%、対照の非組換えワタの平均発芽率は95%であった。しかし、①の形態及び生育の特性で述べているように、この差異は挿入遺伝子に起因したものではなく、本組換えワタの種子サンプルの裂皮による品質低下が原因であると結論された。

⑥ 交雑率

わが国では本組換えワタが属する4倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は存在しない。従って交雑率については評価を行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

④で述べたように、本組換えワタが有害物質を産生して我が国の生物多様性に影響を与えるとするならば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、人の管理が及ばない場所で生育或いは自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、本組換えワタの隔離ほ場試験では、輸送中にこぼれ落ちた種子がその場で発芽し、生育或いは自生化する可能性の有無を中心に調査した。その一方で根や地上部からの有害物質に関しては、こぼれ落ちた種子が発芽して、ある程度まで生育した後でないと発生しないことと、これまでに、輸送中にこぼれ落ちた種子が、我が国の自然条件下で生育或いは自生化したという報告はされていないことから、有害物質の産生性に関する調査は行わなかった。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びに及びこれらに付

随する行為

(2) 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。

(3) 国外における使用等に関する情報

本組換えワタは、1992年から1994年までにおよそ65ヶ所にわたるほ場試験を米国において行い、雑草性に関する特性、形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病害虫感受性、自生性(volunteers)の観察により評価したが、対照の非組換えワタとの間で明らかな差異は認められなかった。

除草剤グリホサート耐性の形質を付与する *cp4 epsps* 遺伝子は、これまでにダイズ、ナタネ、トウモロコシ、ワタなどの作物に導入され、これらの作物は1996年以降、米国を中心に多くの国々で商業栽培されている。2002年にはこれら除草剤グリホサート耐性作物の栽培面積は、我が国の総面積の約1.3倍にあたる約4,860万haに達していると予想される。その内、本組換えワタは米国を中心に約220万haのほ場で栽培されていると予想されるが、これまでのところ本組換えワタを含めて、除草剤グリホサート耐性作物が生物多様性に影響を与えたという報告はされていない。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

競合における優位性に関わる諸形質について、第一、2-(6)の①形態及び生育の特性、②生育初期における低温耐性、⑤種子の生産性、休眠性及び発芽率に記載したように比較検討した。その結果、葉長及びさくの短径を除く全ての項目で対照の非組換えワタとの間に差異は認められなかった。

葉長及びさくの短径で認められた有意差に関しては、その差異を平均値で見ると僅かであり、この差異のみで競合における優位性が高まるとは考えにくい。

本組換えワタは除草剤グリホサート耐性を有するが、グリホサートを散布されることが想定されにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

更に第一の3-(6)で示したように本組換えワタは1997年に米国での商業栽培が開始

されて以来、現在までに我が国の種子の主要輸入先であるオーストラリアを含めて世界の約 220 万 ha のほ場で栽培されていると予想される為、当然我が国にもその種子が飼料用或いは搾油用として輸入されて来ていると考えられる。しかし、現在までに本組換えワタを含んでいると考えられる種子が、輸送中にこぼれ落ちて、我が国の自然条件下で生育或いは自生化したという報告はされていない。

以上のことから、競合における優位性について影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

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

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本組換えワタは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、CP4 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 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。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質の発現が原因で、本組換えワタ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

我が国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、本組換えワタの種子を販売する予定もない為、本組換えワタが有害物質を産生して野生動植物に影響を与えるとするならば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、生育或いは自生化した場合が想定された。

第一の 3-(6) で示したように本組換えワタは 1997 年に米国での商業栽培が開始されて以来、現在までに我が国の種子の主要輸入先であるオーストラリアを含めて世界の約 220 万 ha のほ場で栽培されていると予想される為、当然我が国にもその種子が飼料用或いは搾油用として輸入されて来ていると考えられる。しかし、現在までに本組換えワタを含んでいると考えられる種子が、輸送中にこぼれ落ちて、我が国の自然条件下で生育或いは、自生化したという報告はされていない。また、第一、2-(6) の① 形態及び生育の特性、② 生育初期における低温耐性、⑤ 種子の生産性、休眠性及び発芽率に記載したように、本組換えワタの種子の越冬性、発芽率は、対照の非組換えワタと比較して大きな相違はないことから、本組換えワタは従来の非組換えワタと同様に我が国の自然条件下で生育或いは、自生化する可能性は極めて低いと考えられた。

以上のことから本組換えワタの種子が輸送中にこぼれ落ちたとしても我が国の自然条件下で生育或いは自生化する可能性は極めて低いと考えられた為、有害物質の産生性(根から分泌され他の植物に影響を与える物質、根から分泌され土壤微生物に影響を与える物質、植物体が内部に有し他の植物に影響を与える物質)に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されないと判断された。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上の結果から、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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 4 倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生していない。よって、交雑性について、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換えワタの性質は、上記の他にはないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

除草剤グリホサート耐性の形質を付与する *cp4 epsps* 遺伝子は、これまでにダイズ、ナタネ、トウモロコシ、ワタなどの作物に導入され、これらの作物は 1996 年以降、米国を中心に多くの国々で商業栽培されている。2002 年にはこれら除草剤グリホサート耐性作物の栽培面積は、我が国の総面積の約 1.3 倍にあたる約 4,860 万 ha に達していると予想される。その内、本組換えワタは米国を中心に約 220 万 ha のほ場で栽培されていると予想されているが、これまでのところ本組換えワタを含めて、除草剤グリホサート耐性作物が生物多様性に影響を与えたという報告はされていない。

一方、我が国においては、本組換えワタの種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培自体も行われていない。更に、我が国には本組換えワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本組換えワタが我が国の生物多様性に影響を与えるとするならば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、人の管理が及ばない場所で生育或いは自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、本組換えワタの隔離ほ場試験では、輸送中に人の管理が及ばない場所にこぼれ落ちた種子がその場で発芽し、自生化する可能性の有無を中心に調査した。

競合における優位性に関わる諸形質について、第一、2-(6)の① 形態及び生育の特性、② 生育初期における低温耐性、⑤ 種子の生産性、休眠性及び発芽率に記載したように比較検討した。その結果、葉長及びさくの短径を除く全ての項目で対照の非組換えワタとの間に差異は認められなかった。葉長及びさくの短径で認められた有意差に関しても、この差異のみで競合における優位性が高まるとは考えにくいと判断された。

また、本組換えワタの種子の越冬性、発芽率は、対照の非組換えワタと比較して大きな相違はないことから、本組換えワタは従来の非組換えワタと同様に我が国の自然条件下で自生

化する可能性は極めて低いと考えられた。

以上から、競合における優位性に関して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

本組換えワタの種子は輸送中にこぼれ落ちたとしても我が国の自然条件下で生育或いは自生化する可能性は極めて低いと考えられた為、有害物質の産生性(根から分泌され他の植物に影響を与える物質、根から分泌され土壤微生物に影響を与える物質、植物体が内部に有し他の植物に影響を与える物質)に関して、生物多様性を生ずるおそれはないと判断された。

我が国では本組換えワタが属する4倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は存在しないことから、本組換えワタが交雑性に関して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本組換えワタを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成16年4月6日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一郎
住所 東京都中央区銀座4-10-10
銀座山王ビル8階

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耐性ワタ (*cp4 epsps*、*Gossypium hirsutum* L.) (1445, OECD UI : MON-Ø1445-2)(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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本組換えワタに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者は以下に示す通りである。
個人名・所属は個人情報につき非開示
- 2 第一種使用等の状況の把握の方法
弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。
- 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法
生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。
- 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容
具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本組換えワタの環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換えワタがあった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること、必要に応じて本組換えワタが日本に輸入されないようにすること等、必要な措置を実行する。
- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制
生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。