

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ワタ(*cry1Ac, cry2Ab, cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.)(15985 × 1445, OECD UI : MON-15985-7 × 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..... 5

(2) ベクターに関する情報..... 13

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 13

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性... 20

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法ならびにそれらの感度及び信頼性..... 26

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 26

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..... 35

(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..... 35

(3) 国外における使用等に関する情報..... 35

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..... 36

2 有害物質の産生性..... 37

3 交雑性..... 38

4 その他の性質..... 39

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 40

緊急措置計画書..... 42

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 6 月 22 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 8 階

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	チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ワタ (<i>cry1Ac, cry2Ab, cp4 epsps, Gossypium hirsutum</i> L.) (15985 × 1445, OECD UI : MON-15985-7 × 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あたり収集した情報

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、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。

八 繁殖又は増殖の様式

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。

ワタは、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、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。

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。

ワタの花粉は比較的重く、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、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。

二 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こし、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

チョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (15985, OECD UI : MON-15989-7)(以下「15985」とする)と、除草剤グリホサート耐性ワタ(*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum*) (1445, OECD UI : MON-Ø1445-2) (以下「1445」とする)を従来の育種法を用いて交

配させた品種チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ワタ(*cry1Ac*, *cry2Ab*, *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (15985 × 1445, OECD UI : MON-15985-7 × MON-Ø1445-2) (以下、「本スタック系統ワタ」とする)は、親系統である 15985 と 1445 の 2 つの組換えワタのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では 15985 と 1445 の調製等に関する情報について個別に述べた。

尚、15985 は *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (*B.t.k*) 由来の改変 *cry1Ac* 遺伝子が導入され改変 *Cry1Ac* 蛋白質を発現するチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.) (531, OECD UI : MON- ØØ531-6)(以下「531」とする)と非組換えワタ品種 DP50 との間で交配を繰り返し育成された組換えワタ品種 DP50B に、新たに *B.t.k* 由来の *cry2Ab* 遺伝子を導入することにより作出された。従って、531 の調製等に関する情報についても述べている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

531 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 p9 の表 1 に示した通りである。

15985 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 p10 の表 2 に示した通りである。

1445 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 p11 ~ 12 の表 3 に示した通りである。

ロ 構成要素の機能

【531 及び 15985 の作出に用いた目的遺伝子】

531 の作出に用いられた供与核酸の機能は p9 の表 1 に示した。15985 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は p10 の表 2 に示した。

(改変 *cry1Ac* 遺伝子)

改変 *cry1Ac* 遺伝子は、植物中での発現量を高めるために、*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 株の産生する野生型 *Cry1Ac* 蛋白質のアミノ酸配列を改変しており、アミノ酸配列の相同性は 99.4% である。本組換えワタ中で発現する *Cry1Ac* 蛋白質は、以下「改変 *Cry1Ac* 蛋白質」とする。改変型を含む *Cry1Ac* 蛋白質は米国及びオーストラリアでのワタ栽培における主要チョウ目害虫である Tobacco budworm (*Heliothis virescens*)、Pink bollworm(*Pectinophora gossypiella*)及び Cotton bollworm 別名 Corn earworm (*Helicoverpa zea*)を中心としたチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。改変 *Cry1Ac* 蛋白質は、植物での発現を高めるために野生型 *Cry1Ac* 蛋白質の N'末端のアミ

ノ酸配列のみを改変したものであり、改変 Cry1Ac 蛋白質のチョウ目害虫に対する活性は、野生型 Cry1Ac 蛋白質と同等である。改変 Cry1Ac 蛋白質を含む Cry1Ac 蛋白質は上記のワタの主要害虫以外にもメイガ科の European corn borer(*Ostrinia nubilalis*)などに対しても殺虫活性を持つが、チョウ目昆虫以外の幼虫に対しては殺虫活性を持たないことが知られている。改変 Cry1Ac 蛋白質を含めた B.t. 菌の産生する B.t. 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。また、本組換えワタ中に産生される、改変 Cry1Ac 蛋白質の活性部分であるコア蛋白質は、市販されている微生物農薬である Bt 製剤中の Cry1Ac 蛋白質のコア蛋白質と同一であり、Cry1Ac 蛋白質を含む Bt 製剤は、米国、ヨーロッパ及び日本での作物や樹木のチョウ目害虫防除に安全に使用されている。

改変 Cry1Ac 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(SwissProt, GenPept, PIR, GenBank/EMBL)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。

(*cry2Ab* 遺伝子)

cry2Ab 遺伝子がコードする Cry2Ab 蛋白質は、土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* に由来し、Cry2Ab2、CryIIB、CryB2 または CryIIAb と呼ばれている。Cry2Ab 蛋白質は、改変 Cry1Ac 蛋白質と同様に米国及びオーストラリアのワタ栽培における主要チョウ目害虫である Tobacco budworm (*Heliothis virescens*)、Pink bollworm(*Pectinophora gossypiella*)及び Cotton bollworm 別名 Corn earworm (*Heliothrips zea*)などに対する殺虫活性を有するが、その他にも Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*)、Beet Armyworm (*Spodoptera exigua*)、Soybean Looper (*Pseudoplusia includens*)などの改変 Cry1Ac 蛋白質に対してはあまり感受性を示さないチョウ目害虫に対しても殺虫活性を有する。

Cry2Ab 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(SwissProt, GenPept, PIR, GenBank/EMBL)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。

(改変 *cry1Ac* 遺伝子 + *cry2Ab* 遺伝子)

本組換えワタ中では 531 由来の改変 Cry1Ac 蛋白質に加えて、新たに Cry2Ab 蛋白質が発現している為、これまで 531 では防除効果が得られなかったヨトウムシ類(Fall Armyworm、Beet Armyworm)やアオムシ類(Soybean Looper)を防除することが可能になる。

更に本組換えワタは殺虫スペクトラムが比較的重複している改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質を発現しているため、両 Bt 蛋白質に対して感受性を示すチョウ目害虫は、それぞれの Bt 蛋白質に対して抵抗性を獲得しなければ抵抗性害虫になれない。このことから本組換えワタは、改変 Cry1Ac 蛋白質のみを単独で発現する 531 と比べて、両 Bt 蛋白質

に感受性を示す標的チョウ目害虫が抵抗性を獲得する確率をより一層低く出来ると期待されている。

【1445 の作出に用いた目的遺伝子】

1445 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は p11 ~ p12 の表 3 に示した通りである。

(*cp4 epsps* 遺伝子)

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-ヘプトロソ酸-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 EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経て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グリホサート耐性作物(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。

1445 では CP4 EPSPS 蛋白質が発現することにより除草剤グリホサートに耐性を持つ。こ

のため、播種前の耕起を行っていない畑にグリホサートを1回散布した後は、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。ワタ栽培では、1作期当たり3~5回の除草剤散布が必要であると考えられており、1445の栽培により、除草剤の使用回数の低減と「不耕起栽培」が期待できる。「不耕起栽培」では、土壌中の化学肥料や農薬の風雨による河川への流入や土壌自体の流亡の減少だけでなく、耕起作業を行う農業機械の使用による土壌の踏み固めも無くて済み、必要な化石燃料の消費を抑えることも可能となる。

(*nptII* 遺伝子)

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。

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 1 531 の作出に用いられたベクターPV-GHBK04 の各構成要素

構成要素	由来及び機能
改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット	
E35S	2重エンハンサーを持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。
改変 <i>cry1Ac</i>	Tobacco budworm (<i>Heliothis virescens</i>)、Pink bollworm(<i>Pectinophora gossypiella</i>)及び Cotton bollworm 別名 Corn earworm (<i>Helicoverpa zea</i>)などのワタの主要害虫を中心としたチョウ目昆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。 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> の産生する野生型 <i>Cry1Ac</i> 蛋白質と99.4%のアミノ酸配列同一性を持つ蛋白質をコードする。
7S 3'	ダイズの -conglycinin 遺伝子の 3'非翻訳領域であり、mRNA のポリアデニル化シグナルを含む。目的遺伝子の転写を終結させる機能を持つ。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット	
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。
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子(Beck <i>et al.</i> ,1982)。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる。
NOS3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域。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	
右境界配列 (RB)	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 (24bp)を含む DNA 断片。右境界配列は、 <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>Aad</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の 3''(9)-O-アミノグリコシドアデニリ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、及びストレプトマイシン耐性を付与する。
<i>ori-V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ABI 株においてベクターに自律増殖能を付与する。
<i>ori322/rop</i>	<i>E. coli</i> プラスミド pBR322 に由来する複製開始領域であり、ベクターに <i>E. coli</i> における自律増殖能を付与する。この領域は複製開始点の他に、複製開始の制御に関わる <i>rop</i> 領域及び <i>E. coli</i> から <i>Agrobacterium tumefaciens</i> への接合伝達に必要な <i>oriT</i> 配列を含む。

表 2 15985 の作出に用いられたベクターPV-GHBK11L の各構成要素

構成要素	機能
<i>uidA</i> 遺伝子発現カセット	
E35S	2重エンハンサーを持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。
<i>uidA</i>	大腸菌プラスミド pUC19 由来の <i>uidA</i> 遺伝子。GUS(β -D-glucuronidase)蛋白質をコードする。
NOS3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域。転写を終結させポリアダニル化を誘導する。
<i>cry2Ab</i> 遺伝子発現カセット	
E35S	2重エンハンサーを持つ、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)のプロモーター。
PetHSP70 leader	ペチュニア(<i>Petunia hybrida</i>)の hsp70(熱ショック蛋白質)5'非翻訳領域。
AEPSPS/CTP2	<i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS 遺伝子由来のN末端葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。
<i>cry2Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> に由来し、ワタ栽培における主要チョウ目害虫である Tobacco budworm (<i>Heliothis virescens</i>)、Pink bollworm(<i>Pectinophora gossypiella</i>)及び Cotton bollworm 別名 Corn earworm (<i>Helicoverpa zea</i>)などに対して殺虫活性を有する Cry2Ab 蛋白質をコードする遺伝子。尚、その他にも Cry2Ab 蛋白質は、ワタ栽培におけるチョウ目害虫である Fall Armyworm (<i>Spodoptera frugiperda</i>)、Beet Armyworm (<i>Spodoptera exigua</i>)、Soybean Looper (<i>Pseudoplusia includens</i>)にも殺虫活性を有する。
NOS3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域。転写を終結させポリアダニル化を誘導する。

表 3 1445 の作出に用いられたベクター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、ポリアダニル化を誘導する。
<i>NptII</i> 遺伝子発現カセット	
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)	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II をコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる。
NOS 3'	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域。転写を終結させポリアダニル化を誘導する。
<i>Gox</i> 遺伝子発現カセット(1445 中には挿入されていない)	
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、ポリアダニル化を誘導する。

表3 続き

その他の構成要素	
<i>Ori-V</i>	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ABI 株においてベクターに自律増殖能を付与する。
<i>Aad</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の 3''(9)-O-アミノグリコシドアデニリ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、及びストレプトマイシン耐性を付与する。
右側境界配列 (R B)	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(24bp)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

531、15985 及び 1445 の作出に用いられたプラスミド・ベクターはいずれも、pBR322 などに由来する。pBR322 は *E.coli* 由来の合成プラスミドである。

ロ 特性

531 の作出に用いられた PV - GHBK04 の全塩基数は 11,407bp であり、ベクター部分の構成要素の詳細は p9 の表 1 に示した通りである。

15985 の作出に用いられた PV - GHBK11 の全塩基数は 8,718bp であり、ベクター部分の構成要素の詳細は p10 の表 2 に示した通りである。

1445 の作出に用いられた PV - GHGT07 の全塩基数は 12,032bp であり、ベクター部分の構成要素の詳細は p11,12 の表 3 に示した通りである。

(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

531 の作出に用いられたベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位に関しては p14 の図 1 に記載した。

15985 の作出に用いられたベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位に関しては p15 の図 2 に記載した。尚、植物細胞に遺伝子を導入する際には、PV-GHBK11 を制限酵素 *KpnI* で処理し、*uidA* 遺伝子発現カセット ([P-e35S]-[*uidA*]-[NOS 3']) 及び *cry2Ab* 遺伝子発現カセット ([P-e35S])-[PetHSP70 leader]-[AEPSPS/CTP2]-[*cry2Ab*]-[NOS3']) から構成される直鎖状 DNA 断片 PV-GHBK11L を用いた。

1445 の作出に用いられたベクター内での供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素による切断部位に関しては p16 の図 3 に記載した。

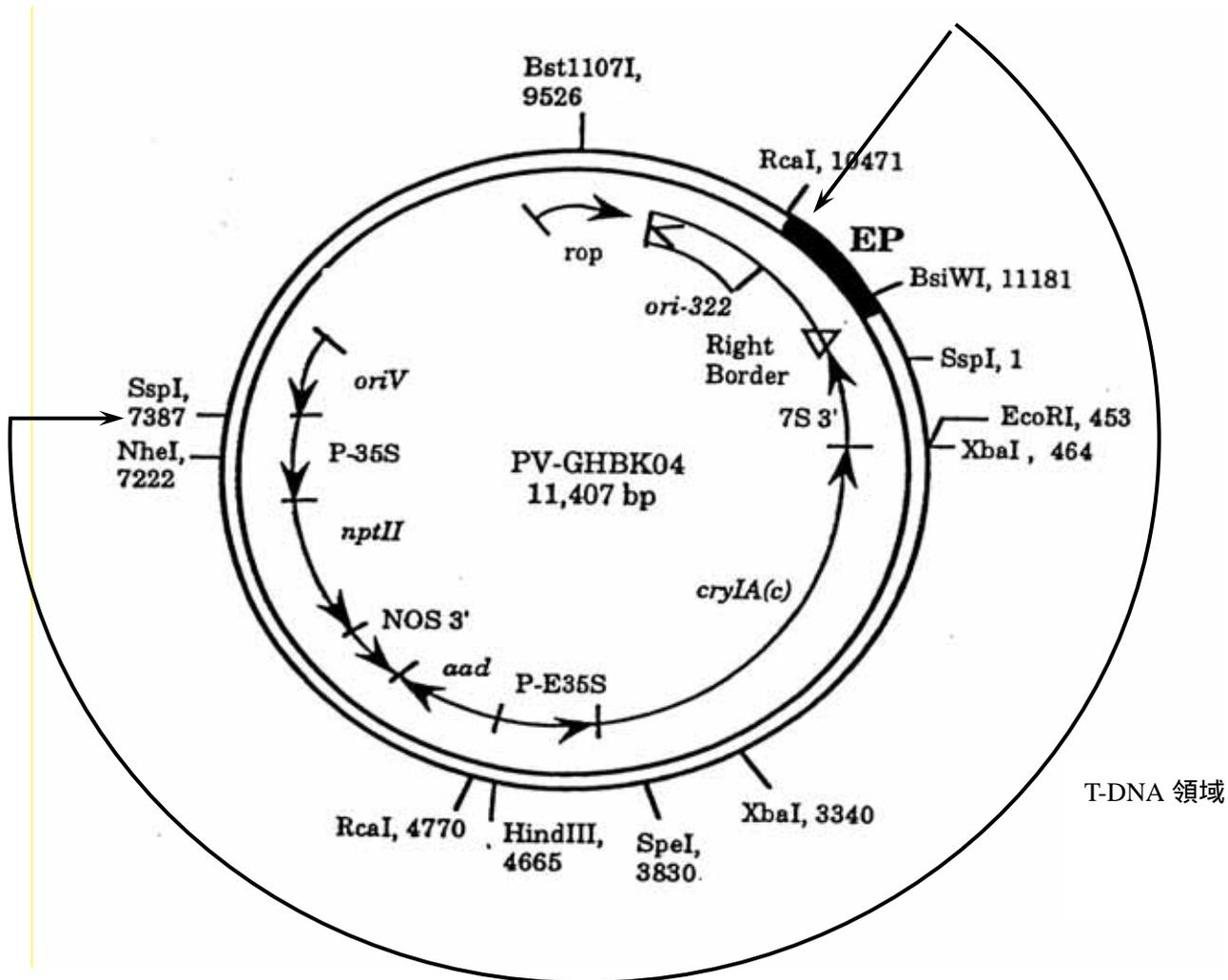


図 1 チョウ目害虫抵抗性ワタ 531 の作出に用いられた PV-GHBK04 のプラスミドマップ

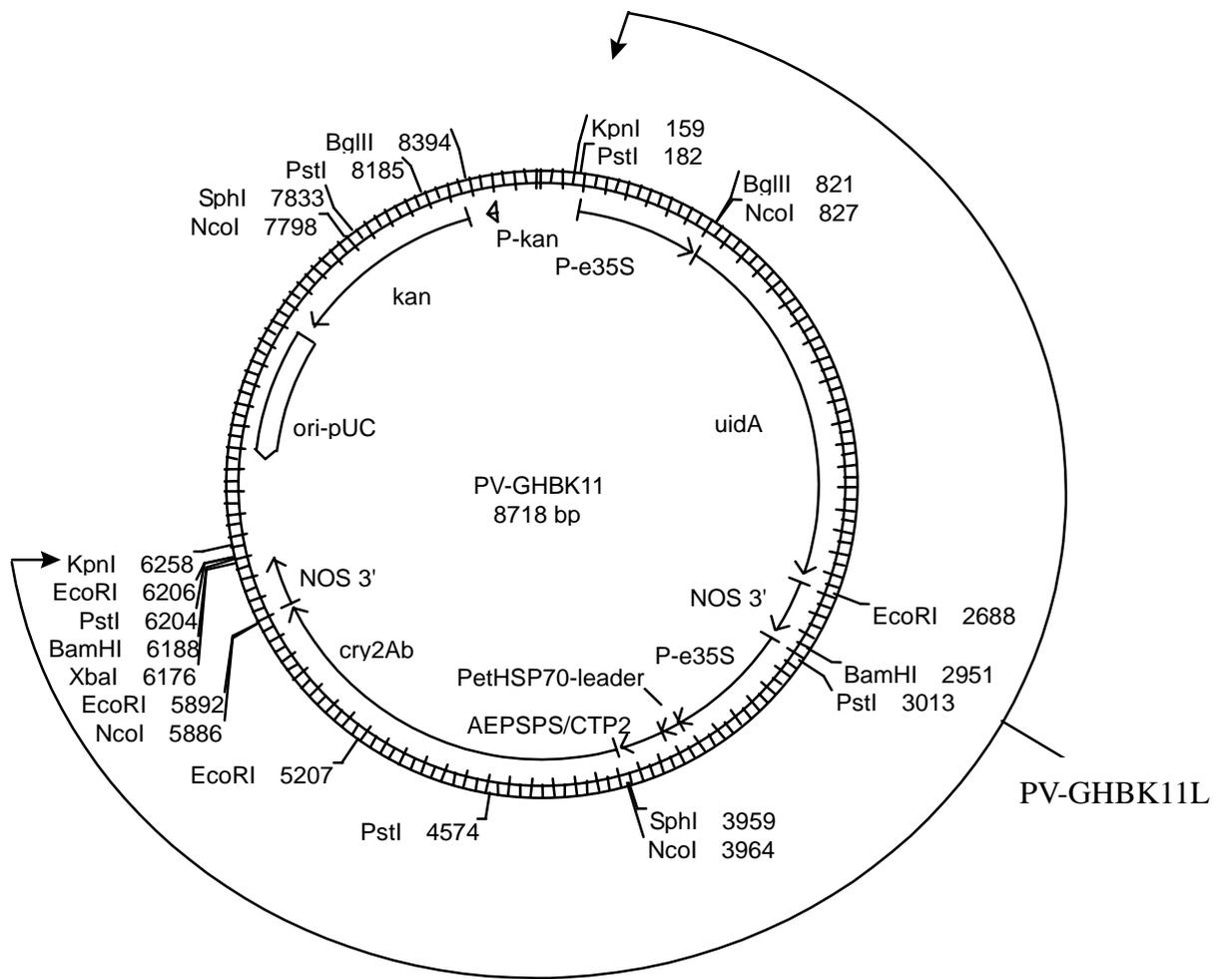


図 2 チョウ目害虫抵抗性ワタ 15985 の作出に用いられた PV-GHBK11 のプラスミドマップ

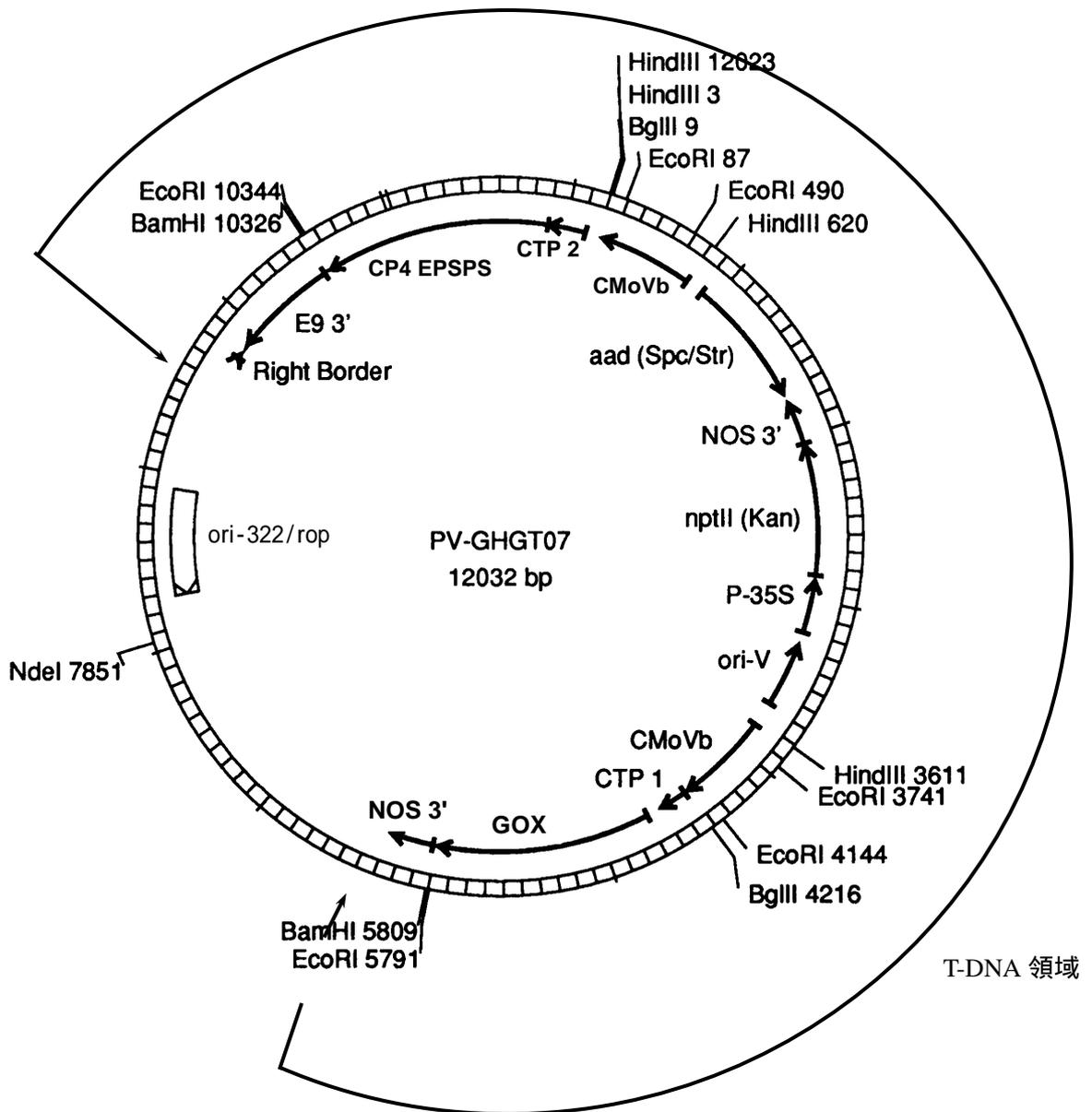


図 3 除草剤グリホサート耐性ワタの作出に用いられた PV-GHGT07 のプラスミドマップ

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

531 の作出では、プラスミド・ベクターPV-GHBK04 中の T-DNA 領域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。

15985 の作出では、直鎖状プラスミド・ベクターPV-GHBK11L をパーティクルガン法により組換えワタ品種 DP50B へ導入した。尚、DP50B とは、531 と非組換えワタ品種 DP50 との間で交配を繰り返し育成された組換え商業ワタ品種のことである。

1445 の作出では、プラスミド・ベクターPV-GHGT07 中の T-DNA 領域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

【531 の育成の経過】

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHBK04 中の T-DNA 領域を 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。

形質転換体からアグロバクテリウムを除くため、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胚発芽培地中で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。

得られた再生個体について挿入遺伝子や改変 Cry1Ac 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害虫抵抗性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病害虫感受性など)などから総合的に判断して 531 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 6 月 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受けた。
- 1995 年 7 月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。
- 1995 年 8 月 米国環境省(EPA)は Cry1Ac 蛋白質に対し、残留基準値の設定の免除を認めた。
- 1996 年 8 月 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受けた。
- 2000 年 7 月 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受けた。

2003年6月 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受けた。

我が国における認可状況は以下の通りである。

- 1997年4月 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5月 厚生労働省(当時厚生省)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。
- 1997年6月 農林水産省より「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 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 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。

【15985の育成の経過】

組換えワタ品種 DP50B を組換え母本とし、その茎頂細胞に PV-GHBK11L をパーティクルガン法により導入した。再生個体の選抜は、GUS 蛋白質を用いた組織化学的染色法により行った。

得られた再生個体について PV-GHBK11L 由来の挿入遺伝子や Cry2Ab 蛋白質及び改変 Cry1Ac 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害虫抵抗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。

- 2001年3月 米国環境省(EPA)はCry2Ab蛋白質に対する残留基準値の設定の免除を認めた。
- 2002年7月 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受けた。
- 2002年11月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。
- 2002年9月 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受けた。
- 2002年10月 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受けた。

我が国における認可状況は以下の通りである。

- 2001年7月 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。
- 2002年10月 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 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。

【1445 の育成の経過】

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。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。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(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病虫害感受性など)などから総合的に判断して1445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。

【15985 × 1445 の育成の経過】

本スタック系統ワタは、15985 と 1445 の二つの組換えワタ同士を伝統的な育種法を用いて作出した。

(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

【531 に移入した核酸の存在状態及び形質発現の安定性】

サザンブロット分析、コスミドクローニング法、そしてゲノムウォーキング法により、挿入遺伝子の解析を行った結果、531 のゲノム DNA 中には、改変 *cryI*Ac 遺伝子発現カセット、*nptII* 遺伝子発現カセットそして *aad* 遺伝子発現カセットより構成される第1挿入遺伝子と、第1挿入遺伝子の5'末端側に逆向きに隣接し、改変 *cryI*Ac 遺伝子の3'領域断片と7S3'ターミネーターにより構成される第2挿入遺伝子、そして第3挿入遺伝子として245bpの7S3'ターミネーター断片が存在していることが明らかとなった(p24の図4)。

サザンブロット分析に関しては、7種類のプローブ(Probe 1～Probe 6及び挿入遺伝子の5'近傍配列と6通りの制限酵素処理(*AseI* + *BstZ17I*, *SspI*, *XmnI*, *BamHI*, *BamHI* + *NdeI*, *BamHI* + *PmeI*)を組み合わせるにより行われた。

次にコスミドクローニング法及びゲノムウォーキング法により得られたDNA断片の配列を解析することにより第2挿入遺伝子の5'近傍配列、第1挿入遺伝子の3'近傍配列、第3挿入遺伝子の両近傍配列を決定した。また、第1及び第2挿入遺伝子の構造を最終的に確認するために、PV-GHBK04の塩基配列をもとにプライマーを設計しPCR分析を行った結果、予想されたサイズのPCR産物が検出された。更にこれらのPCR産物のDNA配列を解析することにより、最終的に第1及び第2挿入遺伝子の全

塩基配列を決定した。

第1並びに第2挿入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが、R5、R6世代及び2つの商品化品種のゲノムDNAを抽出し、サザンブロット分析を行うことにより明らかとなった。尚、2つの商品化品種のゲノムDNA中には、7S3'配列の断片である第3挿入遺伝子は含まれていない。

この理由としては、隣接して挿入されている第1並びに第2挿入遺伝子と比べると第3挿入遺伝子は染色体上で離れた位置に挿入されている為、戻し交配の過程で分離したことが考えられた。すなわち、第3挿入遺伝子は転写を終結させる因子である7S3'配列の断片であり、531における目的形質であるチョウ目害虫抵抗性には寄与していないため、育成にかかる選抜の過程で脱落したことが考えられた。

また、チョウ目害虫抵抗性については、複数世代において安定して発現している事が、改変Cry1Ac蛋白質の発現の有無のみを確認できる簡便ELISA法により育成過程で確認されている。

【15985に移入した核酸の存在状態及び形質発現の安定性】

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15985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。続いて *cry2Ab* 遺伝子発現カセット及び *uidA* 遺伝子発現カセットの完全性をそれぞれの構成要素をプローブとして用いて確認した結果、*cry2Ab* 遺伝子発現カセットは完全な状態で挿入されているが、*uidA* 遺伝子発現カセットは一部が欠損して挿入されていることが示唆された。この *uidA* 遺伝子発現カセットの欠損した部位については、挿入遺伝子の近傍配列をゲノムウォーキングで解析した結果、P-e35Sの5'末端側の約279bpと、約24bpのマルチクロニングサイト由来のポリリンカーであることが確認された。尚、挿入遺伝子地図はp25の図5に示した。

また、ウエスタンブロット分析の結果、15985のR1、R3、R4及びBC2F3世代において、Cry2Ab蛋白質が安定して発現していることが示された。尚、レーン6のR1のバンドが薄いのは、R1が分離集団であるため優性ホモ個体と劣性ホモ個体が混在しているためと考えられた。

尚、挿入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*uidA* 遺伝子の5'末端から1,490番目の塩基が、*E.coli* に導入されている植物発現用プラスミド中の *uidA* 遺伝子配列と比較してグアニン(G)からアデニン(A)に変化しており、その結果アミノ酸配列のN末端から377番目のアミノ酸残基がグルタミン酸(E)からリシン(K)に変化していることが明らかとなった(この蛋白質を以下「GUSE377K」とする)。

この GUSE377K に関しては、アミノ酸の変化が認められたアミノ酸配列 N 末端から 377 番目は、植物、微生物そして哺乳動物中で発現している全ての GUS 蛋白質ファミリー中で共通して保存されている活性部位に含まれるアミノ酸ではない。このアミノ酸の変異は GUS 蛋白質の活性部位及び三次元構造に影響を及ぼさない。蛋白質データベース(SwissProt ver.30, PIR ver.41)を用いて GUSE377K が既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうか調べた結果、GUSE377K は既知アレルゲンとの間に配列の相同性を持たないことが示されたことから、通常の GUS 蛋白質と GUSE377K の構造と機能は同等であると考えられた。

更に今回の挿入遺伝子の解析を行った世代は米国での環境安全性評価を行った R3 世代と R1 世代から派生した複数の BC2F3 世代であり、解析した全ての世代において *uidA* 遺伝子の 5'末端から 1,490 番目の塩基がアデニン(A)であることが明らかとなった。よって *uidA* 遺伝子の 5'末端から 1,490 番目のグアニン(G)からアデニン(A)への変化は、*E.coli* 中での植物発現用プラスミドの増殖あるいは、パーティクルガン法による遺伝子導入の際に起こったものであり、後代へ遺伝する間に起こったものではないと結論された。このことから日本において環境安全性試験を行った世代(R1 及び R4 世代)でも GUSE377K が発現していることが示唆された。

15985 の遺伝的安定性は複数の世代(15985 系統の自殖後代 R1、R2、R3、R4 及び 2 つの従来ワタ品種との交配後代世代 BC2F3)においてサザンプロット分析によって証明された。

【1445 に移入した核酸の存在状態及び形質発現の安定性】

サザンプ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 1445 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。次に、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プ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、1445 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、1445 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(1445 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(p26 の図 6)。

尚、1445 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。

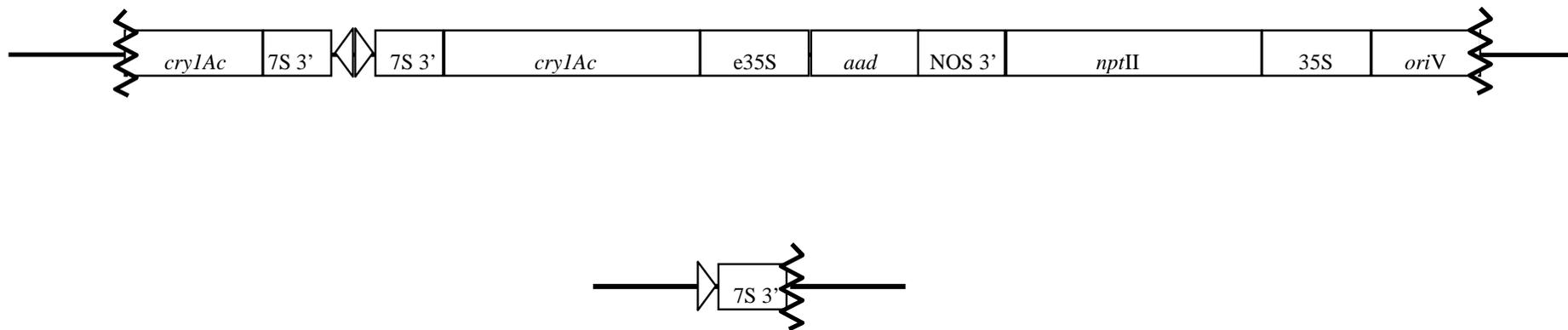


図 4 チョウ目害虫抵抗性ワタ 531 の挿入遺伝子地図

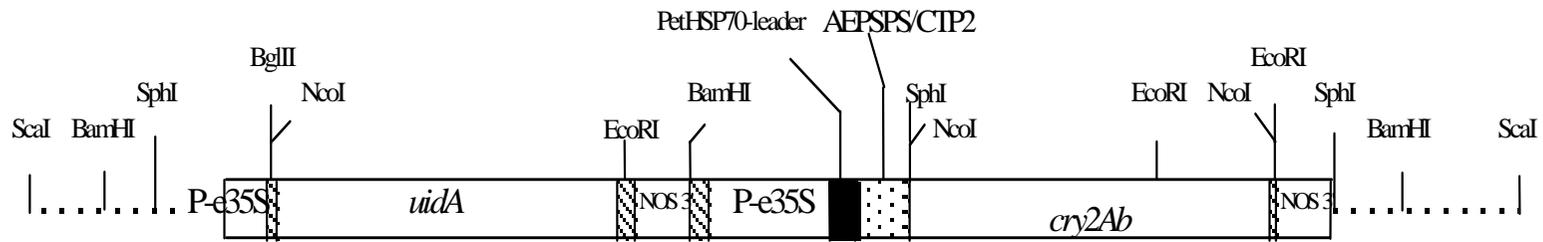


図 5 チョウ目害虫抵抗性ワタ 15985 の挿入遺伝子地図

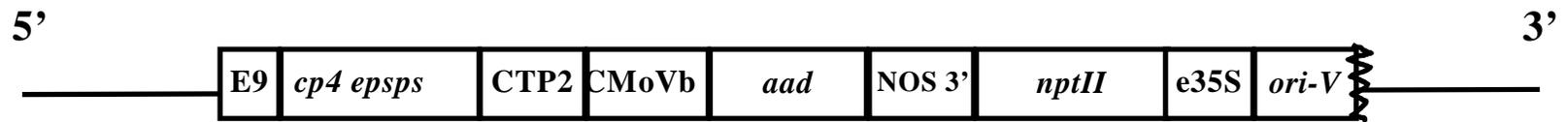


図 6 除草剤グリホサート耐性ワタ 1445 の挿入遺伝子地図

(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

15985 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た定性的 PCR 法を開発しており、本法により 15985 を特異的に検出可能である。

1445 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 1445 を特異的に検出可能である。

本スタック系統ワタを検出及び識別するためには、上述の 2 方法をワタの種子 1 粒毎について行う必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統ワタの親系統である 15985、1445 に挿入された遺伝子により、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。第一の 2-(1)-口で述べたように、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して機能している。同じく、CP4 EPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではないことが示唆されていること、また、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(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、それら組換え作物中の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とから、宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。さらに、CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高い。以上のことから、これら 3 つの蛋白質が付与する形質が相互に影響を受ける可能性はないと考えられる。

実際に確認するために、チョウ目害虫抵抗性については、15985 及び本スタック系統ワタから採取した若葉と蕾の粉末をそれぞれ混合した人工飼料を、標的昆虫である tobacco budworm の幼虫に与えた後、その幼虫の 3 齢期までの生存率を調査した。その後、それぞれの生存率を、あらかじめ作成しておいた標準曲線に当てはめることにより Bt 蛋白質の発現量を導き出し、15985 及び本スタック系統ワタ間での値を比較した。その結果、15985 及び本スタック系統ワタ間での Bt 蛋白質の発現量は同程度で統計的有意差がないことが確認された(p29 の表 4)。

同様に除草剤グリホサートに対する耐性能については、1445 及び本スタック系統ワタにグリホサートを散布した後に、グリホサート特有の薬害(生育阻害、黄化、奇形)の程度を調査した。その結果、通常の散布量では 1445 及び本スタック系統ワタはいずれも除草剤グリホサートに耐性を示すことが確認された(p29 の表 5)。

以上のことから、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相違については、15985 及び 1445 の諸形質を個別に調査した結果を用いて想定した。

表 4 15985 及び本スタック系統ワタ 15985 × 1445 における Bt 蛋白質の発現量の定量的生物検定による比較

品種	若葉		蕾	
	Bt 蛋白質の発現量 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥組織重) ¹	標準誤差	Bt 蛋白質の発現量 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥組織重) ¹	標準誤差
15985	145.4 ²	6.7	160.8 ²	7.3
15985 × 1445	156.2 ²	4.2	181.6 ²	5.6

¹ Bt蛋白質の発現量は、15985 及び本スタック系統ワタ 15985 × 1445 から採取した若葉と蕾の粉末を別々に混合した人工飼料を与えたtobacco budwormの幼虫の3 齢期までの生存率を、改変Cry1Ac精製蛋白質について同様に行った生物検定に基づいて作成された改変Cry1Ac蛋白質濃度と生育阻害率との相関を示す標準曲線に当てはめ、改変Cry1Ac蛋白質換算値で示した。

尚、改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質の両 Bt 蛋白質を発現する 15985 は、改変 Cry1Ac 蛋白質のみを発現する 531 よりも、本定量的生物検定法によって平均して約 4 倍と有意に高い発現量として示す為、本定量的生物検定は 15985 の選抜過程において、標的害虫に対する抵抗性の評価と共に、改変 *cry1Ac* 遺伝子又は *cry2Ab* 遺伝子のどちらかが分離していないことの確認にも用いられている。

² Bt蛋白質の発現量の値は、それぞれ 14 品種の 15985 系統及び 10 品種の本スタック系統ワタ 15985 × 1445 において算出された発現量の平均値である。尚、本統計分析は、SAS(Statistical Analysis System) (version 8.2)の二元配置分散分析(two-way analysis of variance)を用いて行った。

表 5 15985 及び本スタック系統ワタ 15985 × 1445 における除草剤グリホサート(ラウンドアップ)散布による生物検定評価データ

品種	4 葉期にラウンドアップを 散布した後の耐性度(%)		10 葉期にラウンドアップを 散布した後の耐性度(%)	
	ラウンドアップ散布量			
	0.84 kg/ha	1.68 kg/ha	0.84kg/ha	1.68kg/ha
1445	100	99	100	100
15985 × 1445	100	99	100	100

4 葉期及び 10 葉期の 1445 及び 15985 × 1445 系統を各 10 個体ずつ用意して除草剤グリホサートを有効成分量で 0.84kg/ha 或は 1.68kg/ha で散布し、その 10 日後に耐性度(10 個体全体における耐性度)を観察した。尚、耐性度はグリホサート特有の薬害(生育阻害、黄化、奇形)の程度を、それぞれの無散布個体と比較することにより調査した。

イ . 15985 中には改変 *cry 1Ac* 遺伝子がコードする改変 Cry1Ac 蛋白質と *cry2Ab* 遺伝子がコードする Cry2Ab 蛋白質が発現しているが、Cry2Ab 蛋白質については、15985 の若葉、葉、種子、植物体中で発現していることが示されている。一方、改変 Cry1Ac 蛋白質については 15985 とその組換え母本である DP50B 中での発現量が若葉、葉、種子、植物体、花粉を用いて調査されているが、15985 と DP50B のそれぞれの器官における改変 Cry1Ac 蛋白質の発現量に差異は認められないことから、改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質は 15985 中で互いに相互作用を示さないことが証明された。尚、NPTII 蛋白質に関しても同様に 15985 と DP50B 中での発現量が葉と種子を用いて調査されているが、その発現量に明らかな相違は認められなかった。

1445 では、除草剤耐性を付与する *cp4 epsps* 遺伝子によってコードされる CP4 EPSPS 蛋白質が葉及び種子中で発現していることが ELISA 分析によって確認されている。

従って、本スタック系統ワタでも、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質が葉及び種子中で発現していると考えられる。

ロ . 15985 の隔離ほ場試験は、15985 と対照の組換え母本ワタである DP50B 及び非組換えワタ DP50 を用いて九州農業試験場と日本モンサント社の河内研究農場の隔離ほ場で、平成 12 年 5 月から平成 13 年 3 月まで行われた。尚、DP50B とは、531 と非組換えワタ品種 DP50 との間で交配を繰り返し育成された組換え商業ワタ品種のことである。

1445 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われた。

形態及び生育の特性

【15985 の形態及び生育の特性】

20 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、未収穫のさく数、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 15985 と対照の組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 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、各プロットの中央列から3個体以上を選び、合計10個体以上についてそれぞれ調査した。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、R1世代を用いた河内研究農場での試験においては、全ての項目に15985と対照の組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 の間で差異は認められなかった。

一方、九州農業試験場の隔離ほ場においてR4世代を用いて行われた試験では、葉形(葉長)、地下部重量において有意差が認められたが、その他の項目について差異は認められなかった。葉長における差異は組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 の両方に対して認められ、15985の葉長の平均値は16.5cm、組換え母本ワタ DP50B の平均値は17.8cm そして非組換えワタ DP50 の平均値は17.9cmであった。地下部重における差異は非組換えワタ DP50 に対してのみ認められ、組換え母本ワタ DP50B との間で差異は認められなかった。尚、15985の地下部重の平均値は163.3g、組換え母本ワタ DP50B の平均値は156.7g そして非組換えワタ DP50 の平均値は133.3gであった。

【1445の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1445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、1445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ヶ所のほ場試験を通じて、1445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 / 24 , Day/Night)及び冷涼条件(19)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、今回の隔離ほ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、1445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、今回の隔離ほ場で認められた発芽率の差は、挿入遺伝子に起因したのではなく、1445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学的有意差が認められ、1445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。

【スタック系統ワタ 15985 × 1445】

従って、本スタック系統ワタでも、宿主の属する分類学上の種であるワタとの間に葉長、地下部重、さくの短径で統計学的有意差が認められる可能性があるが、その他の形態及び生育の特性については、宿主の属する分類学上の種であるワタとの間に差異はないと考えられる。

生育初期における低温又は高温耐性

【15985の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、米国の22箇所のほ場において翌春発生する自生個体の観察が行われている。尚、これら米国のほ場試験は米国南部の代表的なワタの栽培地帯で行われており、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。

観察の結果、収穫の際にはほ場内にこぼれ落ちた種子が秋に発芽しているのが僅かながら確認されたが、翌春には全て枯死していたということであった。以上のことから本組換えワタの生育初期における低温耐性は、対照の非組換えワタと同様に低いと判断された。

【1445の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箇所のほ場(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箇所のほ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箇所のほ場については、播種した種子の発芽は認められなかった。

【スタック系統ワタ 15985 × 1445】

従って、本スタック系統ワタの生育初期における低温耐性も極めて低いと考えられる。

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15985及び1445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、15985及び1445において成体の越冬性試験は行わなかった。

花粉の稔性及びサイズ

我が国においては、15985及び1445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。したがって、15985及び1445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我が国の自然条件下でこぼれ落ちて生育或いは、自生化して他の植物を駆逐する場合が想定された。しかし、花粉は、こぼれ落ちた種子が発芽した後に成育或いは自生化して、完全な成体になるまでは形成されないことと、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、15985及び1445において花粉の稔性及びサイズの調査は行わなかった。

種子の生産量、休眠性及び発芽率

【15985 の種子の生産量、休眠性及び発芽率】

種子の生産量については、 の形態及び生育の特性で示したように、1株当りのさく数、さくの室数、さくあたりの種子数について本組換えワタと組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 との間で差異を調査している。その結果、R1 及び R4 世代とも全ての項目において統計的有意差は認められなかった。

脱粒性については、本組換えワタとその対照の非組換えワタは共に、収穫時種子は綿毛とリントに覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

休眠性については、1999年に米国のテキサス州(TX)、サウスカロライナ州(SC)及びルイジアナ州(GA)の3ヶ所のほ場試験において収穫された本組換えワタ、組換え母本ワタである DP50B、非組換えワタ DP50、そして参考として加えた 11 の従来品種の種子を用い、5~40 の異なる温度条件下での種子発芽率を調査することによって評価した。

その結果、いくつかの温度条件下では、本組換えワタと対照の組換え母本ワタである DP50B との間で統計的有意差($p < 0.05$)が認められたが、それらは参考として加えられた 11 の従来品種の値の範囲内であった。一方、それぞれの温度条件下で、本組換えワタ、組換え母本ワタ DP50B 及び参考として加えた 11 の従来品種の種子は、いずれも発芽(germinated)、吸水膨潤(Viable Firm Swollen)あるいは死滅状態(degenerated)であり、休眠状態(Viable Hard)の種子は認められなかった。

発芽率については、 の形態及び生育の特性で示したように、R1 及び R4 世代とも対照の組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 との間で差異は認められなかった。

【1445 の種子の生産量、休眠性及び発芽率】

1445 の種子の生産量については、 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 1445 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 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、1445 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壤中で腐敗したと考えられた。以上のことから 1445 の種子の低温での生存性及び越冬能力は極めて低く、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、 の形態及び生育の特性で調査している。その結果、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められ、1445 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、 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のではなく、1445 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。

【スタック系統ワタ 1445 × 531】

従って、本スタック系統ワタにおける種子の生産量に関わる諸形質(1株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数)、休眠性及び発芽率については、宿主の属する分類学上の種であるワタとの間に差異はないと考えられる。

交雑率

わが国では 15985 及び 1445 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 15985 及び 1445 の交雑率については試験を行わなかった。

有害物質の産生性

で述べたように、15985 及び 1445 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我が国の自然条件下でこぼれ落ちて生育或いは、自生化して他の植物を駆逐する場合が想定された。しかし、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、15985 及び 1445 の有害物質の産生性に関する試験は行っていない。

しかし、15985 に関しては参考として R1 世代及び R4 世代の植物体を用いて鋤き込み試験、後作試験及び土壤微生物試験を行っているが、全ての項目において 15985 と対照の組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 の間で統計学的に有意な差異は認められなかった。

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

本スタック系統ワタの国外における商業栽培は、米国等で行われている。

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 15985 と 1445 を従来育種法により掛け合わせた品種である。従って、本スタック系統ワタは 15985 と 1445 の特性を併せ持つ。第一の 2-(6)で述べたとおり、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質は酵素活性を持たず宿主の代謝系とは独立に機能しており、また CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼさないことから、本スタック系統ワタではこれら 3 つの蛋白質が付与する形質が相互に影響を受ける可能性はないと考えられる。従って、本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価は、15985 と 1445 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

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

本スタック系統ワタの親系統である 15985 と 1445 の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 形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、種子の生産量、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、15985 においては、R1 世代を用いた日本モンサント河内試験農場での試験で、全ての項目において差異は認められなかったが、九州農業試験場の隔離ほ場において R4 世代を用いて行われた試験では、葉形(葉長)及び地下部重量において有意差が認められた。しかし、その他の全ての項目では差異は認められなかった。R4 世代の葉形(葉長)において認められた差異に関しては、本組換えワタの平均値が 16.5cm であったのに対して、組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 の平均値がそれぞれ 17.8cm と 17.9cm であった。一方、R1 世代を用いた試験では統計的有意差は認められなかった。また R4 世代の地下部重量において認められた差異に関しては、本組換えワタの平均値が 163.3g であったのに対して、組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 の平均値がそれぞれ 156.7g と 133.3g であった。一方、R1 世代を用いた試験では統計的有意差は認められなかった。しかし、葉長及び地下部重以外の競合における優位性に関わる諸形質では本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で差異は認められなかったことから、これら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。

1445 においては、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。

本スタック系統ワタはチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合にお

ける優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるワタが、本形質が付与されたによって自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

また本スタック系統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。

以上のように、本スタック系統ワタは、葉長、地下部重、さくの短径において差異が認められる可能性があるが、これら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。また本スタック系統ワタは、チョウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性を併せ持つが、これらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質が互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

従って、本スタック系統ワタにおいて、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物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、本スタック系統ワタは、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

我が国では、ワタの商業栽培は行われておらず、本スタック系統ワタの種子を販売する予定もない為、本スタック系統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、生育或いは自生化した場合が想定された。しかし、現在までにワタの種子

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 形態及び生育の特性、 生育初期における低温耐性、 種子の生産量、休眠性及び発芽率に記載したように、本スタック系統ワタの親系統である 15985 及び 1445 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、本スタック系統ワタは従来の非組換えワタと同様に輸送中に我が国の自然条件下でこぼれ落ちたとしても生育或いは、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、本スタック系統ワタは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

我が国では本スタック系統ワタが属する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、本スタックシステムワタは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スタックシステムワタの性質は、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

我が国においては、本スタック系統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、我が国には本スタック系統ワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本スタック系統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て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、輸送中にこぼれ落ちた種子の発芽性、自生化の可能性について行った調査結果を中心にして本スタック系統ワタの生物多様性影響を評価した。

尚、本スタック系統ワタは 15985 と 1445 を掛け合わせた交配後代品種であり、本スタック系統ワタは 15985 並びに 1445 の特性を併せ持つ。第一の 2-(6)で述べたとおり、本スタック系統ワタにおける改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質及び CP4 EPSPS 蛋白質が付与する形質が相互に影響を受ける可能性は考えにくい。従って、親系統 15985 と 1445 の生物多様性影響の評価の結果を用いて本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価を行った。

本スタック系統ワタの親系統である 15985 と 1445 において競合における優位性に関わる諸形質について、比較検討した。

その結果、15985 においては、R1 世代を用いた日本モンサント河内試験農場での試験で、全ての項目において差異は認められなかったが、九州農業試験場の隔離ほ場において R4 世代を用いて行われた試験では、葉形(葉長)及び地下部重量において有意差が認められた。しかし、その他の全ての項目では差異は認められなかった。葉形(葉長)及び地下部重量において認められた有意差に関しては、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。

1445 においては、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と判断された。

以上のように、本スタック系統ワタは、葉長、地下部重、さくの短径において差異が認められる可能性があり、チョウ目害虫抵抗性及びグリホサート耐性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質が互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

本スタック系統ワタの親系統である 15985 と 1445 において越冬性及び発芽率を比較検

討した。その結果、対照の非組換えワタと比較して大きな差異はなかったことから、本スタック系統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。従って、本スタック系統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、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。

我が国では本スタック系統ワタが属する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おらず、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判断された。

よって、総合的評価として、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6月22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チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グリホサート耐性ワタ(*cry1Ac*, *cry2Ab*, *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.)(15985 × 1445, OECD UI : MON-15985-7 × MON-Ø1445-2)(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、本スタック系統ワタに関して、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
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、輸入された本スタック系統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スタック系統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、必要に応じて本スタック系統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。