

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ
 (改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.)
 (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3)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.....	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	3
和名、英名及び学名.....	3
宿主の品種名又は系統名.....	3
国内及び国外の自然環境における自生地帯.....	3
(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	4
主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	4
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
イ 基本的特性.....	5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件.....	5
ハ 捕食性又は寄生性.....	6
ニ 繁殖又は増殖の様式.....	6
種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	6
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.....	6
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.....	6
花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	7
ホ 病原性.....	7
ヘ 有害物質の産生性.....	7
ト その他の情報.....	8
2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	8
(1) 供与核酸に関する情報.....	8
イ 構成及び構成要素の由来.....	9
ロ 構成要素の機能.....	9
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.....	9

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	14
宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	18
(2) ベクターに関する情報.....	24
イ 名称及び由来	24
ロ 特性.....	25
ベクターの塩基数及び塩基配列.....	25
特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....	25
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	25
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	25
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....	25
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....	25
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	26
核酸が移入された細胞の選抜の方法	26
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	26
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.....	26
(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.....	28
移入された核酸の複製物が存在する場所.....	28
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.....	30
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	30
(6) の において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性	30
ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	33
(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.....	33

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	33
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.....	33
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.....	35
a 形態及び生育の特性.....	35
b 生育初期における低温耐性.....	36
c 成体の越冬性.....	37
d 花粉の稔性及びサイズ.....	37
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率.....	37
f 交雑率.....	38
g 有害物質の産生性.....	38
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	39
(1) 使用等の内容.....	39
(2) 使用等の方法.....	39
(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.....	39
(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.....	39
(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.....	39
(6) 国外における使用等に関する情報.....	39
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	41
1 競合における優位性.....	41
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	41
(2) 影響の具体的内容の評価.....	42
(3) 影響の生じやすさの評価.....	42
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	42
2 有害物質の産生性.....	42
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	42
(2) 影響の具体的内容の評価.....	44
(3) 影響の生じやすさの評価.....	44
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	44
3 交雑性.....	45
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	45

(2) 影響の具体的内容の評価.....	45
(3) 影響の生じやすさの評価.....	45
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	45
4 その他の性質.....	45
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	46
参考文献.....	49
緊急措置計画書.....	56
除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 <i>dmo, bar, Gossypium</i> <i>hirsutum</i> L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3) の別添資料リスト	58

第一種使用規程承認申請書

平成 25 年 5 月 7 日

5 農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

10 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 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 <i>dmo, bar, Gossypium hirsutum</i> L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3)
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

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

和名、英名及び学名

10

和名：ワタ

英名：cotton 又は upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

15

宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種名は Coker130 である。

国内及び国外の自然環境における自生地域

20

ワタはアオイ科 *Gossypium* 属に属する。*Gossypium* 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、Fryxell は野生の 2 倍体種を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 群にさらに分けている (Fryxell, 1984)。また、野生 2 倍体に加え、新大陸に自生する野生 4 倍体種には、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. mustelinium* (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 (Fryxell, 1984; Lee, 1984)。*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 (Lee, 1984)。

30

なお、わが国において *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の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

国内及び国外における第一種使用等の歴史

5 *Gossypium* 属のうち栽培種は 4 種に分けられ、旧大陸の「アジア綿」と総称される 2 倍体種 ($2n=26$) の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、及び新大陸の複 2 倍体種 ($2n=52$) で「陸地綿、アメリカ綿、メキシコ綿」として知られる *G. hirsutum*、「ピマ綿、超長繊維 (ELS) 綿、海島綿、エジプト綿、クレオール綿、インド綿」として知られる *G. barbadense* があり、個々に栽培品種化されてきた (原田, 1981; Lee, 1984; Brubaker et al., 1999; OGTR, 2008)。

15 日本で古くから栽培されているワタはアジア綿の *G. arboreum* である。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次第に衰微した (原田, 1981)。現在では、ワタの日本国内における商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。

20

主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

G. herbaceum はアフリカ及びアジアの乾燥地帯で、また、同じく 2 倍体種の *G. arboreum* は主にインドで栽培されている。

25 *G. hirsutum* 及び *G. barbadense* は、主要な栽培ワタ種であり、世界的なワタの主要栽培地域であるアメリカ、ヨーロッパ、中国、アフリカ及びオーストラリアで栽培されている (Lee, 1984; Jenkins, 2003)。

30 米国農務省の統計情報に基づくと、2011/12 年の全世界におけるワタの栽培面積は 3,552 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 1,220 万 ha、中国が 540 万 ha、米国が 383 万 ha、パキスタンが 300 万 ha となっている (USDA-FAS, 2013)。

35 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(綿実)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(綿実)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種子油(綿実油)が得られる。種子(綿実)1tから約130kgの種子油(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。搾油後の種子粕(綿実粕)は精製して主に飼料や肥料として用いられる(原田, 1981)。

2012年のわが国における搾油用種子(綿実)の輸入量は11万5,740トンであり、そのうち約94%がオーストラリア、約4.9%が米国、約0.4%がギリシャから輸入されている(財務省, 2013)。播種用種子は中国とポーランドから輸入されており、輸入量は、1トン未満である(財務省, 2013)。

(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1.0~2.0mに伸び、発育枝と結果枝を生ずる(OECD, 2008)。葉は主茎あるいは枝の軸にらせん状に交互につき、各結果枝は6~8個の花芽を付ける(OECD, 2008)。

なお、栽培条件下では一年生農作物として栽培され、草丈に関しては1~1.5m程度に抑制される(OECD, 2008)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育に最適な気温は30~35℃である(OECD, 2008)。ワタは通常年降水量1,000~1,500mmぐらいのところで作られるが、灌漑ができれば、降雨は少ないほうがよい(原田, 1981)。着蕾期及び開花期に多雨、日照不足、干ばつなどが起こると落蕾や落さくが増加する(平野, 1987)。ワタの栽培は主にオーストラリアやアルゼンチン北部などの北緯37度から南緯32度の間で行われているが、中央アジアや中国など北緯43~45度に至る地域でも栽培されている(OECD, 2008)。ワタは様々な土壌で栽培されているが、生育に最適なものは有機質が多くて水分保持力が高く、水はけの良い耕作地である(OECD, 2008)。

八 捕食性又は寄生性

-

5

二 繁殖又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

10 ワタのさくは 3~5 室で構成されている (OECD, 2008)。ワタの完熟したさくはさく皮が裂けて開じょするが、種子は綿毛に覆われているために脱粒性は低い(Llewellyn and Fitt, 1996)。また、種子の休眠期間は 2~3 ヶ月である (OECD, 2008)。

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

20 ワタは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。

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

25 ワタの受粉様式に関しては、基本的には自家受粉である (Niles and Feaster, 1984)。虫媒による他家受粉も可能であることが知られており、その際の家受粉率は 5~30%であったと報告されている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。なお、わ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。

花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

5 *Gossypium* 属の花粉の生産量は 1 花当たりおよそ 4 万 5,000 粒である (McGregor, 1976)。花粉は直径 101 μm 、刺状突起の長さは 12.1 μm 、刺状突起の密度は 1 μm^2 当たり 8.3×10^{-3} 本である (Kakani et al., 1999)。ワタは、基本的には自家受粉であるが、虫媒 (例：ハチ) による他家受粉も可能であることが知られている。ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから風により飛散する可能性は少ない (OECD, 2008)。*G. hirsutum* の花粉に蛍光粒子を附着させて周辺の花への花粉の飛散を追跡した結果、ハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約 45m~60m 離れた花畑で約 1.6%の花からワタの花粉が検出された (McGregor, 1976)。さらに、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 0.03% 以下まで減少していた (Llewellyn and Fitt, 1996)。ワタの花粉の生存率は、オーストラリアでの試験において 32 時間
10
15 間で 95% から 10% に低下したことが報告されている (Richards et al., 2005)。

ホ 病原性

20

ヘ 有害物質の産生性

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、種子を含む全植物組織の分泌腺に存在する (OGTR, 2008)。ゴシポールは哺乳動物の腹腔内臓器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が (生化学辞典, 1990)、搾油過程の加熱により無毒化される (Harris, 1981; NCPA, 1993)。
25

また、ワタにはジヒドロステルクリン酸、ステルクリン酸、マルバリン酸などのシクロプロペン脂肪酸 (CPFA) が含まれており、種子の総脂質中のおよそ 0.5~1.0% を占める (OECD, 2008)。本物質は鶏において卵黄の変色及び
30 白化率の低下などの有害な影響を及ぼすとされているが、搾油工程の脱臭過程において著しく減少する (OECD, 2008; OECD, 2009)。

ト その他の情報

5 わ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

10 (1) 供与核酸に関する情報

15 モンサント・カンパニーは、除草剤ジカンバ (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid: 3,6-ジクロロ-2-メトキシ安息香酸) 及び除草剤グルホシネート (2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl) butanoic acid: 2-アミノ-4-(ヒドロキシメチルホスフィニル) ブタン酸) に対する耐性が付与された除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-88701-3) (以下、「本組換えワタ」という。) を作出した。

イ 構成及び構成要素の由来

5 本組換えワタ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図 1 (p10)及び表 1 (p11~13)に示した。

本組換えワタには *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来の *dmo* 遺伝子と *Streptomyces hygroscopicus* 由来の *bar* 遺伝子が導入されている。

10 本組換えワタに導入された *dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (dicamba mono-oxygenase: 以下、「DMO 蛋白質」とする。) のアミノ酸配列は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、葉緑体輸送ペプチド (chloroplast transit peptide、以下「CTP2」とする。) の切断を容易にする目的で N 末端配列から 1 番目のメチオニンの
15 直後にロイシンが挿入されている。よって、本組換えワタに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」とし、発現する蛋白質を「改変 MON88701 DMO 蛋白質」とする。なお、改変 MON88701 DMO 蛋白質には N 末端側に CTP2 由来の 9 アミノ酸が結合している。

20 本組換えワタに導入された *bar* 遺伝子から発現するホスフィノトリシン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (phosphinothricin *N*-acetyltransferase、PAT) 蛋白質のアミノ酸配列は、*S. hygroscopicus* 由来の野生型 PAT 蛋白質 (以下、「PAT 蛋白質」とする。) と同一のものである。

25 本組換えワタにおいて発現する改変 MON88701 DMO 蛋白質と PAT 蛋白質の推定アミノ酸配列は別添資料 1 に示した。

ロ 構成要素の機能

30 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

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の機能は表 1 (p11~13) に示した。

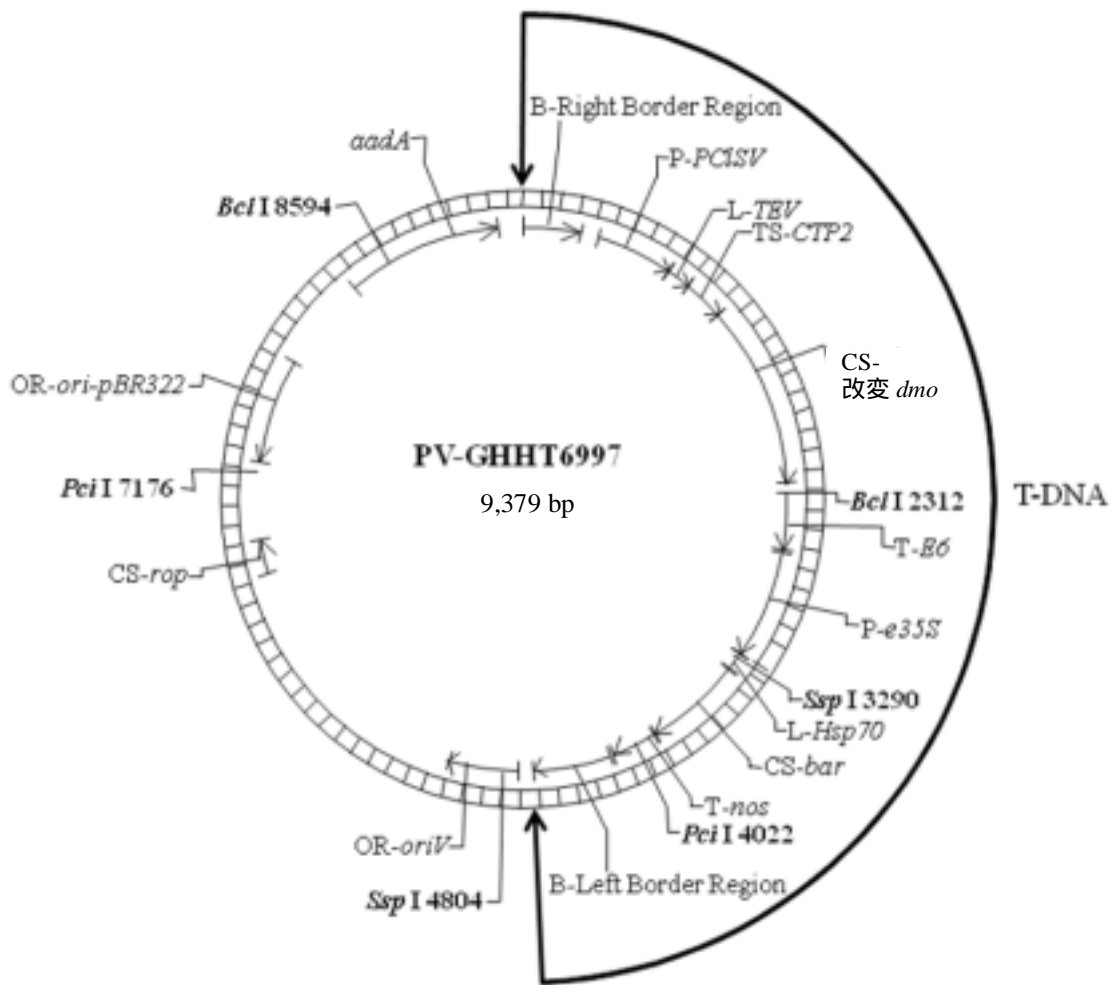


図 1 PV-GHHT6997 のプラスミドマップ¹

¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT6997 の各構成要素の由来及び機能²

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA		
B ^{注1} -Right Border Region	1-331	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	332-433	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} -PCISV	434-866	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) の全ゲノムの転写によって生じる完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) の転写を誘導するプロモーターで、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
Intervening Sequence	867-872	DNA クローニングの際に利用された配列。
L ^{注3} -TEV	873-1,004	Tobacco Etch virus (TEV) 由来の 5' 末端非翻訳領域 (Niepel and Gallie, 1999)。遺伝子発現の制御に關与する。
Intervening Sequence	1,005-1,005	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS ^{注4} -CTP2	1,006-1,233	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (<i>ShkG</i>) の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 DMO 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS ^{注5} -改変 <i>dmo</i>	1,234-2,256	除草剤ジカンバ耐性を付与する <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO 蛋白質) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。
Intervening Sequence	2,257-2,310	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注6} -E6	2,311-2,625	<i>Gossypium barbadense</i> (ピマワタ) の初期繊維形成に關わる繊維蛋白質をコードする <i>E6</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域 (John, 1996)。mRNA のポリアダニル化を誘導する。
Intervening Sequence	2,626-2,637	DNA クローニングの際に利用された配列。
P- <i>e35S</i>	2,638-3,249	2 重エンハンサーを持つ (Kay et al., 1987)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のプロモーター (Odell et al., 1985)。植物細胞で恒常的に転写を誘導する。

² 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に歸属する

表 1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT6997 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA		
Intervening Sequence	3,250-3,252	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>L-Hsp70</i>	3,253-3,348	<i>Petunia hybrida</i> (ペチュニア) の熱ショック蛋白質 70 (HSP70) をコードする <i>hsp70</i> 遺伝子に由来する 5' 末端非翻訳領域 (Winter et al., 1988; Rensing and Maier, 1994)。遺伝子発現の制御に参与する。
Intervening Sequence	3,349-3,354	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>CS-bar</i>	3,355-3,906	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Thompson et al., 1987) を含む配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。
Intervening Sequence	3,907-3,911	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>T-nos</i>	3,912-4,164	<i>A. tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (nos) 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	4,165-4,183	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	4,184-4,625	<i>A. tumefaciens</i> 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
プラスミド外側骨格配列 (本組換えワタには存在しない)		
Intervening Sequence	4,626-4,711	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注7} - <i>ori V</i>	4,712-5,108	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	5,109-6,616	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>CS-rop</i>	6,617-6,808	ColE1 プラスミドに由来する Repressor of primer (rop) のコード配列で <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	6,809-7,235	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori-pBR322</i>	7,236-7,824	pBR322 由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。

表 1 本組換えワタの作出に用いた PV-GHHT6997 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
プラスミド外側骨格配列(本組換えワタには存在しない)		
Intervening Sequence	7,825-8,354	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	8,355-9,243	トランスポゾン Tn7 由来の 3'' (9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター及びコード配列並びに 3' 末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	9,244-9,379	DNA クローニングの際に利用された配列。

注¹B - Border (境界配列)

注²P - Promoter (プロモーター)

注³L - Leader (リーダー配列)

注⁴TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注⁵CS - Coding Sequence (コード配列)

注⁶T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注⁷OR - Origin of Replication (複製開始領域)

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

5

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

本組換えワタは、*S. maltophilia* 由来の改変 *dmo* 遺伝子が導入されており、改変 MON88701 DMO 蛋白質を発現している。改変 MON88701 DMO 蛋白質は、
10 本組換えワタに除草剤ジカンバ耐性を付与している。*S. maltophilia* は湿潤環境や土壌及び植物に偏在するグラム陰性細菌であり (Denton and Kerr, 1998)、DI-6株は土壌より単離された (Krueger et al., 1989)。

DMO 蛋白質はジカンバから除草活性のない DCSPA (3, 6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) への脱メチル反応を触媒する酵素で (Chakraborty et al., 2005)、この働きにより植物にジカンバ耐性を付与する (図 2, p15)。実際に、改変 *dmo* 遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ並びにタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。

20

DMO 蛋白質は Rieske 型非ヘム鉄オキシゲナーゼ (Rieske-type non-heme iron oxygenase) の一種であり、還元酵素、フェレドキシンとともに三成分酸化還元系を構成する。これら 3 つの蛋白質は他の多くのオキシゲナーゼと同様に酸化還元系において共役的に働き、ニコチンアミド・アデニン・ジヌクレオチド (NADH) から酸素へ電子を運び、電子アクセプター基質 (この場合は除草剤ジカンバ) の脱メチル反応を触媒する (Chakraborty et al., 2005)。この酸化還元系を図 2 (p15) に示した。

25

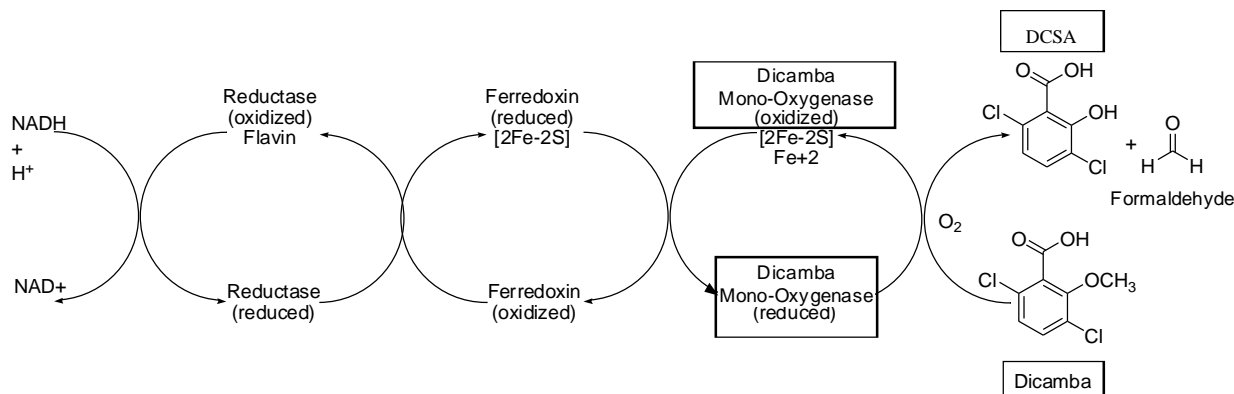


図 2 DMO 蛋白質の三成分酸化還元系³

図は NADH から DMO 蛋白質までの電子伝達系であり、ジカンバの脱メチル反応により DCSA が生成される

DMO 蛋白質の結晶構造は、C 末端側にヒスチジntag が付加された DMO 蛋白質⁴を用いて解析されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

DMO 蛋白質の結晶構造は 3 つの DMO 蛋白質の単量体からなる三量体であることが明らかとなっている (図 3, p16)。それぞれの単量体は Rieske [2Fe-2S] クラスタを含む Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと非ヘム鉄センターを含む非ヘム鉄センタードメインを有している (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。これらのドメインは全ての Rieske 型モノオキシゲナーゼに共通して存在し、電子伝達に参与する主要なドメインであることが知られている (Ferraro et al., 2005)。

NADH から運ばれた電子は、内在性の還元酵素とフェレドキシンを介して末端 DMO 蛋白質へ伝達される (図 2, p15)。この電子が酸素を還元的に活性化し、ジカンバの脱メチル反応を触媒する。電子輸送は隣接する単量体の間で起こるため、DMO 蛋白質は単量体同士の間隔と配置が正しくなるよう三量体を形成する必要がある (D'Ordine et al., 2009)。単量体内では Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと非ヘム鉄センタードメインの距離が離れているため、電子伝達が起こらない (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

³本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

⁴結晶構造解析に供試された DMO 蛋白質は、C 末端側にヒスチジntag が付加されていること、及びクローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したために N 末端側から 2 番目の位置にアラニンが挿入されていることを除けば、野生型 DMO 蛋白質と同じ配列である。

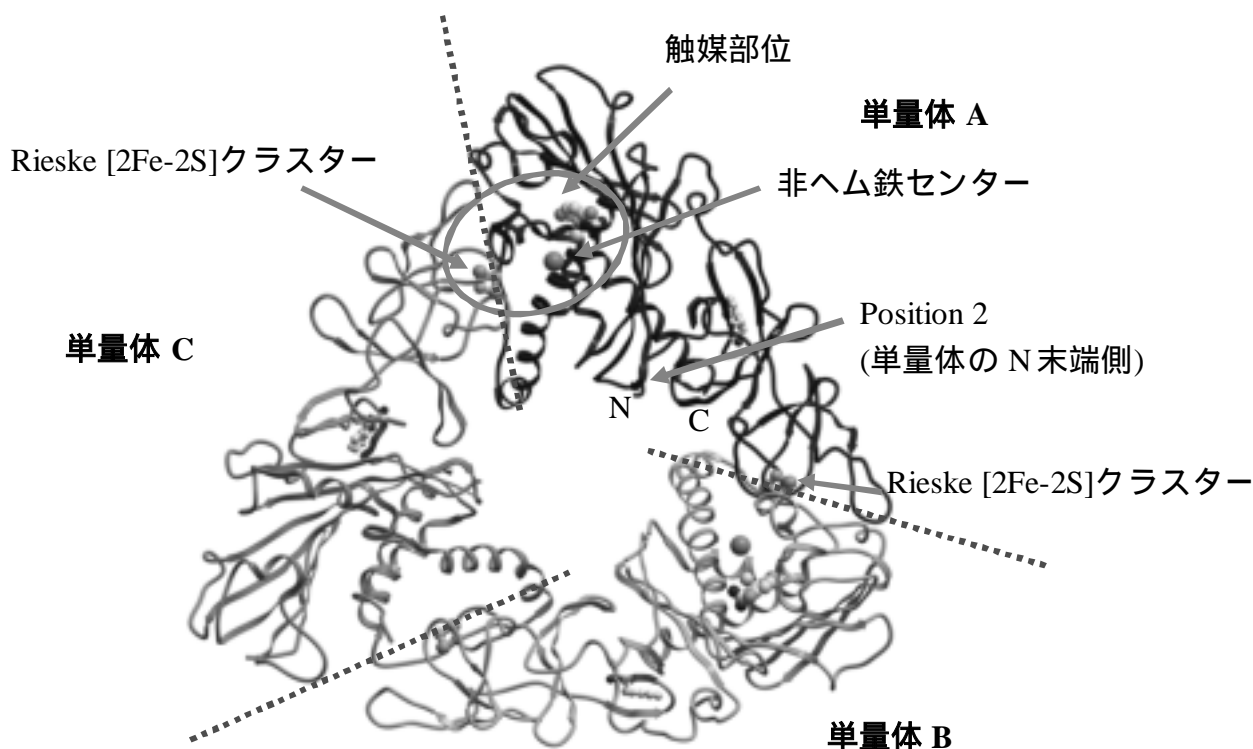


図 3 DMO 蛋白質の結晶構造⁵

- 5 DMO 蛋白質の結晶構造かつ活性型である三量体の模式図 (D'Ordine et al., 2009)。非ヘム鉄センターを含む非ヘム鉄センタードメイン、N 末端と C 末端、Rieske [2Fe-2S] クラスタを含む Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインなどの特徴的な構造を単量体 A に記した。単量体 A と単量体 C が形成する触媒部位は青い丸で囲っている。また、単量体 C の Rieske [2Fe-2S] クラスタも矢印で記した。電子移動は隣接する単量体間で起こるため、単量体 C の Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインと単量体 A の非ヘム鉄センタードメインとの間で電子移動が起こる。赤い点線は、隣接している非ヘム鉄センタードメインと Rieske [2Fe-2S] クラスタドメインのサブユニット間で電子移動が起こる接合部分を表しており、単量体同士の境界線上を示している。なお、結晶構造解析に供試された DMO 蛋白質は、野生型 DMO 蛋白質や改変 MON88701 DMO 蛋白質ではなく、C 末端側にヒスチジンタグが付加されており、N 末端側から 2 番目の位置にアラニンが挿入されている (アミノ酸配列の改変については図 4, p20 を参照)。
- 10
- 15

⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

前述 (p12) したように、本組換えワタが除草剤ジカンバに対して耐性を持つためには、本組換えワタ内で発現する改変 MON88701 DMO 蛋白質が本組換えワタ内で三量体を形成する必要がある。本組換えワタが除草剤ジカンバに対する耐性を持つこと、及び大腸菌から産生・精製された改変 MON
5 88701 DMO 蛋白質にジカンバに対する脱メチル化酵素活性が確認されていること (別添資料 4 の Figure 2, p8) から、本組換えワタ内においても改変 MON88701_DMO 蛋白質の三量体が形成され、機能していると考えられた。

改変 MON88701 DMO 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するかどうか、AD_2013⁶を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知アレルゲンと類似性は認められ
10 なかった。

【PAT 蛋白質】

15 本組換えワタには、*S. hygroscopicus* 由来の *bar* 遺伝子が導入されており、PAT 蛋白質を発現する。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Thompson et al., 1987)。

20 グルホシネートは、グルタミン合成酵素と結合することにより除草活性を発揮する。グルタミン合成酵素は光呼吸により生成されたアンモニアを植物に同化させる主要酵素である。グルホシネートがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が阻害されて、植物体内にアンモニアの毒性が蓄積し、枯死する (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986)。

25 本組換えワタから産生される PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素の働きでアセチル化されると、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートとなる。*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素と結合できないため、光呼吸を阻害せず、アンモニア蓄積が回避される。本組換えワタは、PAT 蛋白質
30 の産生により、除草剤グルホシネートが散布されても植物は枯死しない。

PAT 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するかど

⁶ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2013) に登録されている配列からなるデータベースで、2013年1月の時点で、1,630件のアミノ酸配列が含まれる。

うか AD_2013⁷を用いて、FASTA 型アルゴリズムと連続する 8 つのアミノ酸によって比較したが、既知アレルゲンと類似性は認められなかった。

宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

5

改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかを検討した。

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

10

一般的に酵素の基質特異性は、酵素触媒反応に必要な構造の有無によって定まる。DMO 蛋白質のジカンバへの特異性は触媒部位で起こる特定の相互作用によるものである (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO 蛋白質によるジカンバの代謝の結晶構造解析の結果によると、ジカンバのカルボキシル基と塩素原子が DMO 蛋白質の触媒部位に位置するアミノ酸と作用する (Dumitru et al., 2009)。カルボキシル基は DMO 蛋白質の触媒部位において、アミノ酸と 6 つの水素結合を形成している。この水素結合は、酵素と基質の結合に重要な役割を果たしている。一方、塩素原子は基質を正しい位置に安定させる役割を持つ。これらの相互作用は DMO 蛋白質結晶解析において DMO 蛋白質の触媒部位にジカンバが存在するときに確認されている。したがって、ジカンバのベンゼン環だけでなく、これらの化学基も、触媒作用に必要な基質の正しい配置に非常に重要な役割を果たすことが示されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。なお、D'Ordine et al. (2009) 及び Dumitru et al. (2009) によって解析された DMO 蛋白質は、野生型 DMO 蛋白質の N 末端側から 2 番目にアラニンが挿入され、C 末端側にヒスチジンタグが付加されたものである (以下、「C 末端 his-DMO 蛋白質」とする。) (図 4, p20)。

上述の DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究から、構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) は DMO 蛋白質の基質となる可能性がある。改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性の確認のため、米国において、1) 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)、及び 2) ワタ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B) を行った。

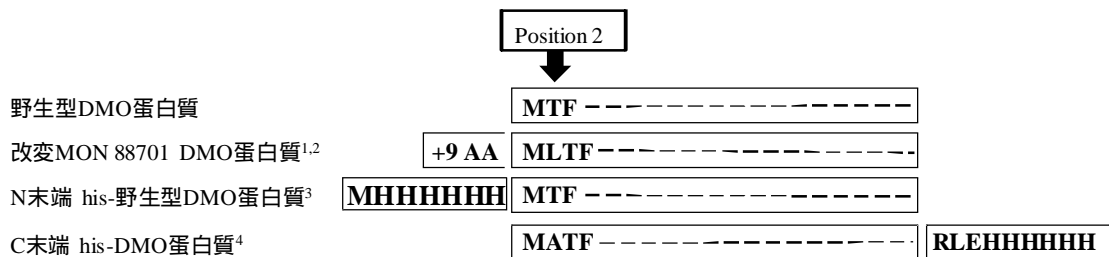
⁷ FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2013) に登録されている配列からなるデータベースで、2013年1月の時点で、1,630件のアミノ酸配列が含まれる。

なお、試験ごとに供試材料が異なることから、まず以下の I で供試材料について記述した。次に II では試験結果の概要について記載し、III では改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性、及び改変 MON88701 DMO 蛋白質が発現することにより宿主の持つ代謝系が変化するかどうかについて考察した。

5

I. 供試材料について

試験 A (*in vivo*) には本組換えワタと対照の非組換えワタ Coker130 を供試した。
 5 試験 B (*in vitro*) に供試した DMO 蛋白質 (以下、「N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質」とする。) は、*S. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO 蛋白質の N 末端側にヒスチジントグが付加されたものである (図 4, p20)。したがって、*in vitro* の試験に供試した DMO 蛋白質と、本組換えワタ中で発現している改変 DMO 蛋白質との違いは、ヒスチジントグの有無と、アミノ酸配列の N 末端側から 2 番目のロイシンの有無のみである (図 4, p20)。2 番目のアミノ酸やヒスチジントグの位置は DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れており、またヒスチジントグは一般的に蛋白質の構造には影響しないといわれていることから (Carson et al., 2007)、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の基質特異性や *in vitro* での試験結果には影響しないと考えられた。なお、試験 B には、基質特異性の解析に用いた DMO 蛋白質と同様の特異性を改変 MON88701 DMO 蛋白質が持つかを評価するために、大腸菌で産生・精製した改変 MON88701 DMO 蛋白質も供試した。



20

図 4 野生型 DMO 蛋白質、改変 MON88701 DMO 蛋白質、試験 A~B に供試した DMO 蛋白質におけるアミノ酸配列の比較⁸

25 この図は本評価書に記載した様々な DMO 蛋白質のアミノ酸配列を示している。
¹本組換えワタ中で発現している改変 MON88701 DMO 蛋白質は N 末端配列から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。また、N 末端側に CTP2 由来の 9 アミノ酸が結合している。
²試験 B に供試された改変 MON88701 DMO 蛋白質は大腸菌で産生・精製されたものである。
 30 ³試験 B に供試された N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質は大腸菌で産生・精製されたものである。
⁴C 末端 his-DMO 蛋白質は結晶構造の解析 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009) に供試された。

⁸本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

II. 試験の結果

II-1. 各種除草剤と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)

A. 各種除草剤散布試験 (*in vivo*)

5 本組換えワタ及び対照の非組換えワタ品種 Coker130 を供試し、作用機作の異なる 8 グループ 10 種の除草剤の散布試験を行った (表 2, p21)。米国の温室 (ミズーリ州) において栽培した発芽前又は 2 葉期~5 葉期のワタ各系統 10 個体に対し、各除草剤を 2 段階の散布薬量で散布し、散布後 20 日目から 22 日目の間に除草剤による薬害程度を調査して除草剤耐性を評価した。

10 その結果、本組換えワタは供試した除草剤 10 種のうち(表 2, p21)、除草剤ジカンバに対し強い耐性を示した (別添資料 2 の Table 2, p6)。それ以外の除草剤に対しては、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で除草剤による薬害程度に差は認められなかった。

表 2 本組換えワタに対する各種除草剤散布試験に供試した除草剤⁹

除草剤活性成分	除草剤の種類 (作用機作) ¹
ジカンバ	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-D	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
2,4-DB	フェノキシカルボン酸系 (人工オーキシシン)
アセトクロール	クロロアセトアミド系 (超長鎖脂肪酸合成阻害)
アトラジン	トリアジン系 (光化学系 II 阻害)
オキシフルオルフェン	ジフェニルエーテル系 (プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ阻害)
ハロスルフロン	スルホニルウレア系 (アセト乳酸合成酵素阻害)
トリフルラリン	ジニトロアニリン系 (紡錘体微小管形成阻害)
パラコート	ビピリジリウム系 (光化学系 I 電子転換)
グリホサート	グリシン系 (5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素阻害)

15 ¹HRAC (2011) より作成

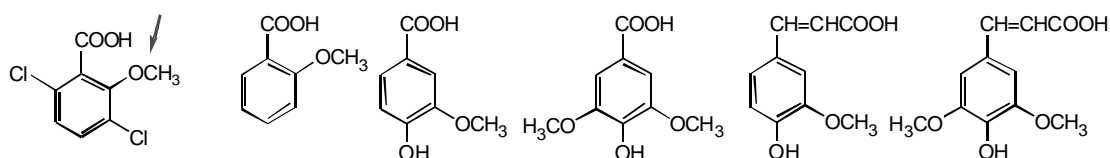
II-2. ワタ内在性化合物と DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B)

B. ワタ内在性化合物の DMO 蛋白質による代謝試験 (*in vitro*)

20 上述 (p18) したように、DMO 蛋白質の基質になり得る化合物は構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) のみであると考えられた。よって、ワタ内在性化合物のうち構造的にジカンバに類似し、かつメトキシ及びフェニルカルボキシル部分を有する化合物として特定することが

⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

できた 5 種 (*o*-アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸及びシナピン酸) を供試し、DMO 蛋白質による代謝試験を行った (別添資料 3 の Figure 1, p4; 図 5, p22)。



5 **ジカンバ *o*-アニス酸 バニリン酸 シリング酸 フェルラ酸 シナピン酸**

図 5 DMO 蛋白質を用いて *in vitro* で供試したジカンバ及び内在性化合物¹⁰
赤い矢印は DMO 蛋白質により取り除かれるメチル基を示す。

10 上記の内在性化合物をそれぞれ N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含む反応溶液と N 末端 his-野生型 DMO 蛋白質を含まない反応溶液に添加してインキュベートした後、反応溶液の LC/UV 分析及び LC/MS 分析を行い、DMO 蛋白質により、添加した化合物が減少するか、又は添加した化合物から他の化合物が生成されるかどうかを調査した。その結果、いずれの分析においてもジカンバは
15 減少したが 5 種の内在性化合物の減少は見られず、その他の化合物も検出されなかった (別添資料 3 の Figure 3~5, p10~12)。

 なお、大腸菌から産生・精製した改変 MON88701 DMO 蛋白質を、最もジカンバと構造的類似性を有する内在性化合物である *o*-アニス酸と反応させた。その結果、*o*-アニス酸は改変 MON88701 DMO 蛋白質により代謝されなかった (別
20 添資料 4 の Figure 3, p9)。

 以上の結果から、改変 MON88701 DMO 蛋白質がワタ内在性化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することはないと考えられた。

25 III. 改変 MON88701 DMO 蛋白質の基質特異性及び改変 MON88701 DMO 蛋白質の宿主の持つ代謝系への影響の考察

 以上の各種除草剤と改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 A)、及びワタ内在性化合物と DMO 蛋白質及び改変 MON88701 DMO 蛋白質との基質反応性試験 (試験 B) の結果から、改変 MON88701 DMO 蛋白質が除草剤
30 ジカンバ以外の化合物を代謝し、宿主であるワタの代謝系に何らかの影響を及

¹⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

ばす可能性は極めて低いと考えられた。

【PAT 蛋白質】

5

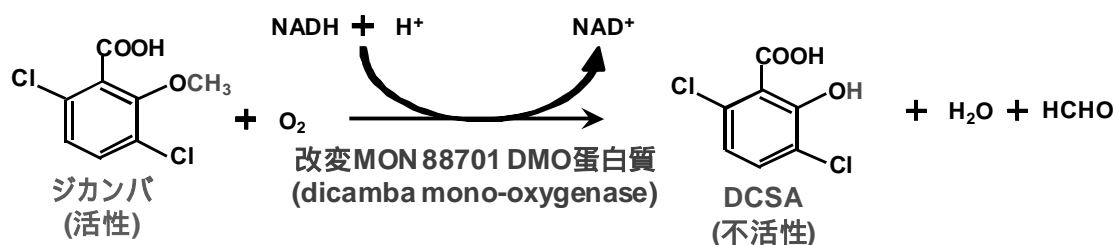
PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質が他の L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されることが競合アッセイにおいて示された。さらに、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。これらのことから PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

15

以上、それぞれの酵素反応が異なること、それぞれの基質の構造が全く異なることから、本組換えワタで発現している改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

20

<ジカンバ不活性化>



5 <グルホシネート不活性化>

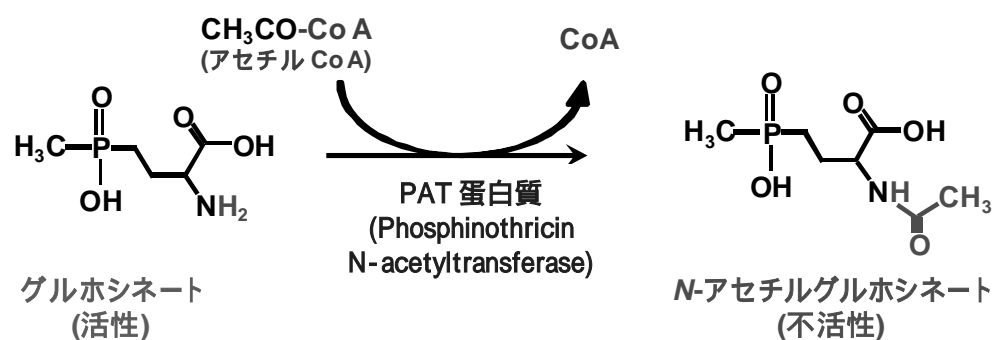


図 6 変更 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の基質と代謝物¹¹

10

(2) ベクターに関する情報

15 イ 名称及び由来

本組換えワタの作出に用いられたベクター PV-GHHT6997 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) などをもとに構築された。

¹¹ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

□ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

5

本組換えワタの作出に用いられた PV-GHHT6997 の全塩基数は 9,379bp である。

特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10

E. coli における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *E. coli* のトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

15

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

本ベクターの感染性は知られていない。

20

(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

25

宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素は表 1 (p11~13) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置と制限酵素による切断部位に関しては、図 1 (p10) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

30

プラスミド・ベクター PVGHHT6997 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって、非組換えワタ品種 Coker130 の胚軸に導入した。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜の方法

5 非組換えワタ品種 Coker130 の胚軸から採取した分裂組織とプラスミド・ベクターPV-GHHT6997 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、除草剤グルホシネートを含有する培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

10 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

カルベニシリン及びセフォタキシムを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。なお、本組換えワタにアグロバクテリウムが残存していないことは、カルベニシリン及びセフォタキシム無添加の培地に本組換えワタを移した後に、その培地上でアグロバクテリウムのコロニーが形成されていないことを観察することで確認した。

20 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

25 形質転換された再分化個体 (R0) に、除草剤ジカンバ (0.56 kg a.e.¹²/ha) 及び除草剤グルホシネート散布 (0.59 kg a.i.¹³/ha) を同時に行い、改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子を有する個体を選別した。その後、枯死しなかった R0 個体を自殖し、その後代である R1 世代において 1 コピーの T-DNA 領域 (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) をホモで有する個体を、TaqMan PCR 法を用いて選抜した。そして、優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に最終的に本組換えワタを選抜した。

30 本組換えワタの育成図を図 7 (p27) に示した。なお、本申請の対象は、R3 世代及び R3 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

¹² a.e.; acid equivalent (酸換算)。除草剤製剤は、有効成分を有効成分の塩の形か、有効成分そのものの形で含む。有効成分が塩の形で存在する場合、活性成分は酸であり、塩基部分は製剤によって異なる。除草剤の散布量として製剤中の有効成分の塩の量を示した場合、塩基部分が異なる製剤の間では正確な活性分量の比較ができないため、活性成分としての酸換算量を記載単位として用いた。

¹³ a.i.; active ingredient (有効成分の塩の量)。グルホシネート除草剤の場合は、異なる製剤においても塩基部分は同じであるため、有効成分の塩の量により活性分量が比較できる。

5

10

15

【社外秘につき非開示】

20

25

図 7 本組換えワタの育成図

(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

移入された核酸の複製物が存在する場所

5

本組換えワタの T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えワタの R1、BC1F1、BC1F2 世代において、T-DNA の分離比をカイ二乗検定で分析した。

試験に供試する 3 世代 (R1、BC1F1、BC1F2; 図 7, p27) を作出するために、
10 まず形質転換された再分化個体(R0)を自殖し、その後代である R1 世代において Real-Time TaqMan PCR 法により T-DNA の分離比を確認した。さらに R3 世代から T-DNA をホモで有する本組換えワタ 8 個体を、T-DNA を持たないワタ系統 DP0949 と交配して F1 世代を作出した。F1 世代から T-DNA をヘテロで有する 15 個体を End-Point TaqMan PCR 法により選抜し、DP0949 を交配して BC1F1 世代を作出した。BC1F1 世代において除草剤グルホシネート散布をすることで、T-DNA をヘテロで有する個体を選抜し、End-Point TaqMan PCR 法により確認した。BC1F1 世代から T-DNA をヘテロで有する 25 個体を自殖し、BC1F2 世代を作出した。BC1F2 世代において除草剤グルホシネート散布、End-Point TaqMan PCR 法により T-DNA の有無を確認した
15 分離比を用いて、カイ二乗検定を行った。
20

カイ二乗検定の結果、分析を行った 3 世代において実測値と期待値の間に統計学的有意差は認められなかった (表 3~表 4, p29; 別添資料 5 の Table1~2, p7)。したがって本組換えワタの T-DNA は染色体上に存在し、メンデルの分離法則に矛盾せずには遺伝していると考えられた。

表 3 本組換えワタの R1 及び BC1F2 世代における T-DNA の分離比¹⁴

世代	供試 個体数 ¹	実測値			1:2:1 の分離比の期待値				χ^2	p値 ⁴
		陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	陽性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数			
R1 ²	173	33	99	41	43.25	86.50	43.25	4.35	0.114	
BC1F2 ³	118	36	56	26	29.50	59.00	29.50	2.00	0.368	

¹ R1 世代の 173 個体は 1 個体の親世代、BC1F2 世代の 118 個体は 25 個体の親世代から得られた。

² 実測値は Real-Time TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

³ 実測値は End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

5 ⁴ 上記 2 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p \leq 0.05$)。

表 4 本組換えワタの BC1F1 世代における T-DNA の分離比¹⁵

世代	供試 個体数 ¹	実測値		1:1 の分離比の期待値			p 値 ³
		陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	陽性・ヘテロ 個体数	陰性・ホモ 個体数	χ^2	
BC1F1 ²	261	123	138	130.50	130.50	0.86	0.353

¹ BC1F1 世代の 261 個体は 15 個体の親世代から得られた。

10 ² 実測値は除草剤グルホシネート散布 (0.59 kg a.i./ha) 及び End-Point TaqMan PCR 法により、T-DNA (改変 *dmo* 遺伝子発現カセット及び *bar* 遺伝子発現カセット) の有無を確認。

³ BC1F1 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p \leq 0.05$)。

¹⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

¹⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えワタの核ゲノム中 1 ヲ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており(別添資料 6 の Figure 4~6, p37~39)、複数世代 (R2~R6 世代) にわたり安定して後代に遺伝していることを確認した (別添資料 7 の Figure 4, p24)。また、外側骨格は導入されていないことを確認した (別添資料 6 の Figure 7, p40)。

10

染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

1 コピーなので該当しない (別添資料 6 の Figure 4~6, p37~39)

15

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

20

本組換えワタの複数世代 (R2~R6 世代) においてウエスタンブロット分析を行い、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が安定して発現していることを確認した (別添資料 7 の Figure 5~6, p25~26)。

25

また、米国の 8 ヲ所 (アーカンソー州デシェイ郡、ジョージア州ティフト郡、カンザス州ポーニー郡、ルイジアナ州ラピッズ郡、ノースカロライナ州パーキマンス郡、ニューメキシコ州ドニャアナ郡、サウスカロライナ州バーンウェル郡及びテキサス州ヘイル郡) のほ場において 4 反復で生育した本組換えワタの葉 (over-season leaf; OSL-1~4)、根、花粉及び綿実のサンプルを採取し、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (表 5~表 6 p31~32; 別添資料 8)。その結果、本組換えワタの葉 (over-season leaf; OSL-1~4)、根、花粉及び綿実における改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現が確かめられた (表 5~表 6, p31~32; 別添資料 8 の Table 1~2, p19~20)。

30

表 5 本組換えワタの各組織における改変 MON88701 DMO 蛋白質の発現量 (2010 年、米国)¹⁶

組織 ¹	生育段階 ³	播種後日数 ²	平均値 (標準偏差) 範囲 (µg/g FW) ⁴	平均値 (標準偏差) 範囲 (µg/g DW) ⁵	検出限界/ 定量限界 ⁶ (µg/g FW)
葉 (OSL ⁸ -1)	2~4 葉期	14-25	27 (7.6) 13 – 42	180 (52) 110 – 280	0.168/0.313
葉 (OSL-2)	4~7葉期	25-37	41 (12) 19 – 65	240 (69) 110 – 380	0.168/0.313
葉 (OSL-3)	9葉期~開花期	35-99	52 (17) 24 – 97	240 (75) 91 – 410	0.168/0.313
葉 (OSL-4)	開花期~カットアウト ⁹	70-121	57 (18) 0.70 – 91	230 (59) 2.8 – 310	0.168/0.313
根	50%開花期~開花期	62-99	14 (3.7) 8.2 – 21	43 (12) 26 – 72	0.136/0.313
花粉 ⁷	50%開花期~開花期	68-99	14 (28) 0.31 – 110	NA (NA) NA	0.043/0.125
綿実	成熟期	148-183	20 (4.6) 8.2 – 29	21 (5.0) 8.9 – 33	0.059/0.313

¹米国の 8 カ所 (アーカンソー州デシェイ郡、ジョージア州ティフト郡、カンザス州ポーニー郡、ルイジアナ州ラピッズ郡、ノースカロライナ州パーキマンズ郡、ニューメキシコ州ドニャアナ郡、サウスカロライナ州バーンウェル郡及びテキサス州ヘイル郡) のほ場において 4 反復で生育した本組換えワタの葉 (over-season leaf; OSL-1~4)、根、花粉及び綿実のサンプルを採取し、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。

²脚注 1 に示した 8 カ所のほ場におけるサンプリング時の播種後日数の範囲を表している。

³各組織を採取した生育段階。Ritchie et al. (2007) に記載されている。

⁴蛋白質の発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1 g 当たりの µg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限及び上限) は全てのほ場のデータから計算されている。(サンプルの数 (n) は後述するサンプルを除き n=32 である。OSL-3 の葉は 1 つのサンプルで<LOD であったため n=31、OSL-1 及び 4 の葉は 1 カ所のほ場でサンプルが採取できなかったため n=28、花粉は 2 つのサンプルで<LOD であり、1 つのサンプルで判定不能であったため n=29 である。)

⁵蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの µg で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変換係数で除算して求めた。NA= Not Applicable (該当なし)。

⁶定量限界=limit of quantitation (LOQ); 検出限界=limit of detection (LOD)

⁷得られたサンプルが限られていたため、花粉の水分量を測定することができなかった。そのため花粉における発現量は新鮮重のみ示した。

⁸OSL= over-season leaf (葉)

⁹カットアウトは、一般的に開花期が過ぎた後で、養分の分配が花の成長からさくの成長に全て移行する時期を指す。目安は、一番上の花が上から 4~5 節のところに咲いている時期である。

¹⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

表 6 本組換えワタの各組織における PAT 蛋白質の発現量 (2010 年、米国)¹⁷

組織 ¹	生育段階 ³	播種後日数 ²	平均値 (標準偏差) 範囲 ($\mu\text{g/g FW}$) ⁴	平均値 (標準偏差) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ⁵	検出限界/ 定量限界 ⁶ ($\mu\text{g/g FW}$)
葉 (OSL ⁸ -1)	2~4 葉期	14-25	0.84 (0.21) 0.46 – 1.4	5.5 (1.5) 3.7 – 9.1	0.162/0.188
葉 (OSL-2)	4~7 葉期	25-37	1.1 (0.26) 0.68 – 1.6	6.4 (1.4) 3.8 – 9.4	0.162/0.188
葉 (OSL-3)	9 葉期~開花期	35-99	1.0 (0.34) 0.34 – 1.7	4.8 (2.0) 1.3 – 10	0.162/0.188
葉 (OSL-4)	開花期~カットアウト ⁹	70-121	0.78 (0.29) 0.42 – 1.7	3.2 (1.2) 2.0 – 6.7	0.162/0.188
根	50%開花期 ~開花期	62-99	0.56 (0.18) 0.27 – 0.89	1.8 (0.75) 0.93 – 3.3	0.096/0.188
花粉 ⁷	50%開花期~ 開花期	68-99	0.56 (0.24) 0.27 – 0.90	NA (NA) NA	0.021/0.188
綿実	成熟期	148-183	6.1 (0.95) 4.8 – 8.8	6.6 (1.1) 5.2 – 9.6	0.032/0.188

¹ 米国の 8 カ所 (アーカンソー州デシエー郡、ジョージア州ティフト郡、カンザス州ポーニー郡、ルイジアナ州ラビッツ郡、ノースカロライナ州パーキマンス郡、ニューメキシコ州ドニャアナ郡、サウスカロライナ州バーンウェル郡及びテキサス州ヘイル郡) のほ場において 4 反復で生育した本組換えワタの葉 (over-season leaf; OSL-1~4)、根、花粉及び綿実のサンプルを採取し、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した。

² 脚注 1 に示した 8 カ所のほ場におけるサンプリング時の播種後日数の範囲を表している。

³ 各組織を採取した生育段階。Ritchie et al. (2007) に記載されている。

⁴ 蛋白質の発現量は算術平均及び標準偏差 (括弧内に示す) で表されている。また、蛋白質の重量は組織の新鮮重 1 g 当たりの μg で表されている。各組織の平均値、標準偏差及び範囲 (下限及び上限) は全てのほ場のデータから計算されている。(サンプルの数 (n) は後述するサンプルを除き n=32 である。OSL-1 の葉は 1 カ所のほ場でサンプルが採取できなかったため n=28、OSL-4 の葉は 1 カ所のほ場でサンプルが採取できなかったため及び 1 つのサンプルで <LOD であったため n=27、OSL-3 の葉は 1 つのサンプルで <LOD であったため n=31、花粉は 26 のサンプルで <LOD であったため n=6 である。)

⁵ 蛋白質の重量は組織の乾燥重 1 g 当たりの μg で表されている。乾燥重は新鮮重を水分分析データより得た乾燥重変換係数で除算して求めた。NA= Not Applicable (該当なし)。

⁶ 定量限界=limit of quantitation (LOQ); 検出限界=limit of detection (LOD)

⁷ 得られたサンプルが限られていたため、花粉の水分量を測定することができなかった。そのため花粉における発現量は新鮮重のみ示した。

⁸ OSL= over-season leaf (葉)

⁹ カットアウトは、一般的に開花期が過ぎた後で、養分の分配が花の成長からさくの成長に全て移行する時期を指す。目安は、一番上の花が上から 4~5 節のところに咲いている時期である。

¹⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

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

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

10

本組換えワタは、本組換えワタに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、End-Point TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である(別添資料 9)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10 ng であることが推奨されており、種子 1 粒を用いて検定できる。

15

本法の再現精度については 90 粒の本組換えワタ及び 89 粒の非組換えワタを用いて確認試験を行った(別添資料 9 の p6)。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20

移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

25

本組換えワタへ導入された改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子は改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質を発現することにより、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

30

従来のワタでは、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの散布は播種前における雑草茎葉処理に限られていた。しかし、本組換えワタは除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対して抵抗性を持つため、ジカンバ及びグルホシネートの散布適期幅が広がった。ジカンバにおいては播種後から発芽までの雑草茎葉処理に加え、発芽後から収穫7日前までの生育期における処理が可能となり、グルホシネートにおいては、播種後から発芽までの雑草茎葉処理に加え、発芽後から開花初期までの生育期における処理が可能となる。なお、本組換えワタが商品化された際に予定されている本組換えワタに対する除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの使用体系を表 7 (p34) に示した。

35

表 7 本組換えワタに対する除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートの使用体系¹⁸

	散布時期				
	発芽前処理	茎葉処理			
		4 節	8 節	12 節	収穫 7 日前
最大使用体系 ¹	1.12 kg a.e./ha ³ ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.89 kg a.i./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.59 kg a.i./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ; 0.59 kg a.i./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ
通常の雑草種に 対する 推奨使用体系	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.59 kg a.i./ha グルホシネート	散布しない	散布しない
難防除雑草種に 対する 推奨使用体系 ²	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.56 kg a.e./ha ジカンバ	0.59 kg a.i./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ 又は 0.59 kg a.i./ha グルホシネート	0.56 kg a.e./ha ジカンバ

¹ 生育段階ごとの最高使用薬量を示した。栽培期間中におけるジカンバの総使用量の上限は 2.24 kg a.e./ha、グルホシネートは 1.79 kg a.i./ha である。

² 雑草の発生時期が遅い場合を含む。

¹⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

除草剤ジカンバは 95 種以上の一年生及び二年生雑草を効果的に防除し、100 種を超える多年生の広葉及び木本の植物種の生育を抑制する。除草剤グルホシネートは、約 120 種の広葉及びイネ科雑草を防除する広域接触型非選択的除草剤である。また、除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートはブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*)、ヒメムカシヨモギ (*Conyza canadensis*) やオオホナガアオゲイトウ (*Amaranthus palmeri*) など除草剤グリホサートに抵抗性を持つ雑草も防除することができる。

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

現在、わが国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。また、これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

2012 年に日本モンサント株式会社河内研究農場の隔離ほ場 (以下、「本隔離ほ場」とする。) において本組換えワタの隔離ほ場試験を行った。試験には本組換えワタの R5 世代を供試した (図 7, p27)。対照の非組換えワタとしては、本組換えワタの遺伝子導入母本である Coker130 を用いた。なお、生育初期における低温耐性試験 (第一の 2-(6)-b, p36) は 2010 年に米国の人工気象室で実施した。

a 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性を評価するため、9項目 (開花始め、地上部の乾燥重、葉形、開じょ前のさくの形状、成熟期、主茎長、主茎節数、繊維 (綿毛) の色、種皮の色) について評価を行った。

統計処理を地上部の乾燥重、主茎長及び主茎節数に行い、開花始め、葉形、開じょ前のさくの形状、成熟期、繊維 (綿毛) の色、種皮の色に関しては統計処理を行わなかった。

その結果、統計処理を行った項目において本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった。統計処理を行わなかった項目においては、開花始めにおいて本組換えワタと対照の非組換えワタとの

間に違いが認められた (別添資料 10の表 3, p13)。

開花始めは、本組換えワタが7月28日、対照の非組換えワタが7月31日であった (別添資料 10の表 3, p13)。

5

b 生育初期における低温耐性

10 生育初期における低温耐性試験は、米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。播種後 20 日目の本組換えワタ、対照の非組換えワタ Coker130 及び従来商業品種 4 品種の幼苗を日中 15°C/夜間 10°C で 12 日間生育したのち、生育ステージ、草勢、草丈、新鮮重及び乾燥重について比較した。

15 その結果、統計処理を行わなかった項目 (生育ステージ及び草勢) については、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間の差異は小さく、低温に対する生育応答としては同程度であった (別添資料 11 の Table 2, p6)。その一方で、統計処理を行った項目 (草丈、新鮮重及び乾燥重) のうち、新鮮重及び乾燥重において本組換えワタと対照の非組換えワタの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 11 の Table 2, p6)。

20 新鮮重の平均値は、本組換えワタが 18.5 g、対照の非組換えワタが 21.0 g であり、本組換えワタのほうが低かった (別添資料 11 の Table 2, p6)。また、乾燥重の平均値も、本組換えワタが 3.6 g、対照の非組換えワタが 4.4 g であり、本組換えワタのほうが低かった (別添資料 11 の Table 2, p6)。

c 成体の越冬性

5 本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタを成熟期の後
も引き続き生育させ、わが国の冬季における生育状況を観察した。2013年1
月9日に越冬性試験区において栽培された個体を観察した結果、本組換えワ
タ及び対照の非組換えワタのいずれも枯死していた(別添資料10の図8, p16)。

d 花粉の稔性及びサイズ

10

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタから採取した
花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性及びサイズを測定した。これら
の項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性及びサイズのいずれにお
いても本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認めら
15 れなかった(別添資料10の図9及び表4, p17)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

生産量：

20

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタについて、種
子の生産量に関する項目(1個体当たりのさく数、さく当りの種子数、さく
当たりの種子重及び100粒重)を調査した。これらの項目について統計処理
を行った結果、100粒重において、本組換えワタと対照の非組換えワタとの
間に統計学的有意差が認められた(別添資料10の表5, p18)。100粒重の平均
25 値は、本組換えワタが8.05g、対照の非組換えワタ8.79gであり、本組換え
ワタのほうが低かった(別添資料10の表5, p18)。

脱粒性：

30

本組換えワタ及び対照の非組換えワタのいずれも、収穫時の種子はともに
繊維に絡み合って分離しにくく、自然条件下での脱粒は確認されなかった。

休眠性及び発芽率：

本隔離ほ場で生育した本組換えワタ及び対照の非組換えワタの収穫種子を
5 発芽試験に用いるため、種子から手で出来るだけ綿毛を取り除いた後、表面
に残っている短い繊維（リンター）を硫酸で取り除き、乾燥後に常温保存した。
その後、水で湿らせた発芽シート上に種子を並べて置き、発芽シートをロー
10 ル状に巻いて、25°C に設定した恒温器内で 10 日間保管した。10 日後に発芽
種子数を数えた。

その結果、本組換えワタと対照の非組換えワタの発芽率はいずれも高かつ
10 た（別添資料 10 の表 6, p19）。

f 交雑率

日本には本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属
15 の近縁野生種は生育していないため、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

本組換えワタから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生され
20 ていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験
を行った。その結果、土壤微生物相試験の糸状菌数において統計学的有意差
が認められた。糸状菌数は、本組換えワタ区が 1.4×10^6 CFU/g、対照の非組
換えワタ区が 1.6×10^6 CFU/g であり、本組換えワタ区の方が少なかった（別
添資料 10 の表 7, p20）。しかしながら、本組換えワタ区の糸状菌数の範囲
25 (1.2×10^6 CFU/g ~ 1.6×10^6 CFU/g) は、対照の非組換えワタ区の糸状菌数の範
圍 (1.1×10^6 CFU/g ~ 1.9×10^6 CFU/g) に収まっていた（別添資料 10 の表 7,
p20）。

30

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

5

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

10

-

(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

15

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

20

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

25

-

(6) 国外における使用等に関する情報

30

本組換えワタの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は以下のとおりである (表 8, p40)。

表 8 本組換えワタの海外における申請予定¹⁹

5

2013年5月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2012年4月	2013年4月 安全性確認
米国農務省 (USDA)	環境	2012年7月	審査中
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2012年6月	審査中
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2012年6月	審査中
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2013年1月	審査中
欧州食品安全機関 (EFSA)	食品・飼料	2013年2月	審査中
韓国食品医薬品庁 (KFDA)	食品	2012年10月	審査中
韓国農村振興庁 (RDA)	環境	2012年10月	審査中
中国農業部 (MOA)	環境・食品・飼料	■■■■ ²⁰	■■■■ ²⁰

なお、本組換えワタのわが国における申請状況は以下のとおりである (表 9, p40)。

10 表 9 本組換えワタのわが国における申請及び認可状況²¹

2013年5月現在

機関	内容	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²²	■■■■ ²⁰	■■■■ ²⁰
農林水産省	飼料 ²³	■■■■ ²⁰	■■■■ ²⁰
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 ²⁴ : 隔離ほ場)	2011年9月	2012年3月
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程 : 一般使用)	2013年5月	

¹⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

²⁰ 社外秘につき非開示

²¹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する

²² 食品衛生法に基づく。

²³ 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。

²⁴ 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律に基づく。

第二 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

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

10 現在、わが国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。また、これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

15 競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国の隔離ほ場において調査した(第一の 2-(6)-a, c~e, p35~37)。その結果、形態及び生育の特性に関する項目において、統計処理を行わなかった開花始めにおいて本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に違いが認められた。また、種子の生産量における 100 粒重において、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた。一方、生育初期における低温耐性(第一の 2-(6)-b, p36)を米国において調査した結果、新鮮重及び乾燥重において本組換えワタと対照の非組換えワタの間に統計学的有意差が認められ、統計処理を行わなかった項目については同程度であった。

25 開花始めは、本組換えワタが 7 月 28 日、対照の非組換えワタが 7 月 31 日であり、本組換えワタの開花始めが対照の非組換えワタと比べて 3 日早かった。しかし、その違いの程度は小さく、加えて、本組換えワタ及び対照の非組換えワタの開花始めの幅はそれぞれ 7 日間あり、その内 6 日間が重複していたことから(本組換えワタ: 7/26~8/1、非組換えワタ: 7/27~8/2)、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で開花特性が大きく異なっていることはないと考えられた。よって、本試験で認められた開花始めの違いが本組換えワタの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

35 100 粒重の平均値は、本組換えワタが 8.05 g、対照の非組換えワタが 8.79 g であり、本組換えワタのほうが低かった。しかし、本組換えワタの 100 粒重の平均値(8.05 g)は、これまでに文献で報告されている従来ワタの 100 粒重の平均値の範囲(約 5.54 g ~ 9.98 g)(Kunze et al., 1969)に収まっていることから、本試験で認められた 100 粒重の違いが本組換えワタの競合における優位性を高める

ものではないと考えられた。

5 生育初期における低温耐性試験での新鮮重及び乾燥重の平均値は、本組換えワタが 18.5 g 及び 3.6 g、対照の非組換えワタが 21.0 g 及び 4.4 g であり、いずれも本組換えワタのほうが対照の非組換えワタと比べて低かった。また、本組換えワタの新鮮重及び乾燥重の平均値は、本試験において同時に栽培した 4 種類の商業品種の平均値の範囲内(新鮮重：16.0~19.8 g；乾燥重：3.3~4.1 g) に収まっていたことから、これらの違いが本組換えワタの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

10 本組換えワタは除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに対する耐性を有するが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが本組換えワタの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

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

(2) 影響の具体的内容の評価

20

(3) 影響の生じやすさの評価

25 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えワタは、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

30

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

35 本組換えワタには既存のワタと同様に、哺乳動物に対して毒性を示すゴシポール及び鶏卵の変色及びふ化率の低下などを起こすシクロプロペン脂肪酸が含

まれている。しかし、現在、わが国ではワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。さらに、ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。したがって、野生動物等がワタを食害する可能性は極めて低い。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を来すような有害物質を産生するという報告はない。

本組換えワタ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変MON88701 DMO蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質が発現しているが、DMO蛋白質及びPAT蛋白質は有害物質としては知られていない。また、両蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認された(第一の2-(1)-ロ- , p17~17)。

第一の2-(1)-ロ- (p18~24) に示したように、改変MON88701 DMO蛋白質はジカンバに対し基質特異性を有し、ジカンバと構造的に類似するワタ内在性化合物を基質とすることがないため、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生することはないと考えられた。同様に、PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難く (Thompson et al., 1987)、宿主の代謝系に影響し、新たに有害物質を産生することはないと考えられた。また、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸の含量にも変化を及ぼすことも考えにくい。したがって、改変MON88701 DMO蛋白質及びPAT蛋白質が原因で、本組換えワタ中に新たな有害物質が産生されることやゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸の含量にも影響を及ぼすことはないと考えられた。

実際に、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験 (第一の 2-(6)- -g, p38) により比較検討した。その結果、土壤微生物相試験の糸状菌数において統計学的有意差が認められたが、それ以外の有害物質の産生性における項目で、本組換えワタ区と対照の非組換えワタ区との間に統計学的有意差は認められなかった。糸状菌数は、本組換えワタ区が 1.4×10^6 CFU/g、対照の非組換えワタ区が 1.6×10^6 CFU/g であり、本組換えワタ区の方が少なかった。しかし、本組換えワタ区の糸状菌数の範囲 (1.2×10^6 CFU/g ~ 1.6×10^6 CFU/g) は、対照の非組換えワタ区の糸状菌数の範囲 (1.1×10^6 CFU/g ~ 1.9×10^6 CFU/g) に収まっていた。したがって、本組換えワタの有害物質の産生性は、対照の非組換えワタと同程度であると考えられた。

5 なお、本組換えワタに除草剤ジカンバを散布した際には、図 2 (p15) に示したように改変 MON88701 DMO 蛋白質の作用によって除草剤ジカンバの脱メチル反応が触媒され、3,6-DCSA とホルムアルデヒドと水が産生される。DCSA は
10 EPA による除草剤ジカンバの RED²⁵ (Reregistration Eligibility Decision、農薬再登録確認書) のリスク評価過程において安全性が既に評価されており (EPA, 2009)、またその毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている (FAO/WHO, 2011)。また、ホルムアルデヒドは粘膜に対し刺激性のある有害物質として知られているが (IPCS, 1989)、ホルムアルデヒドは環境中
15 に広く存在し、土壌若しくは水中では微生物によって迅速に分解され、大気中においては酸化的光分解で分解されるため、環境中には蓄積しないと考えられる。DCSA とホルムアルデヒドの安全性については、2012 年 6 月 29 日に既に除草剤ジカンバ耐性ダイズが審議された生物多様性影響評価検討会総合検討会で評価されている。なお、本組換えワタの第一種使用等の内容には国内における栽培が含まれていない。よって、国内で本組換えワタに対して除草剤ジカンバが散布されることもなく、また除草剤ジカンバの代謝産物が産生されることもない。

20 以上のことから、有害物質の産生性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

25 -

(3) 影響の生じやすさの評価

30 -

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

 以上のことから、本組換えワタは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

²⁵ 農薬再登録確認書：EPAは連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法 (FIFRA) のもと、1984年11月以前に登録された農薬について安全性の再評価を続けている。再評価された後に農薬再登録確認書が発行される。

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

5 わが国では本組換えワタが属する *G. hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* 属の近縁野生種は自生していない。よって、交雑性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

10

-

(3) 影響の生じやすさの評価

15

-

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

20 以上のことから、本組換えワタは、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

4 その他の性質

25

-

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

- 5 これまでにわが国に搾油用又は飼料用として輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

10 本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を、わが国での隔離ほ場試験において比較検討した。その結果、種子の生産量における 100 粒重において、本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた。統計処理を行わなかった項目においては、開花始めにおいて本組換えワタと対照の非組換えワタとの間に違いが認められた。また、生育初期における低温耐性を米国において調査した結果、新鮮重及び乾燥重において本組換えワタと対照の非組換えワタの間に統計学的有意差が認められ、統計処理を行わなかった項目については同程度であった。

15 検討の結果、開花始めについては、本組換えワタの開花始めが対照の非組換えワタと比べて 3 日早かったが、開花始めの 3 日の差によって本組換えワタの競合における優位性が高まることはないと考えられた。100 粒重については、本組換えワタの 100 粒重の平均値がこれまでに文献で報告されている従来ワタの 100 粒重の平均値の範囲に収まっていることから、この差が本組換えワタの競合における優位性を高めるものではないと判断された。また、生育初期における低温耐性試験での新鮮重及び乾燥重については、いずれも本組換えワタの
25 平均値が対照の非組換えワタと比べて低かったこと、また、本試験において同時に栽培した 4 種類の商業品種の平均値の範囲内に収まっていたことから、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を上回るものではないと考えられた。よって、前述した項目において認められた有意差及び
30 違いにより、本組換えワタの競合における優位性が高まることはないと考えられた。

本組換えワタは改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質の発現により除草剤ジカンバ及び除草剤グルホシネートに高い耐性を有するが、除草剤散布が想定されにくい自然条件下において除草剤耐性であることが本組換えワタの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

- 35 したがって、本組換えワタは競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

有害物質の産生性：

本組換えワタには既存のワタと同様に、哺乳動物に対して毒性を示すゴシポール及び鶏卵の変色及びふ化率の低下などを起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、現在、わが国ではワタの商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。さらに、ワタがわが国で自生化したという報告はされていない。したがって、野生動物等がワタを食害する可能性は極めて低い。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を来すような有害物質を産生するという報告はない。

10 本組換えワタと対照の非組換えワタとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結果、土壌微生物相試験の糸状菌数において、本組換えワタ区と対照の非組換えワタ区との間で統計学的有意差が認められた。

15 検討の結果、糸状菌数については、本組換えワタ区の糸状菌数の範囲が、対照の非組換えワタ区の糸状菌数の範囲に収まっていた。したがって、本組換えワタの有害物質の産生性は、対照の非組換えワタと同程度であると考えられた。

本組換えワタ中では除草剤ジカンバ耐性を付与する改変 MON88701 DMO 蛋白質及び除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT 蛋白質が発現しているが、両蛋白質は既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことが確認されている。また、改変 MON88701 DMO 蛋白質はジカンバに対し高い基質特異性を有し、PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有しているため、改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質が宿主の代謝系に作用して新たな有害物質を産生するとは考えにくく、同様に既存の有害物質であるゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸の含量へ影響があるとは考えにくい。

25 本組換えワタに対し除草剤ジカンバを散布した際には、改変 MON88701 DMO 蛋白質によって除草剤ジカンバが分解され、ホルムアルデヒドと DCSA が生じる。ホルムアルデヒドは植物において日常的に産生されている物質である。DCSA は EPA による除草剤ジカンバの RED のリスク評価過程において安全性が既に評価されており、またその毒性はジカンバと同等かそれより低いことが FAO/WHO JMPR で認められている。よって、改変 MON88701 DMO 蛋白質と除草剤ジカンバの反応により産生される DCSA とホルムアルデヒドのいずれも、野生動植物等に影響を与えるとは考えにくい。DCSA とホルムアルデヒドの安全性については、2012 年 6 月 29 日に既に除草剤ジカンバ耐性ダイズが審議された生物多様性影響評価検討会総合検討会で評価されている。なお、本組換えワタの第一種使用の内容には国内における栽培が含まれていない。よって、国内で本組換えワタに対して除草剤ジカンバが散布されることもなく、ま

た、除草剤ジカンバの代謝産物が産生することもない。

したがって、本組換えワタは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

5 交雑性：

わが国では本組換えワタが属する *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。したがって、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のあるわが国在来の野生動植物等は特定されなかった。このことから、本組換えワタは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10

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、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

15

参考文献

- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Brubaker, C.L., F.M. Bourland and J.F. Wendel. 1999. The origin and domestication of cotton. Pages 3-31 in *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- Carson, M., D.H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette and L.J. DeLucas. 2007. His-tag impact on structure. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 63: 295-301.
- Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
- D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
- Denton, M. and K.G. Kerr. 1998. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews* 11: 57-80.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.

Ferraro, D.J., L. Gakhar and S. Ramaswamy. 2005. Rieske business: Structure-function of Rieske non-heme oxygenases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338: 175-190.

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

Fraleley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

Fryxell, P.A. 1984. Taxonomy and germplasm resources. Pages 27-57 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.

Harris, W.D. 1981. Cottonseed. Pages 375-391 in *Encyclopedia of Chemical Processing and Design*. Volume 12. J.J. McKetta and W.A. Cunningham (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

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

HRAC. 2011. Classification of herbicides according to site of action. Herbicide Resistance Action Committee.
<http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideSiteofAction.aspx>
[Accessed May 27, 2011].

Jenkins, J.N. 2003. Cotton. Pages 61-70 in *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. *Plant Molecular Biology* 30: 297-306.

Kakani, A., S. Saha, V.T. Sapra, A. Zipf and D.M. Stelly. 1999. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene(s) in *Gossypium*. *Crop Science* 39: 668-673.

Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.

Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium* L. Pages 139-150 in *Plant Resources of South-East Asia No 17: Fibre Plants*. M. Brink and R.P. Escobin (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Krueger, J.P., R.G. Butz, Y.H. Atallah and D.J. Cork. 1989. Isolation and identification of microorganisms for the degradation of dicamba. *Journal of Agricultural and Food*

Chemistry 37: 534-538.

Kunze, O.R., L.H. Wilkes and G.A. Niles. 1969. Field emergence and growth response related to the physical characteristics of cottonseed. Transactions of the ASAE 12: 608-613.

Lee, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Pages 1-25 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Llewellyn, D. and G. Fitt. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. Molecular Breeding 2: 157-166.

Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. Biochemical and Biophysical Research Communications 244: 440-444.

Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. Journal of Plant Physiology 123: 135-142.

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

NCPA. 1993. Cottonseed oil. L.A. Jones and C.C. King (eds.). National Cottonseed Products Association, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, Tennessee.

Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. Journal of Virology 73: 9080-9088.

Niles, G.A. and C.V. Feaster. 1984. Breeding. Pages 201-231 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.

OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France. <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815918.pdf> [Accessed Apr 5, 2013]

OECD. 2009. Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2004)16. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France. <http://www.oecd.org/science/biotrack/46815236.pdf> [Accessed Apr 5, 2013]

OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia.
[http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/cotton-3/\\$FILE/biologycotton08.pdf](http://www.ogtr.gov.au/internet/ogtr/publishing.nsf/content/cotton-3/$FILE/biologycotton08.pdf) [Accessed Apr 5, 2013]

Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.

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

Ritchie, G.L., C.W. Bednarz, P.H. Jost and S.M. Brown. 2007. Cotton growth and development. University of Georgia Cooperative Extension, Athens, Georgia.

Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 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. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.

Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal 6: 2519-2523.

USDA-FAS. 2013. World agricultural production: Cotton area, yield, and production. U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, D.C. <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=851&hidReportRetrievalTemplateID=1> [Accessed January 16, 2013].

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Zeitschrift für Naturforschung C 39: 500-504.

Winter, J., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley and D. Shah. 1988. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during CdCl₂ stress. Molecular and General Genetics 211: 315-319.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 361-370.

財務省 2013 財務省貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>
[Accessed April 10, 2013]

生化学辞典 1990 生化学辞典 第2版 今堀和友・山川民夫(編) 株式会社

東京化学同人 東京 p. 497

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

平野寿助 1987 15 工芸作物 繊維料作物 ワタ . 農学大事典 第2次増訂 改版 農学大事典編集委員会 (編) 株式会社 養賢堂 東京 pp. 709-711

緊急措置計画書

平成25年5月7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 東京都中央区銀座四丁目10番10号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3) (以下、「本組換え体」という。) の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

平成25年5月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目10番10号 (電話番号 03-6226-6080)
	日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 広報部 部長
	日本モンサント株式会社 広報部

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換え体の適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を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

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、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換え体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組換え体に対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

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可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *dmo*, *bar*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-88701-3) の別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えワタの作出に用いられた改変 *dmo* 遺伝子及び *bar* 遺伝子から推定した改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Specificity of MON 88701 Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) When Ten Different Herbicides are Applied to MON 88701 and Conventional Cotton (RPN-2011-0078) (社外秘)
- 別添資料 3 Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates (RPN-10-365) (社外秘)
- 別添資料 4 Amended Report: Specificity of *E. coli*-produced MON 88701 Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme Using *o*-Anisic Acid as a Substrate (RPN-2011-0079) (社外秘)
- 別添資料 5 Segregation Analysis of the Coding Sequences Present in Herbicide-Tolerant Cotton MON 88701 Across Multiple Generations (RPN-2011-0089) (社外秘)
- 別添資料 6 Molecular Characterization of Dicamba Glufosinate-Tolerant Cotton MON 88701 (MSL0023280) (社外秘)
- 別添資料 7 Stability of DNA Insert and Expression of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Proteins in MON 88701 (MSL0023322) (社外秘)
- 別添資料 8 Amended Report for MSL0024006: Assessment of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) Protein Levels in Tissues from Dicamba Glufosinate Tolerant Cotton (MON 88701) Produced in U.S. Field Trials during 2010 (MSL0024523) (社外秘)
- 別添資料 9 Cotton GH_S26695 EndPoint TaqMan PCR with *ACP* Internal Control for Single Seed (BQ-QC-10842-02) (社外秘)

別添資料 10 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書 (社外秘)

別添資料 11 An Assessment of the Effect of Cold Temperature on Dicamba and Glufosinate Tolerant Cotton MON88701 under Growth Chamber Conditions in 2010 (PLC-2010-0623) (社外秘)