＜資料２＞

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ（*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.)(281×3006, OECD UI : DAS-24236-5×DAS-21Ø23-5)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書 1

生物多様性影響評価書の概要 2

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 2
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 2
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 2
(2) 使用等の歴史及び現状 3
(3) 生理学的及び生態学的特性 4
2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 7
(1) 供与核酸に関する情報 7
(2) ベクターに関する情報 11
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 12
(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 15
(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 18
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 18
3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 22
(1) 使用等の内容 22
(2) 使用等の方法 22
(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ける情報収集の方法 22
(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 22
(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 22
(6) 国外における使用等に関する情報 22
第二　項目ごとの生物多様性影響の評価 23
1　競合における優位性 23
2　有害物質の産生性 24
3　交雑性 26
4　その他の性質 26
第三　生物多様性影響の総合的評価 27

緊急措置計画書 31

第一種使用規程承認申請書

平成１６年１２月１０日

農林水産大臣　島村　宜伸　殿
環 境 大 臣　小池百合子　殿

申請者
氏名　ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役　モンティー・ベイヤー　印
住所　東京都品川区東品川２丁目２番24号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第４条第２項の規定により、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ルホシネート耐性ワタ （*cry1F, cry1Ac, pat, Gossypium hirsutum* L.） （281×3006, OECD UI：DAS-24236-5×DAS-21Ø23-5）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	——

生物多様性影響評価書の概要

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ　和名、英名及び学名

和名：ワタ、英名：Cotton、学名：*Gossypium hirsutum* L. 、科名：アオイ科（*Malvaceae*）

ロ　宿主の品種名又は系統名

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタ(*cry1F*, *cry1Ac*, *pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI：DAS-24236-5×DAS-21Ø23-5)（以下「本組換えワタ」と呼ぶ）は、組換えワタ同士の交配種である。

交配親は、

1．　チョウ目害虫抵抗性遺伝子 改変型*cry1F*と除草剤グルホシネート耐性遺伝子*pat*を挿入したワタ281（以下「ワタ281」と呼ぶ）

2．　チョウ目害虫抵抗性遺伝子 改変型 *cry1Ac*と除草剤グルホシネート耐性遺伝子 *pat*を挿入したワタ 3006（以下「ワタ 3006」と呼ぶ）

である。

それぞれ、遺伝子の挿入のための宿主として、実験用ワタGC510系統（*G. hirsutum*）を使用した。

ハ　国内及び国外の自然環境における自生地域

*G. hirsutum*及び*Gossypium*属植物と交雑可能な近縁野生種は、我が国の自然環境には分布しない。

一方、国外において、*Gossypium*属の野生種は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地域に分布しており、野生種二倍体は地理的分布から、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）の三群に分けられる（Fryxell 1984）。また、野生種四倍体の分布地域としては、*G.tomentosum*（ハワイ）、*G.mustelinium*（ブラジル北西部）、*G.darwinii*（ガラパゴス諸島）、*G.lanceolatum*（メキシコ）、*G.barbadebse*（アンチル列島、中南米、

ガラパゴス諸島）がある。さらに、*G.hirsutum*は、野生種あるいは栽培種として中米、アンチル諸島、南米北部、フロリダの南端、ポリネシア、北アフリカ及び南アジアに分布する。また、栽培種二倍体としてアジアワタと呼ばれる*G. arboreum*と*G. herbaceum*が知られている（Fryxell 1984, Lee 1984）。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ　国内及び国外における第一種使用等の歴史

日本へのワタの伝播は古く、799年に三河国に漂着したインド人によって伝えられたことが記録に残っているが、このワタはすぐに消滅したと考えられている。その後、文禄年間（1592～1595年）に再び九州に伝えられ、明治15～20年には関東以南を中心に100,000haに栽培されていた。しかし、輸入ワタに圧迫された結果、現在では観賞用にわずかに栽培されているにすぎない。なお、日本で栽培されていたのはアジアワタ（二倍体、*G. arboreum*）と考えられている。

一方、世界的に見れば、ワタは東アフリカを起源とし、原始的な栽培は5000年前に現在のパキスタン周辺で始まったと考えられている。17世紀には、米国南部でワタの栽培が始まり、19世紀には、ワタの最大供給源となった（Cotton Australia 2005）。

ロ　主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

ワタは世界の約90ヵ国で栽培され、2004年度の総生産は2,600万トンと推計されている。最大生産国は中国(24%)、ついで米国(19%)、インド(15%)、パキスタン(9%)、ブラジル(5%)、ウズベキスタン(4%) の順である（National Cotton Council 2005）。

栽培方法については、我が国のように温度が不足するところで栽培するときには、生長を抑制して成熟を促進するとともにさく（果実）の数を制限するために摘心・摘果を行うのが通例である。摘心時期は早すぎると枝の発生及び発育が旺盛になり、遅すぎると成熟が遅れるので、その時期は難しいが、我が国では７月下旬～８月上旬ごろの結果枝が10～12段くらいになった頃が適当だといわれている。また、さく数については、結果枝当たり下方では２ヶ、上方では１ヶ程度に摘果するのが通例となっている（「農学大事典」養賢堂）。

一方、国外においては、国や地域によりその詳細な栽培方法が異なるが、以下近代農法に共通する点をまとめる。ほ場は耕起し、畝立てを行い、春先に地温が14℃まで上昇した時期に十分な土壌水分含量を確認した上で播種が行われる。種子は数日で発芽するが、その後適

宜、潅水、施肥、病害虫防除などの一般管理を行う。発芽後から平均180日でワタのさくは成熟する。さくの成熟を確認した上で落葉剤を散布し、大部分の葉が枯れ落ちたことを確認したのち、機械による収穫を行う（Cotton Australia 2003）。

ワタは、種子上皮から発達した綿毛が刈り取られて繊維として衣服の原料になるほか、短毛（リンター）は化学製品の原料として利用される。子実（種子）は家畜の飼料や搾油用に供され、綿実かすは家畜の飼料として利用されている。

我が国におけるワタ種子の輸入量（2002年）は、約15万トンであり、そのうち約12万トンが飼料用として使用されている（FAO 2004）。また、2002年には、約22,000トンの綿実油が輸入されている（FAO 2004）。さらに、2004年に6,100トンの綿実かすが家畜の飼料として輸入されている（財務省 輸入統計 2005）。

2002年に輸入された栽培用種子は約200kgで、そのほとんどが米国から輸入されており、観賞用として栽培されている。この栽培用種子は米国の種子会社が非遺伝子組換えワタ品種を特定して栽培し、遺伝子組換えワタ種子の混入がないように分別した上で輸入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アオイ科に属する植物であり、熱帯では多年生であるが、温帯では一年生である（学研学習事典データベース 1999）。日本の気候では、冬季の気温が低いため多年生となるケースは稀であり、ほとんどが一年生と考えてよい。

草丈は90～190cm（Cotton Australia 2003）で、葉は互生である。第３葉までは心臓形をしているが完全な本葉は５片である。花は葉と対生し総包は心臓形の３片からなり、がくは盃状に花冠の基部を包み、上縁は浅く５分する。（「農学大事典」養賢堂）。

ロ　生息又は生育可能な環境の条件

土壌は排水良好な砂質壌土に適し、アルカリ土壌に強く酸性を嫌う。ワタの発芽には最低12℃を必要とし、20～28℃で活発に生育する。生育には年1,000～1,500mmの降水量を必要とする（「農学大事典」養賢堂）。

なお、米国では、１シーズン中に最低500mmの雨量、温度15℃以上の日が160日以上ある北緯37度以下の地域で生育可能である。また、ヨーロッパや中国では北緯42度以上でも生育可能である（Waddle 1984）。

ハ　繁殖又は増殖の様式

①　種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

ワタのさくは長径23～43mmの球形ないし長円形で先端が尖っている。開花後30日程度で最大に達し、40～60日までに成熟し、その後開裂する。さくは３～５室からなり、各室６～10個の種子を形成する。種子はその表皮細胞が発達した綿毛で覆われているため、脱粒性は低く、風や鳥、動物等の媒介による種子の拡散も起こらない。ワタの種子は休眠性が極めて浅く、土壌中で湿度や温度（14℃以上）など一定の条件が揃えば発芽する（OGTR 2002)。Eastick (2002)によるオーストラリアでの実験では、リントが残っている綿実は、発芽に好適な環境条件下においても発芽率は比較的低く（40%）、綿実を地表に放置した場合の発芽率は20%程度であった。乾期の土壌中に播種した場合、綿実の発芽率は３ヵ月後に10%、５ヵ月後にほぼ0%となり、長期間生存しないことが示されている。

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

ワタは種子繁殖であり、塊茎や地下茎などによる栄養繁殖はしない。また、ワタには、自然条件において植物体を再生しうる組織等がある、あるいはそこから発芽するというような報告はない。

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

ワタは基本的には自家受粉であるが、虫媒等で他家受粉が生じる場合がある。なお、我が国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。種子は受精によって作られ、アポミクシスは生じない。

④　花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタの花は１葯当たり600個程度の花粉が詰まった約65本の葯を持つ。ワタの花粉は黄色の球形で多くの突起がある。花粉の稔性は葯から放出された直後は56%であり、その寿命は約12時間であることが報告されている（Govila and Rao 1969)。ワタの花粉は他の花粉と比べて重く、粘性が高いので、自然条件下で風に運ばれることはほとんどない。米国及びオーストラリアの研究機関の行った調査によれば、ワタの花粉は20m以上風で移動することはほとんどないことが報告されている（Umbeck *et al.* 1991)。なお、マルハナバチ（*Bombus* sp.）やミツバチの一種（*Apis mellifern*）等が花粉を媒介することがある。

ニ　有害物質の産生性

他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ホ　その他の情報

ワタにはゴッシポールとシクロプロペン脂肪酸が含まれていることが知られている。ゴッシポールには遊離型と結合型があるが、遊離型ゴッシポールが生理活性をもつ。ゴッシポールは単胃動物（家禽類、豚等）に対して致死毒性があるため、単胃動物には綿実は与えられない。一方、反芻動物では反芻胃においてゴッシポールを無毒化することができるが、大量の綿実を与えると害を及ぼすことがあるため、成牛の場合、綿実の摂食許容量は体重の0.5%とされており、反芻胃が発達するまで綿実は与えられない。さらに、ゴッシポールは雄の抗受精特性を持つため、牛の繁殖期が始まる２～３ヶ月前から綿実は与えられない（Myer *et al.* 2003）。また、遊離型ゴッシポールは、綿実油の加工中に加熱により蛋白質と結合し減少するため、綿実油中にはほとんど含まれない。一方、シクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸、ジヒドロステルクリン酸）は、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害することにより、鶏卵の脱色やふ化率低下を引き起こす。これらのシクロプロペン脂肪酸は、精製油の脱臭工程中に大幅に減少する　（OECD 2004）。綿実は大量の繊維に覆われているため、鳥類のような種子を捕食する動物は好まない。また、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや、種子の形態により、捕食することを避けると思われる。さらに、野生の哺乳動物が綿実を捕食するという例も知られていない。したがって、ゴッシポール及びシクロプロペン脂肪酸は、野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす他感作用物質ではないと考えられる。

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

本組換えワタは、ワタ281とワタ3006を交雑により掛け合わせて作出した。このため、遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報についてはワタ281及びワタ3006それぞれについて記載した。なお、ワタ281及びワタ3006について、商品化系統としての利用は予定していない。

イ　構成及び構成要素の由来

ワタ281及びワタ3006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については表 1（P.8）及び表 2（P.8）に示した。

なお、改変型*cry1F*及び改変型*cry1Ac*遺伝子は、それぞれ*Bacillus thuringiensis*（*B. t.*) var. *aizawai* 由来の*cry1F*遺伝子及び*B. t. kurstaki*由来の*cry1Ac*遺伝子をもとに、殺虫活性を高め、植物用に最適化するように合成しており、当該遺伝子によりコードされる改変型Cry1F蛋白質及び改変型Cry1Ac蛋白質は野生型とサイズ、アミノ酸配列が異なっている。また、*pat*遺伝子は、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の*pat*遺伝子をもとに、植物用に最適化するように合成しているが、当該遺伝子によりコードされるPAT蛋白質のアミノ酸配列は変化していない。

ロ　構成要素の機能

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

改変型Cry1F蛋白質は特にワタの葉を加害するビートアーミーワームとソイビーンルーパーに高い活性を示し、改変型Cry1Ac蛋白質は特にワタの綿実さやを加害するコットンボールワームとピンクボールワームに高い活性を示す（P.10,表 3)。したがって、葉における改変型Cry1F蛋白質の発現を高める目的で、改変型*cry1F*遺伝子のプロモーターとして葉における発現量が多い特徴を持つ(4ocs)DeltaMas2'を用いた。また、綿実さやにおける改変型Cry1Ac蛋白質の発現を高める目的で、改変型*cry1Ac*遺伝子のプロモーターとして綿実さやにおける発現量が多い特徴を持つUbiZm1を用いた。ワタ281及びワタ3006の作出に用いられた供与核酸の各構成要素の機能を表 1（P.8）及び表 2（P.8）に示した。

表 1　ワタ 281 の作出に用いられた供与核酸

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

表 2　ワタ 3006 の作出に用いられた供与核酸

構成要素	由　来　及　び　機　能
改変型 *cry1Ac* カセット	
Ubi Zm1(intron)	第 1 エクソン及び第 1 イントロンを加えたトウモロコシ *Zea mays* のユビキチン 1 プロモーターであり、ワタの綿実さやでの発現量が多い特徴を持つ。(Christensen *et al.* 1992) (米国特許第 5614199 号、GenBank Accession I18571)
改変型 *cry1Ac*	*B.t.* var. *kurstaki* 由来の *cry1Ac* 遺伝子をもとに合成した。タバコバッドワーム（*Heliothis virescens*）、ビートアーミーワーム（*Spodoptera exigua*）、コットンボールワーム（*Helicoverpa zea*）、ピンクボールワーム（*Pectinophora gossypiella*）等のワタの主要害虫に対して殺虫活性を示す改変型 Cry1Ac 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*) pTi15955 (Barker *et al.* 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491)由来の双方向ターミネーター
pat カセット	
(4ocs)DeltaMas 2'	pTiAch5（Ellis *et al.* 1987）(GenBank Accession Numbers I05704 toI05712）由来のオクトピン合成酵素 (OCS) のエンハンサー 4 コピーを含む pTi15955 (Barker *et al.* 1983）(GenBank Locus ATACH5, Accession X00491）由来のマンノピン合成酵素のプロモーターであり、ワタの葉における発現量が多い特徴を持つ。
pat	*S. viridochromogenes* 由来のフォスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼ遺伝子配列に基づき、植物用に最適化された合成グルホシネート耐性遺伝子 (Eckes *et al.* 1989)。選抜マーカーとして使用した PAT 蛋白質をコードする遺伝子。
ORF25 polyA	*R.radiobacter* (*A.tumefaciens*) pTi15955 (Barker *et al.* 1983) (GenBank Locus ATACH5, Accession X00491)由来の双方向ターミネーター

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

改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質

B. t. var. *aizawai* 及び*B.t.* var. *kurstaki* において産生されるデルタ-エンドトキシン（プロトキシン）の多くは、約120～140kDaの蛋白質である（Schnepf *et al.* 1998）。

標的昆虫に摂食されると、プロトキシンは腸管内のプロテアーゼにより、C－末端及びN－末端が消化され殺虫活性のあるコアトキシンとなる。これらのコアトキシンは65～70kDaの分子量であり、中腸上皮にある特異的な受容体と結合することで、立体配位構造が変化して細胞膜に侵入する。さらに、この蛋白質はオリゴマーを形成し、それが中腸細胞膜に細孔構造をつくり、その結果、細胞の破壊が誘導され昆虫を死に至らしめる。本組換えワタ中で発現する改変型Cry1F蛋白質及び改変型Cry1Ac蛋白質の活性部分であるコア蛋白質は、野生型*B.t.*菌のCry1F蛋白質及びCry1Ac蛋白質のコア蛋白質と同一である。野生型*B.t.*菌を利用したBt製剤は、米国、ヨーロッパ及び日本等で長年にわたり、チョウ目害虫防除に使用されている。

Cry1F及びCry1Ac蛋白質を含むCry1蛋白質はチョウ目昆虫に対してのみ殺虫活性を示すことが知られている（Prieto-Samsónov *et al.* 1997）。改変型Cry1F蛋白質は、ワタを加害するチョウ目害虫であるタバコバッドワーム（*Heliothis virescens*）、ビートアーミーワーム（*Spodoptera exigua*）、コットンボールワーム（*Helicoverpa zea*）、ソイビーンルーパー（*Psuedoplusia includens*）に対して殺虫活性を示す。また、改変型Cry1Ac蛋白質はタバコバッドワーム、ビートアーミーワーム、コットンボールワーム、ソイビーンルーパー、ピンクボールワーム（*Pectinophora gossypiella*）に対して殺虫活性を示す。本組換えワタは、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質の両Cry蛋白質を発現するため、両方の殺虫活性を併せ持つ。改変型Cry1F蛋白質を発現するワタ281、改変型Cry1Ac蛋白質を発現するワタ3006及び両Cry蛋白質を発現する本組換えワタのワタを加害するチョウ目害虫に対する防除効果の概要を表 3（P.10）にまとめた。

また、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質の非標的生物であるオオミジンコ、ニッポンクサカゲロウ、テントウムシ、ミツバチ、キョウソヤドリコバチ、ミミズ、ニジマスに対する安全性は確認されている。

表 3　チョウ目害虫に対する防除効果

チョウ目害虫	ワタ281 (改変型Cry1F蛋白質)	ワタ3006 (改変型Cry1Ac蛋白質)	本組換えワタ
タバコバッドワーム (*Heliothis virescens*)	○	○	○
ビートアーミーワーム (*Spodoptera exigua*)	○	△	○
ソイビーンルーパー (*Psuedoplusia includens*)	○	△	○
コットンボールワーム (*Helicoverpa zea*)	△	○	○
ピンクボールワーム (*Pectinophora gossypiella*)	×	○	○

○：優れた防除効果有
△：防除効果有
×：防除効果無

PAT蛋白質

ホスフィノトリシン・アセチルトランスフェラーゼであるPAT蛋白質は、除草剤グルホシネートを特異的にアセチル化し、無毒のアセチルグルホシネートに変換して除草活性を失わせることから、*pat* 遺伝子を有する植物体は除草剤グルホシネートに耐性を示す。

アレルギー性

改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質が既知アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうかをアレルゲン・データベース（Swiss-Prot, PIR, GenRept, FARRP Protein Allergen Database）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する配列を共有していなかった。

③　宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

Cry蛋白質は酵素ではないので、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質は植物の代謝系に影響を及ぼすものではないと考えられる。また、PAT蛋白質はきわめて特異的にグルホシネートをアセチル化する酵素であり（Thompson *et al.* 1987）、植物中において基質となる蛋白質はグルホシネートのみである。したがって、PAT蛋白質が他の代謝系に関与することは考えられない。

(2) ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

本組換えワタの母本であるワタ281の作出に用いられた発現ベクターpAGM281及びワタ3006の作出に用いられた発現ベクターpMYC3006は、広域宿主プラスミドRK2（Schmidhauser *et al.* 1985）をもとに構築された。

ロ　特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

発現ベクターpAGM281の塩基数は14,950bpである。また、発現ベクターpMYC3006の塩基数は15,337bpである。

② 特定の機能を有する塩基配列の種類

ery^{R}遺伝子によるエリスロマイシン耐性は、発現ベクターpAGM281、pMYC3006の選択に用いられた。ただし、*ery*^{R}遺伝子はT-DNA領域の外側に位置するためワタ281及びワタ3006にこの遺伝子は導入されていない。

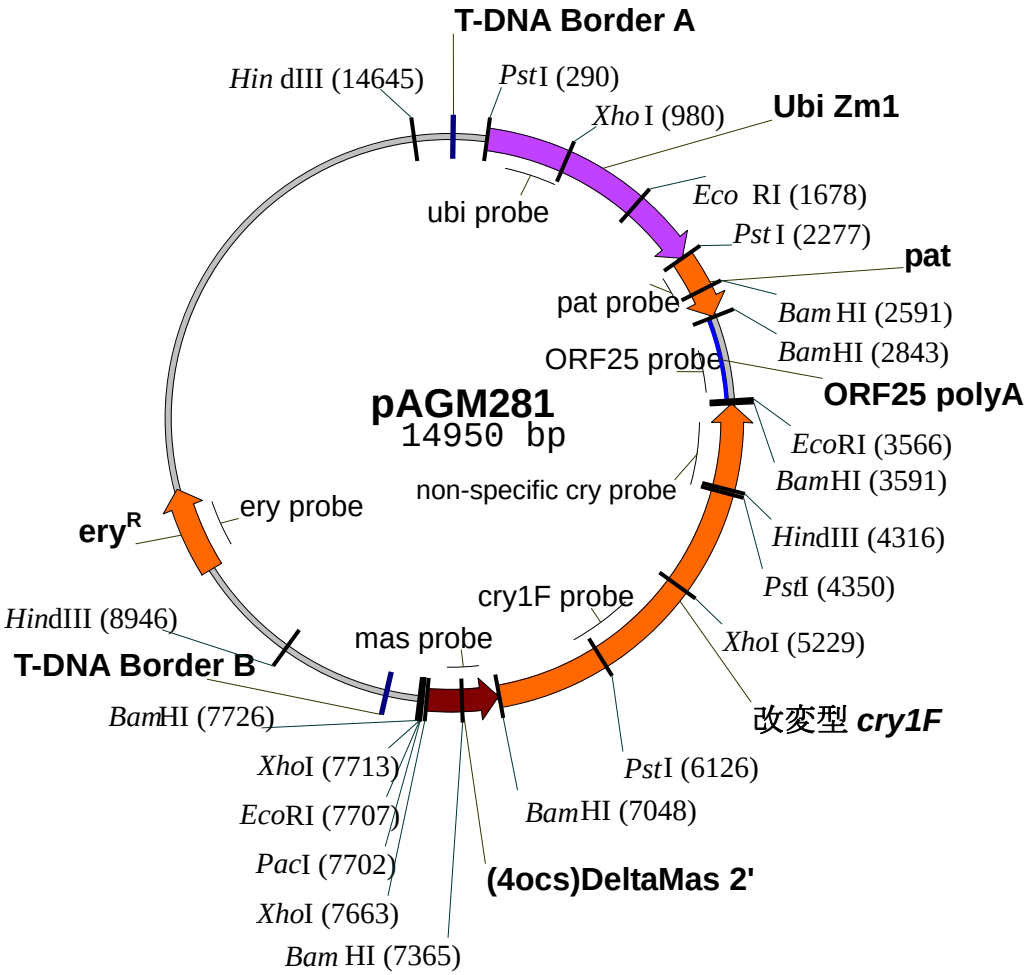
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

pAGM281及びpMYC3006ベクターの基となった、プラスミドRK2のT-DNA領域は、表 1（P.8）と表 2（P.8）に示した改変型*cry1F*カセット、改変型*cry1Ac*カセット及び*pat*カセットの３種類の遺伝子カセットで置き換えられている。したがって、プラスミドRK2には、アグロバクテリウムの感染を可能とする配列は含まれておらず、感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

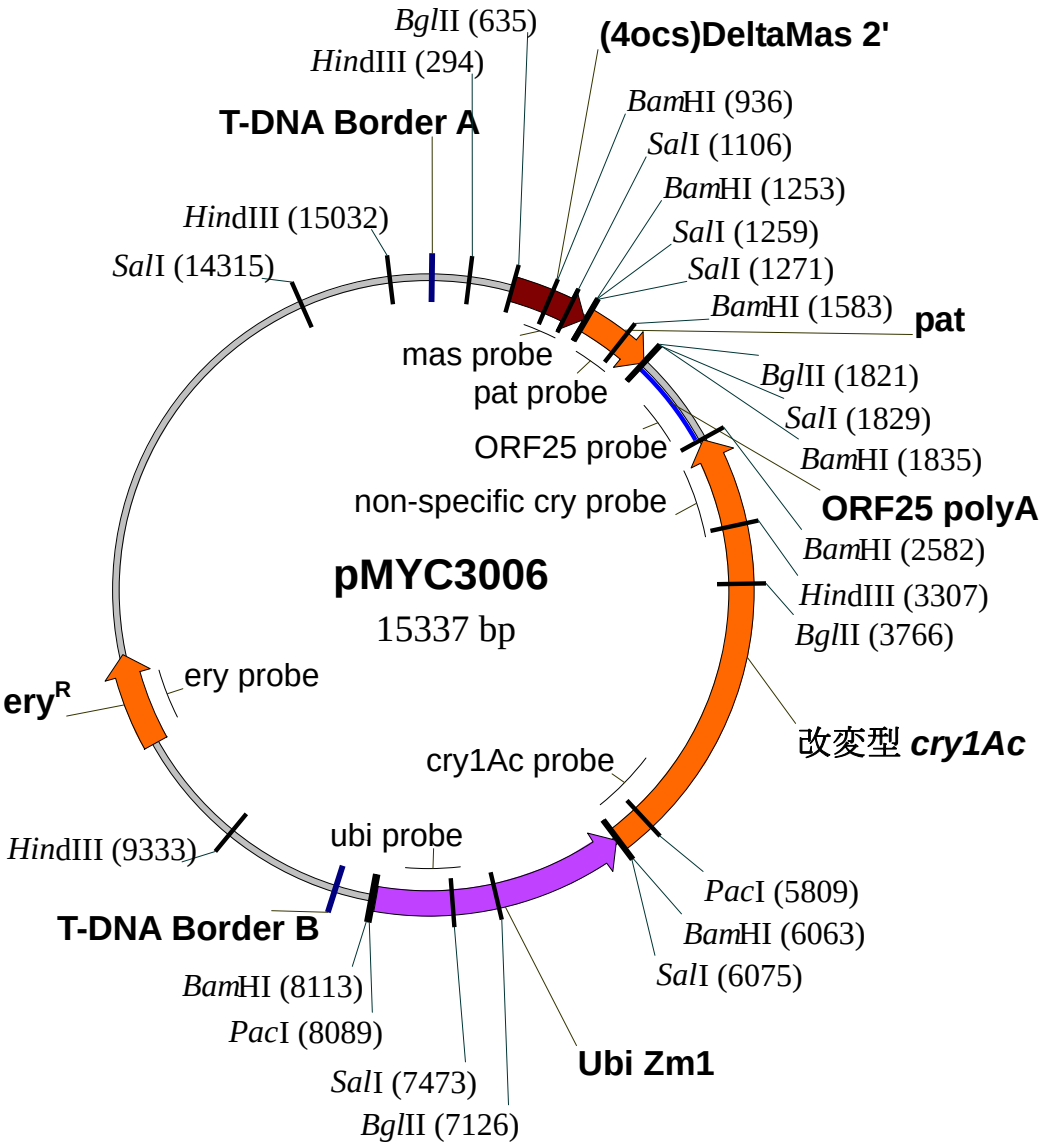
イ　宿主内に移入された核酸全体の構成

ワタ281に用いられた発現ベクターpAGM281の構成図を図 1（P.12）に示した。また、ワタ3006に用いられた発現ベクターpMYC3006の構成図を図 2（P.13）に示した。



T-DNA Border A：T-DNA 左末端
T-DNA Border B：T-DNA 右末端

図 1　発現ベクターpAGM281 の構成図



T-DNA Border A：T-DNA 左末端
T-DNA Border B：T-DNA 右末端

図 2　発現ベクターpMYC3006 の構成図

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

ワタ281及びワタ3006の宿主である実験用ワタGC510系統（*G. hirsutum*）への発現ベクターpAGM281、pMYC3006の導入はアグロバクテリウム法により行われた。GC510系統ワタの子葉切片を、発現ベクターpAGM281またはpMYC3006を保持するアグロバクテリウムと共存培養し、発現ベクター上のT-DNA領域をワタゲノムに組み込ませた。

ハ　遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が導入された細胞の選抜の方法

グルホシネート及び抗生物質カルベニシリンを含む培地でカルスを形成させ、その後再生培地を用いて植物体まで再生させた。得られた再生個体について挿入遺伝子の存在をサザンブロット分析で確認し、標的害虫であるタバコバッドワームに対する抵抗性について、葉片ディスクによる生物検定で確認した。

② アグロバクテリウムの菌体の残存の有無

カルスを誘導する段階で、抗生物質カルベニシリンを添加することにより残存アグロバクテリウムを殺菌し、アグロバクテリウム菌体が残存していないことを確認した。

③ 育成の経過及び系統樹

ワタ281及びワタ3006は、それぞれ優良品種ワタ（PSC355）と交配し、選抜育種を行った。その後ワタ281とワタ3006のBC3F1世代を交配することにより、改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質を発現する本組換えワタを作出した。本組換えワタの育種には、一般的に行われている自家受粉による系統育種法により行った。まず、F2世代においてPCR法により改変型*cry1F*及び改変型*cry1Ac*遺伝子をもつ株を特定し、両遺伝子をもたない株を開花前に除去した。次に、開花した株において自家受粉を行い、F3世代を得た。これを繰り返すことにより、優性ホモ個体の割合を高めることができ、商品化するF7世代では、調べた368種子すべてが、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質をともに発現した。

ワタ281及びワタ3006は平成17年9月に、本組換えワタは平成17年10月に、厚生労働省より「食品衛生法」に基づく安全性の承認を得た。また、ワタ281及びワタ3006は、平成17年7月、農林水産省に、「飼料安全法」に基づく安全性審査の申請を行った。

(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

イ　移入した核酸が存在する場所

移入したDNAは、いったん植物染色体に組み込まれると、メンデル遺伝の法則に従う。ワタ281及びワタ3006に導入された形質が、F2世代の集団でどのような分離比を示すかを分析した。改変型*cry1F*/*pat*または改変型*cry1Ac*/*pat*遺伝子をヘテロで有するBC3F1世代の個体を自家交配した結果、BC3F2世代では、核内遺伝子におけるメンデルの法則から予想される分離値を示した。したがって、ワタ281及びワタ3006に移入した核酸が染色体上に存在していると仮定したときに想定しうる分離比と試験結果が一致したことにより、移入した核酸が染色体上にあることを確認した。さらに、本組換えワタにおけるF1及びF2世代の形質分離について調べた。その結果、核内遺伝子におけるメンデルの法則から予想される分離比を示したことより、移入した核酸が本組換えワタの染色体上に存在することを確認した。

ロ　移入した核酸のコピー数及び導入された核酸の複数世代における伝達の安定性

移入した改変型*cry1F*、改変型*cry1Ac*及び*pat*遺伝子のコピー数、及び伝達の安定性については、サザンブロット分析を用いて確認した。

移入した核酸のコピー数を確認するため、本組換えワタのF3世代を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、本組換えワタには１コピーの改変型*cry1F*遺伝子、１コピーの改変型*cry1Ac*遺伝子及び２コピーの*pat*遺伝子と１つの*pat*遺伝子の断片（部分的*pat*遺伝子）が確認された。部分的*pat*遺伝子はワタ281に存在しており、本組換えワタに存在する部分的*pat*遺伝子はワタ281に由来するものである。ワタ281及びワタ3006に導入された遺伝子の概略図をそれぞれ図 3（P.16）及び図 4（P.16）に示した。部分的*pat*遺伝子の長さは、完全な*pat*遺伝子に比べて16分の１程度である。この*pat*遺伝子断片におけるPAT蛋白質の産生性について、本組換えワタを用いたウェスタンブロット分析では、部分的PAT蛋白質は検出されなかった。また、本組換えワタには形質転換ベクターに存在する細菌由来のエリスロマイシン耐性（ery^R）をコードする遺伝子は組込まれなかったことが確認されている。さらに、移入した核酸の複数世代における伝達の安定性を確認するため、本組換えワタのF7世代を用いて、サザンブロット分析を行った。その結果、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが明らかになった。

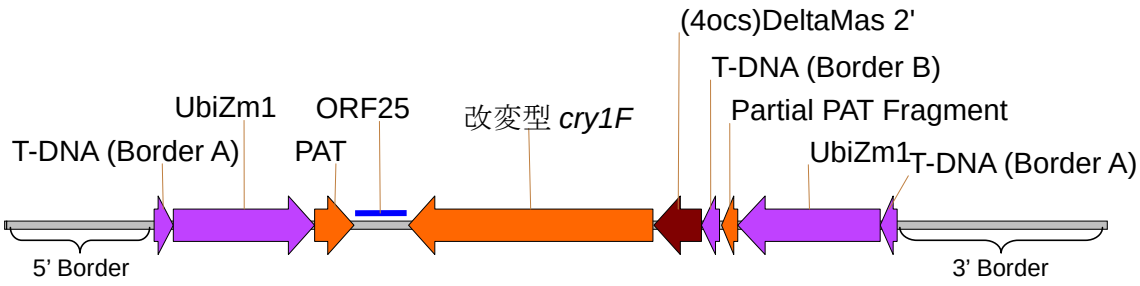


図 3　ワタ 281 由来の T-DNA 挿入全体及び隣接境界領域の略図

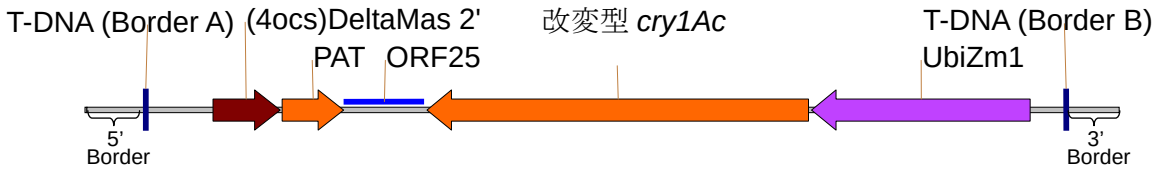


図 4　ワタ 3006 由来の T-DNA 挿入全体及び隣接境界領域の略図

ハ　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

本組換えワタには*pat*遺伝子が２コピー存在し、１コピーはワタ281由来で、１コピーはワタ3006由来である。ワタ281に存在する*pat*遺伝子は、発現ベクターpAGM281のT-DNA領域として改変型*cry1F*遺伝子とともに導入されたものである。また、ワタ3006に存在する*pat*遺伝子は、発現ベクターpMYC3006のT-DNA領域として改変型*cry1Ac*遺伝子とともに導入されたものである。ワタ281に導入された改変型*cry1F*/*pat*遺伝子とワタ3006に導入された改変型*cry1Ac*/*pat*遺伝子は、それぞれワタ281とワタ3006の特有のゲノム上に存在する。本組換えワタは、ワタ281とワタ3006を交雑により掛け合わせて作出したものであり、F1及びF2世代の形質分離試験において、２つの独立する核内遺伝子がメンデルの法則に従う分離比を示した。さらに、ワタ281とワタ3006特有の塩基配列を用いたPCR法による本組換えワタの検出においても、本組換えワタではワタ281及びワタ3006特有のバンドが認められている。以上のことから、本組換えワタに存在する２コピーの*pat*遺伝子は離れているものと考えられる。

ニ　移入された核酸の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

本組換えワタは、2001年（F3世代）及び2002年（F5世代）に行われたほ場試験において、ワタを加害するチョウ目害虫であるタバコバッドワーム、ビートアーミーワーム、コットンボールワームに対して十分な防除効果を示したことから、改変型Cry1F 及び改変型Cry1Ac蛋白質が本組換えワタにおいて安定して産生されているものと考えられた。

PAT蛋白質は、ワタ281及びワタ3006の選抜マーカーとして用いており、T0世代においてグルホシネート耐性を確認している。ワタ281とワタ3006を掛け合わせて作出した本組換えワタについては、日本における隔離ほ場試験におけるグルホシネート散布試験により（F6世代)、PAT蛋白質が安定して産生されていることが確認されている。

また、本組換えワタの各部位における改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質の発現を、ELISA法により確認した。分析には、2001年に米国６ヵ所のほ場（アリゾナ州、カリフォルニア州、ミシシッピ州、ノースカロライナ州、テキサス州２ヵ所）で生育したF3世代のサンプルを供試した。その結果、頂生葉、蕾、綿実さや、全植物及び種子において、改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質が発現していた。改変型Cry1F蛋白質の発現量は、綿実さやの0.91 ng/mg から全植物の40.21 ng/mg の範囲であり、改変型Cry1Ac蛋白質の発現量は、綿実さやの検出限界（0.025 ng/mg）以下から蕾の3.04 ng/mg の範囲であった。また、PAT蛋白質の発現量は、頂生葉及び蕾の検出限界（0.056 ng/mg）以下から種子の0.85 ng/mgの範囲であった。また、花粉においては、改変型Cry1F及びPAT蛋白質はほとんど発現せず、改変型Cry1Ac蛋白質のみ発現していた（1.02~2.46 ng/mg)。次に、改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質の世代間でも発現の安定性を確認するために、2003年に米国６ヵ所のほ場（アリゾナ州、カリフォルニア州、ミシシッピ州、ノースカロライナ州、テキサス州２ヵ所）で生育したF6世代の種子における蛋白質発現をELISA法により測定した。その結果、F6世代においても改変型Cry1F（1.50~4.15 ng/mg)、改変型Cry1Ac（0.16~0.89 ng/mg）及びPAT蛋白質（0.22~1.02 ng/mg）が安定して発現していることが明らかになった。試験を行ったほ場は、いずれも代表的なワタ栽培地であり、1シーズン中に最低500mmの雨量、温度15℃以上の日が160日以上のようにワタの生育に適した気象条件であるが、様々な地勢条件である。

以上のことから、改変型Cry1F、改変型Cry1Ac及びPAT蛋白質は様々な環境条件でも安定して発現しているものと考えられた。

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

本組換えワタには、伝達性を有する配列は含まれておらず、本組換えワタに導入された遺伝子が伝達される事はない。

(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

本組換えワタの検出及び識別の方法として、ワタ281とワタ3006にそれぞれ特異的な塩基配列をプライマーとして組み合わせて用いたPCR法が開発されており、本法により、本組換えワタを特異的に検出可能である。なお、本法の検出感度（測定下限値）は、PCR増幅物20コピーであり、測定間再現性、希釈試験及び他の遺伝子組換えワタや非組換えワタとの交差性確認試験により信頼性が確認されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ　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（特定の組織又は生育段階において特異的に発現している場合は、その内容を含む。）

改変型cry1F 及び改変型cry1Ac 遺伝子によってコードされる改変型Cry1F 及び改変型Cry1Ac蛋白質が本組換えワタの様々な組織において発現していることを確認しており、チョウ目害虫抵抗性が付与されている。

また、選抜マーカーとして使用した*pat* 遺伝子によってコードされるPAT蛋白質も本組換えワタの様々な組織において発現していることを確認しており、除草剤グルホシネート耐性が付与されている。

ロ　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

平成15年度に、独立行政法人 農業技術研究機構 九州沖縄農業研究センターにおいて隔離ほ場試験を行い、本組換えワタと非組換えワタの相違を検討した。

①　形態及び生育の特性

発芽揃いは、本組換えワタと非組換えワタとも播種６日後であった。

草丈では、各時期において本組換えワタと非組換えワタの間に有意差は認められなかった。

開花特性では、花蕾数について個体間のばらつきが大きかったが、本組換えワタと非組換えワタの間に有意差は認められなかった。がくは３枚の心臓形をした大きながく片からなり、縁は鋸歯状であった。花弁は５枚、基部は折れ重なっていた。雌蕊は１本、雄蕊は子房下部より多数伸長するが、柱頭には達していなかった。子房基部に６本の小さな蜜腺があるが、芳香はほとんどなかった。花色は、本組換えワタと非組換えワタとも開花初日は白色で、２日目から３日目にかけて薄ピンク色になり、３～４日目には萎れて落花した。花器形態には本組換えワタと非組換えワタ間で差がみられなかった。

開じょ特性では、開花後約１ヵ月半で最大の大きさになり、本組換えワタ、非組換えワタとも、開じょした。収穫期に差は見られなかった。

さく形態は、本組換えワタと非組換えワタとも楕円形で、開花後１週間で肥大を始めた。株当たりの収穫さく数及び未収穫さく数は、本組換えワタと非組換えワタの間に有意差は認められなかったが、収穫さく数は本組換えワタで多かった（19.2個対11.7個）。これについては、ワタノメイガ及びアワノメイガの食害により非組換えワタの生育及びさくの成熟が遅延したためと推察された。さく重量には、差は見られなかった。さくの室数は本組換えワタと非組換えワタとも3～5で、各さくに21～33粒の種子を生じていた。

②　生育初期における低温耐性

生育初期における低温耐性について検討するため、本葉２葉期の20個体を４℃、12時間日長の人工気象器に搬入し、経時的に反応を調査した。人工気象器搬入の翌日から、子葉の萎凋・退色がみられ、搬入６日後には全個体が枯死した。このことから、本組換えワタの幼植物は、一般のワタと同様に４℃条件下では生存できないことが確認された。

③　成体の越冬性

九州沖縄農業研究センターの露地ほ場で栽培した本組換えワタ及び非組換えワタの株は、12月下旬までの低温及び降霜で完全に枯死し、成体での越冬も困難であり、本組換えワタと非組換えワタの差は見られなかった。

④　花粉の稔性及びサイズ

我が国においては、本組換えワタの種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培も行われていない。よって、搾油用または飼料用として輸入された本組換えワタの種子が輸送中にこぼれ落ち、自生化することにより他の植物を駆逐し、我が国の生物多様性に影響を与えることが想定される。しかし、こぼれ落ちた種子が発芽した後に生育ある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あるいは自生化したという報告はされていないことから、花粉の稔性及びサイズの調査は行わなかった。

⑤　種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量については、１株当たりのさく数、さくの室数、さく当たりの種子数、さく重量の本組換えワタと非組換えワタとの差異を調査した。その結果、本組換えワタと非組換えワタの間に有意差は認められなかった。

脱粒性に関しては、ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくいため、種子の脱粒性は低いものと考えられる。ワタは通常、開花後40～60日で開じょする（「農学大辞典」養賢堂）。隔離ほ場試験において本組換えワタと非組換えワタの開じょ特性を比較した結果、本組換えワタ及び非組換えワタの開じょ期及びその進行程度は、一般のワタと同様であった。また、開じょした本組換えワタのさくの綿毛は、非組換えワタと同様に地毛が絡み合って分離しにくいことが認められた。したがって、本組換えワタの脱粒性は非組換えワタと同等であると考えられた。

ワタの種子は休眠性が極めて浅く、土壌中で湿度や温度（14℃以上）など一定の条件が揃えば発芽することが知られている（OGTR 2002）。また、米国で行った20ヵ所のほ場試験において、本組換えワタと非組換えワタの休眠性に差が認められなかった。したがって、本組換えワタ種子の低温での生存性及び越冬性能力は極めて低く、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ため、休眠性に関する試験は行わなかった。

発芽率については、本組換えワタが92%、非組換えワタが98%であり、本組換えワタと非組換えワタの間で有意差は認められなかった。

⑥　交雑率

本組換えワタの花粉飛散等により、非組換えワタに交雑が生じる可能性を検討した。九州沖縄農業研究センターの隔離ほ場において、本組換えワタに隣接して栽培されている非組換えワタの種子及び本組換えワタの種子をそれぞれ180粒及び20粒採取し、ビニルハウス内に播種した。本葉２葉期にグルホシネート液剤の200倍液（通常使用濃度）を1.5cc/m^{2}散布し、

散布５日後に生存個体数を調査した。その結果、本組換えワタは供試した20個体すべてが生存したのに対し、非組換えワタは供試した180個体中３個体が生存した。また、隔離ほ場試験におけるグルホシネート散布試験では、非組換えワタにグルホシネート液剤の200倍液を1.5 cc/㎡散布した結果、５個体すべてが枯死したことから、本試験において生存した３個体は、交雑によりグルホシネート耐性が付与されたものと考えられた。以上のことにより、風媒あるいは虫媒により1.7%の交雑が生じた可能性が示唆されたが、ワタの自然交雑率は2.0%（11ヵ所平均、0～5.9%）という報告があり（Umbeck *et al.* 1991）、認められた交雑率は一般のワタと同等であった。

⑦　有害物質の産生性

本組換えワタと非組換えワタの有害物質の産生性を比較するために、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

＜後作試験＞

本組換えワタ及び非組換えワタの栽培土壌を用いた後作試験において、検定植物であるハツカダイコンの発芽数、草丈、根長、地上部生重について統計学的有意差は認められなかった。

＜鋤込み試験＞

本組換えワタ及び非組換えワタの植物体を用いた鋤込み試験において、検定植物であるハツカダイコンの発芽数、草丈、根長、地上部生重について統計学的有意差は認められなかった。

＜土壌微生物相試験＞

播種期、生育期及び収穫期の土壌を採取し、ATPバイオマス、土壌中の微生物生菌数、放線菌数、糸状菌胞子数、*Pseudomonus* 数を測定した。また、収穫期には代表的な作物体を引き抜き、側根の微生物相を調査した。その結果、播種期土壌では組換え区の生菌数（希釈肉汁培地）は対照区との間に統計学的有意差が認められたが（組換え区：1.21×10^{7} CFU/g 乾土、対照区：8.38×10^{6} CFU/g 乾土）、その差は通常の変動範囲内であり、供試土壌としては適切であったと判断された。栽培期間には、すべての調査項目において組換え区と対照区で統計学的有意差は認められなかった。収穫期土壌の側根付近でも、組換え区と対照区で微生物相の違いを検出することはできなかった。

以上の結果から、有害物質の産生性に関して、本組換えワタにおいて意図しない有害物質の産生はないと考えられる。

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) 使用等の方法

―――

(3)承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

―――

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

「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

―――

(6) 国外における使用等に関する情報

国外における本組換えワタの安全性に係る承認の状況を表 4（P.22）に示した。

表 4　国外における本組換えワタの安全性に係る承認の状況

国名	承認機関	承認時期	承認内容
米国	米国農務省	2004年7月	無規制栽培
	米国食品医薬品局	2004年8月	食品及び飼料安全性
	米国環境保護局	2004年9月	植物農薬登録
メキシコ	メキシコ保健省	2004年9月	植物農薬登録

なお、国内における安全性審査の状況については、ワタ281及びワタ3006は平成17年9月に、本組換えワタは平成17年10月に、厚生労働省より「食品衛生法」に基づく安全性の承認を得た。また、ワタ281及びワタ3006は、平成17年７月、農林水産省に「飼料安全法」に基づく安全性審査の申請を行った。

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価

本組換えワタの育種には、一般的に行われている自家受粉による系統育種法により行った。まず、F2世代においてPCR法により改変型*cry1F*及び改変型*cry1Ac*遺伝子をもつ株を特定し、両遺伝子をもたない株を開花前に除去した。次に、開花した株において自家受粉を行い、F3世代を得た。これを繰り返すことにより、優性ホモ個体の割合を高めることができ、商品化するF7世代では、調べた368種子すべてが、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質をともに発現した。したがって、商品化する本組換えワタは親系統に分離する可能性は低いと考えられ、項目ごとの生物多様性影響の評価においては、本組換えワタによる生物多様性影響の評価を行った。

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

平成15年度に、独立行政法人 農業技術研究機構 九州沖縄農業研究センターにおいて、野生植物との競合における優位性に寄与すると考えられる特性（形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、種子の生産量・脱粒性・休眠性・発芽率）について調査を行った。その結果、いずれの項目においても、本組換えワタは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。また、ワタについては我が国においてこぼれ落ちて自生したという報告はされていない。

以上の結果より、本組換えワタと非組換えワタには、競合における優位性に影響を与える差はないと判断された。

本組換えワタは改変型*cry1F*及び改変型*cry1Ac*遺伝子の発現により、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質が産生されることからチョウ目害虫に対して抵抗性を示す。しかし、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、この形質によって本組換えワタが自生し、競合における優位性を持つようになるとは考えられない。また、本組換えワタは、選抜マーカーとして使用した*pat*遺伝子の発現によりPAT蛋白質が産生されるが、グルホシネートを散布されることが想定されにくい自然環境下においては、PAT蛋白質を産生す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られない。

以上のことより、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

影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、本組換えワタの競合における優位性に起因して生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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

ワタには、他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。有害物質の産生性に関して、後作試験、土壌微生物相試験、鋤込み試験を行ったが、いずれの試験においても本組換えワタと非組換えワタとの間に有意差は認められず、本組換えワタには意図しない有害物質は産生されていないと判断された。

さらに我が国では、ワタの商業栽培は殆ど行われておらず、本組換えワタの種子を栽培のために販売する予定はないため、本組換えワタが有害物質を産生して野生動植物等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、輸送中に温度・水分条件が生育に適した土地に落ちて生育した場合が想定された。しかし、現在までにワタの種子がこぼれ落ちて、我が国の自然条件下で生育したという報告はされていない。

本組換えワタには、選抜マーカーとして使用したPAT蛋白質を産生する性質が付与されている。しかし、PAT蛋白質は有害物質としては知られておらず、また、PAT蛋白質が他の代謝系に関与するとは考えられていない。

また、本組換えワタには、チョウ目害虫抵抗性を示す改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質を産生する性質が付与されているため、本組換えワタの花粉により非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念されるが、仮に生育したとしてもワタの花粉は比較的重く、粘着性があるため飛散する可能性は少ない。したがって、ワタを摂食しない非標的チョウ目昆虫種が本組換えワタの花粉に曝露される可能性は低いと考えられる。

以上のことより、本組換えワタにおいて、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

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

３　交雑性

（１）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本組換えワタと交雑可能な近縁野生種は我が国には存在しないことから、本組換えワタの交雑性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かった。

（２）影響の具体的内容の評価

――

（３）影響の生じやすさの評価

――

（４）生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えワタの交雑性に起因する生物多様性への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

本組換えワタにおいては、上記の他に生物多様性影響評価を行うことが適切であると考えられる性質は認められなかった。

第三　生物多様性影響の総合的評価

本組換えワタの育種には、一般的に行われている自家受粉による系統育種法により行った。まず、F2世代においてPCR法により改変型*cry1F*及び改変型*cry1Ac*遺伝子をもつ株を特定し、両遺伝子をもたない株を開花前に除去した。次に、開花した株において自家受粉を行い、F3世代を得た。これを繰り返すことにより、優性ホモ個体の割合を高めることができ、商品化するF7世代では、調べた368種子すべてが、改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質をともに発現した。したがって、商品化する本組換えワタは親系統に分離する可能性は低いと考えられ、項目ごとの生物多様性影響の評価においては、本組換えワタによる生物多様性影響の評価を行った。

我が国では、本組換えワタの種子を栽培のために販売する予定はなく、ワタの商業栽培は行われていない。さらに、我が国には本組換えワタと交雑可能な*Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていない。本組換えワタが野生動植物等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生育に適した土地に落ちて、生育した場合が想定されるが、我が国の自然条件下で生育したという報告はされていない。

競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、種子の生産量・脱粒性・休眠性・発芽率について、本組換えワタと非組換えワタを比較した。その結果、いずれの項目においても組換え遺伝子に起因すると考えられる差異は認められなかった。

また、本組換えワタはチョウ目害虫に抵抗性を示すが、栽培作物であるワタが本形質を付与されたことにより、自然環境下で発芽し、自生化できるほど競合における優位性が高まることはないと考えられる。また、本組換えワタは選抜マーカーとして使用したPAT蛋白質が発現しているが、自然環境下で除草剤グルホシネートが使用されることはないため、本形質が付与されたことにより、競合における優位性が高まることはないと考えられる。

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

有害物質の産生性に関して、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相への影響試験を行った結果、本組換えワタと非組換えワタの間に意図しない差異は認められなかった。本組換えワタの中には改変型Cry1F及び改変型Cry1Ac蛋白質が発現しているため、本組換えワタの花粉による非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念される。しかし、ワタの花粉は比較的重く、

粘着性があるため飛散する可能性が低く、ワタを直接摂食しない非標的昆虫種が本組換えワタの花粉に曝露される可能性は低いと判断された。また、本組換えワタは選抜マーカーとして使用したPAT蛋白質が発現しているが、PAT蛋白質は高い基質特異性をもっているため、新たに有害物質を産生し、自然環境下において野生動植物等に影響を及ぼすとは考えられない。

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

我が国において本組換えワタの栽培予定はなく、*Gossypium hirsutum* と交雑可能な近縁野生種は我が国には自生していない。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、本組換えワタを、第一種使用規程に従って使用した場合、我が国の生物多様性へ影響を生ずるおそれはないと判断した。

参 考 文 献

1 American Academy of Microbiology (2002) *100 Years of Bacillus thuringiensis: A critical scientific assessment*. American Society of Microbiology. Cornell University Press.

2 Barker RF, Idler KB, Thompson DV, Kemp JD (1983) Nucleotide sequence of the T-DNA region from the Agrobacterium tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* **2,** 335-350.

3 Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992) Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Molecular Biology* 18, 675-689.

4 Cotton Australia. (2003). 'How to Grow Cotton'.

5 Cotton Australia. (2005). 'World Cotton History'

6 Eastick R (2002) The Potential weediness of transgenic cotton in Northern Australia. CSIRO.

7 Eckes P, Vijtewaal B, Donn G (1989) Synthetic gene confers resistance to the broad spectrum herbicide L-phosphinothricin in plants. Journal of Cell Biochemistry 13D, 334.

8 Ellis JG, Llewellyn DJ, Walker JC, Dennis ES, Peacock WJ (1987) The OCS element: a 16 base pair palindrome essential for activity of the octopine synthase enhancer. *EMBO J.* **6,** 3203-3208.

9 FAO (2004) 'FAOSTAT Database., Food Balance Sheet.'

10 Fryxell, P.A. 1984. 'Taxonomy and Germplasm resources.' Cotton, Agronomy No. 24, p 27-57, Soil Science Society of America, Inc. Winsconsin. USA.

11 Govila, O.P. and Rao, C.H. (1969). Studies on the in vitro germination and storage of cotton pollen. *Journal of Palynology.* Vol 5 pp 37-41.

12 Lee, J.A., 1984. Cotton, Soil Science Society of America, Inc., Agronomy Series No. 24. pp.1-25.Univ. of Wisconsin Press; Kobel, R.J. and Lewis, C.F, eds.

13 National Cotton Council. (2005). Cotton Export Data. www.cotton.org.

14 OECD (2004) 'Consensus Document on compositional considerations for new varieties of Cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and Anti-nutrients.'

15 Office of the Gene Technology Regulator (2002) 'The biology and ecology of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Australia.' (OGTR, Canberra, Australia)

16 Prietro-Samsónov DL, *et al.* (1997) 'Bacillus thuringiensis: from biodiversity to biotechnology.' *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **19**. 202-219.

17 Schmidhauser, T.J., Helinski DR (1985) Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 164, 446-455.

18 Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, D. H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp. 775-806

19 Thompson CJ, Rao Movva N, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwerys M, Botterman J (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus. EMBO J.* **6,** 2519-2523.

20 Umbeck, P. F.; Barton, K. A.; Nordheim, E. V.; McCarty, J. C.; Parrott, W. L.; Jenkins, J. N. (1991). Degree of pollen dispersal by insects from a field test of genetically engineered cotton. J. Econ. Entomol. 84: 1943-1950.

21 Waddle, B.A..1984. 'Crop Growing Practices', Cotton, Agronomy No. 24, p 233-263, Soil Science Society of America, Inc. Winsconsin. USA.

22 学研学習事典データベース（1999).

23 財務省　(2005)「輸入統計」http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm.

24 農学大事典　訂正追補版　野口弥吉 監修. 1977　株式会社　養賢堂発行.

25 Myer RO and McDowell LR (2003) Potential for gossypol toxicity when feeding whole cottonseed to beef cattle.　AN130, Animal Science Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida.

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合）

平成16年12月10日

氏名　ダウ・ケミカル日本株式会社
代表取締役　モンティー・ベイヤー
住所　東京都品川区東品川２丁目２番24号

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ルホシネート耐性ワタ(*cry1F*, *cry1Ac, pat*, *Gossypium hirsutum* L.) (281×3006, OECD UI：DAS-24236-5×DAS-21Ø23-5) (以下、本組換えワタ)について、第一種使用規程に従った使用が承認された場合においても、今後、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合には、当該影響を効果的に防止するため、以下の措置をとることとする。

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

ダウ・ケミカル日本株式会社内に、緊急措置に適切に対応するための危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、代表取締役を本部長とし、広報部、業務部、登録部の部門長から構成される。同時に、危機対策本部並びに本組換えワタの開発社である米国ダウ・アグロサイエンス社との円滑な連絡を確保するための連絡窓口を設置し、登録部長が責任者となる。

２　第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社と連絡をとり、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

米国ダウ・アグロサイエンス社は、販売した種子の購入者及び穀物取扱い業者、ワタの栽培者が加入する団体に対して、広く情報を提供するための連絡体制を保有している。したがって、今後、本組換えワタが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、これらの連絡体制を使って、関係各者と連絡を取る。

また、必要に応じて、日本国内の主要３紙並びに、ダウ・ケミカル日本株式会社のホームページ上に、本件について通知するための記事を掲載する。

４　遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を取り、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

今後、本組換えワタが我が国の生物多様性に影響を与えるおそれがあると科学的根拠に基づき立証された場合には、弊社は、米国ダウ・アグロサイエンス社とともに、日本向けに輸出している穀物取扱い業者及び種子取扱い業者に対して不活化及び拡散防止措置を講じるように通知する。

５　農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的正当性のある根拠に基づき、本組換えワタが我が国の生物多様に性影響を与えるおそれがあると認められた場合には、弊社は、速やかに農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための体制及び連絡窓口を報告する。

以上

添付資料の一覧

添付資料１：　改変型 Cry1F 蛋白質及び改変型 Cry1Ac 蛋白質の殺虫スペクトル及び非標的生物に対する影響
（社外秘情報につき非公開）

添付資料２：　ワタ 281 の挿入遺伝子塩基配列及び隣接領域配列
（社外秘情報につき非公開）

添付資料３：　ワタ 3006 の挿入遺伝子塩基配列及び隣接領域配列
（社外秘情報につき非公開）

添付資料４：　F2 世代における形質分離
（社外秘情報につき非公開）

添付資料５：　移入した核酸のコピー数及び複数世代における安定性の確認
（社外秘情報につき非公開）

添付資料６：　本組換えワタの検出法
（社外秘情報につき非公開）

隔離ほ場試験報告書：チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ワタの隔離ほ場における安全性評価試験報告書
（社外秘情報につき非公開）

１．目的
２．試験方法
　１）供試材料
　２）耕種概要
　３）試験設計
３．試験経過の概要
　１）気象の概要
　２）生育の概況
４．試験成績
　１）形態及び生育に関する特性
　２）導入遺伝子の発現確認
　３）自然交雑率
　４）雑草性
　５）病害虫への感受性の差異
　６）飛来昆虫相（開花期）
　７）有害物質の産生性
５．結論