

除草剤グルホシネート耐性及びチヨウ目害虫抵抗性ワタ
 (改変*bar*, 改変*cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.)
 (LLCotton25×15985, OECD UI :ACS-GH001-3×MON-15985-7) 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	
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	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	
(1) 供与核酸に関する情報	6
(2) ベクターに関する情報	12
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	17
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性	20
(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	25
(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	30
(2) 使用等の方法	30
(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	30
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を 防止するための措置	30
(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	30
(6) 国外における使用等に関する情報	30
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	34
2 有害物質の産生性	35
3 交雑性	36
4 その他の性質	37
第三 生物多様性影響の総合的評価	38
参考文献	40
別添資料の内容	40
緊急措置計画書の概要	41

第一種使用規程承認申請書

平成18年6月14日

農林水産大臣 中川 昭一 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者 代表取締役社長 ジョン グレイ 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5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	除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ (改変 <i>bar</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , <i>cry2Ab</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (LLCotton25×15985, OECD UI:ACS-GH001-3×MON-15985-7)
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、陸地綿

英名：Upland Cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

ロ 宿主の品種名

除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ(改変 *bar*, 改変 *cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (LLCotton25×15985, OECD UI: ACS-GH001-3×MON-15985-7) (以下、「本スタックワタ」とする。)は、除草剤グルホシネート耐性ワタ(改変 *bar*, *Gossypium hirsutum* L.) (LLCotton25, OECD UI: ACS-GH001-3) (以下、「LLCotton25」とする。)とチョウ目害虫抵抗性ワタ(改変 *cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (15985, OECD UI: MON-15985-7) (以下、「15985」とする。)を交雑育種法で掛け合わせることで作出された。

親系統である LLCotton25 の宿主は四倍体栽培ワタ (*Gossypium hirsutum* L.) の品種 Coker312 であり、SEEDCO Corporation, Texas 社の米国保護品種である。Coker312 は Coker100 と D&PL-15 の交配後代より系統育種法により選抜された(文献 16)。また、15985 の宿主は、*Gossypium hirsutum* 種に属する組換えワタ品種 DP50B である。DP50B は、*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 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(改変 *cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.) (531, OECD UI: MON-00531-6) (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商業品種である。なお、531 の宿主品種は LLCotton25 と同じく Coker312 である。

ハ 国内及び国外の自然環境における自生地域

我が国の自然環境下において、*G. hirsutum* を含め四倍体栽培ワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の分布は報告されていない。

国外においては、*Gossypium* 属は 30 余種が知られているが、そのうち栽培種は、旧大陸の栽培アジア綿と総称される二倍体の *G. herbaceum* 及び *G. arboreum*、また、

世界で最も広く栽培されている四倍体の *G. hirsutum*、同じく四倍体で長繊維種の *G. barbadense* の計 4 種である (文献 11)。また、野生二倍体種は、地理的分布によりオーストラリア群 11 種、アフリカ・アラビア群 8 種、アメリカ群 12 種に分けられる。さらに、野生四倍体種は熱帯地方に分布しており、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. darwinii* (ガラパゴス)、*G. mustelinum* (ブラジル北東部)、*G. hirsutum*、*G. lanceolatum* (熱帯/亜熱帯アメリカ)、及び *G. barbadense* (南アメリカ) がある (文献 7)。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国外及び国内における第一種使用等の歴史

ワタは数千年間その繊維を得るために栽培されてきた。パキスタンのモヘンジョダロ遺跡から紀元前 3000 年頃の綿布片が発掘されており、その繊維は *G. arboreum* のものであったといわれる。一方、新大陸でも、紀元前 2400 年頃の古代ペルー人の住居跡で *G. barbadense* の種子と原始的織機や織物の破片が発見されている。これらの発見から、古代インド人とペルーのインディオによって別々に綿から織物を作る技術が開発されていたことがうかがわれる。また、メキシコでは紀元前 5800 年頃の洞窟から *G. hirsutum* のさくが発掘され、ワタの栽培利用の歴史はきわめて古いと考えられている (文献 11)。

中南米で栽培された *G. hirsutum* は 1700 年前頃メキシコからアメリカ合衆国に入り、内陸部で一年生の早生種が栽培された。その後 *G. hirsutum* はアメリカ合衆国の主要作物となったが、南北戦争のためにその供給が絶たれたのを機に、世界の熱帯・亜熱帯の諸国に広がった (文献 11)。

我が国における在来の栽培種は *G. arboreum* であり、799 年 (延暦 18 年) に、三河地方に漂着したインド人が伝えた種子を栽培したのが最も古い記録である。その後、16 世紀に入ってから全国的に栽培が広まった (文献 24) が、輸入綿におされて次第に衰微し、第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったが、現在ではその商業的な栽培はなく、僅かに観賞用として作られる程度にすぎない (文献 11)。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

現在、ワタは工芸作物の中で最大の栽培面積を持つ。2003 年の世界におけるワタの生産量は 1953 万 t であり、主な生産国は中国 (520 万 t)、米国 (397 万 t)、インド (210 万 t)、パキスタン (169 万 t)、トルコ (95 万 t)、ウズベキスタン (95 万 t)、ブラジル (73 万 t) である。

2003 年度において、約 16 万 t の採油用の綿実が我が国に輸入されている (文献

18)。綿実の輸入先はオーストラリア、米国の順に多い。また、綿実油は 2003 年度において 7765 t が輸入され、主な輸入先はオーストラリア (53%)、米国 (36%) である。2003 年の綿実油粕の輸入は 9512 t であり、主な輸入先は中国 (64%)、オーストラリア (32%)、米国 (4%) の順であった (文献 2)。

ワタの大規模栽培の畑では機械による収穫が行われるが、その際、葉片などの混入を防ぐために収穫前に薬剤で落葉させる (文献 24)。

ワタは工芸作物の中でも最も重要な位置を占めている。ワタの主な用途はその繊維利用であり、綿花は糸に紡がれる。また、地毛は短いため繊維として利用されず、セルロースや紙の原料とされる。種子は 18~24%の油脂と 16~20%の蛋白質を含み、抽出した油は食用油として、また、搾油粕は家畜の飼料として重要であり、肥料としても需要が高い (文献 24)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ワタは原産地では木本多年生の原始的な栽培系統が存在するが、現在世界で栽培される品種群は一年生の系統に由来する (文献 24)。主茎は直立し、茎長は 0.5~1.5mになる (文献 11)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽の最低温度は 12°C、最適温度は 27°C~36°Cである。また、生育初期の温度は 24°C~30°C、後期ではさらに高温が良いとされる (文献 11)。さらに、無霜期間は 180~200 日以上、年間降雨量は 500mm 以上、生育期間の 40%以上の晴天日が必要である。ワタは酸性に弱いが、アルカリ性に対する適応性が高く、塩分の多いアルカリ性土壌で栽培可能である (文献 24)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖性又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

さくは 3~5 室に分かれており、1 室に 7~8 個の種子を含んでいる。発育にともない水分が減少し、さく皮が裂けて開じよする。ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくく (文献 11)、種子の脱粒性は低い (文献 13)。また、種子の休眠性は

浅く、高湿度条件下では寿命は短い（文献22）。

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発芽特性

ワタは通常、種子繁殖する。自然条件で植物体を再生しうる組織又は器官からの発芽特性があるという報告はこれまでのところない。

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

ワタは基本的に自家受粉植物であるが、訪花昆虫により他家受粉し、他殖率は通常5～30%とされている（文献13）。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。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタは一花からおよそ3万5千個の花粉を生産する（文献26）。ワタの花粉は大型（120～200 μ m, 文献26）で重く、粘性があるため、風で花粉が運ばれることはほとんどなく（文献17）、ハチが最も重要な花粉媒介者である（文献15）。放飼昆虫を用いた異種交配試験により、12mを超えると明らかな花粉移動は見られないという報告がある（文献26）。また、花粉の寿命は12時間程度である（文献22）。

ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

他感物質等のような野生植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生は知られていない。

ト その他の情報

ワタはゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸を生産することが知られている。

ゴシポールは多くの *Gossypium* 属植物に通常認められるテルペン類であり、腺組織に存在する（文献1）。食欲減退、体重減少、消化不良等の問題を引き起こすため、綿実の食品や飼料中のゴシポール濃度を最小限に抑える必要がある（文献3）。ゴシポールは種子全体に遊離した形と、アミノ酸のリシン又は他の成分に結合した形で存在する。結合型のゴシポールは体内で消化されずそのまま排出されるので、動物には無害だと考えられているが、遊離型のゴシポールは有害性が高い（文献10）。

また、ステルクリン酸 (C-19) やマルバリン酸 (C-18) などのシクロプロペン脂肪酸 (綿実油の中に 0.1~1.3%) はワタに通常存在する独特の脂肪酸である。ステルクリン酸やマルバリン酸はそれぞれ 18 と 17 の炭素鎖長を持ち、プロペン環に 1 個の 2 重結合を含む。シクロプロペン脂肪酸は食品や飼料において有害であるためその含量を最小にしなければならない (文献 5, 21)。このシクロプロペン脂肪酸はステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害し、その結果膜の浸透性が変化する。ステルクリン酸を (25mg/日) で産卵鶏に摂取させると卵がピンク色になってしまう。これらの脂肪酸は水素添加や 230~235°C での脱臭時に不活性化または油から除去される (文献 10)。

しかし、綿実は大量の繊維に覆われているために鳥類のような種子を摂食する動物は好まず、哺乳類もゴシポールが含まれていることや種子の形態により摂食は避けると考えられる。また、野生の哺乳動物が綿実を摂食するという例も報告されていない。したがって、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸は他感物質等の野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす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

本スタックワタの親品種である LLCotton25 はバイエル クロップサイエンス社において、15985 は米国モンサント社においてそれぞれ開発された遺伝子組換えワタである。

我が国において、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 2 項の規定に基づき、LLCotton25 は 2006 年 2 月 10 日に、また、15985 は 2004 年 12 月 10 日に、それぞれ第一種使用規程の承認が得られた。

なお、15985 に関する以下の記述は、公表されている生物多様性影響評価書の概要等の資料を引用した。15985 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ワタ品種 DP50B に、新たに *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の *cry2Ab* 遺伝子を導入することにより育成された。

イ 構成及び構成要素の由来

各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を、LLCotton25 は表 1 (p. 7) に、531 は表 2 (p. 8) に、15985 は表 3 (p. 9) にそれぞれ示した。

表 1 LLCotton25 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

構成要素	サイズ (bp)	ベクター 上の位置 (bp)	由来及び機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット			
P35S3	1385	250-1634	カリフラワーモザイクウイルスの 35S プロモーター領域で、転写を開始させる (文献 19)。
改変 <i>bar</i> *	552	1635-2186	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の bialaphos resistance (<i>bar</i>) 遺伝子で、改変 PAT 蛋白質をコードし、除草剤グルホシネート耐性を付与する (文献 25)。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の 2 つのコドンは ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
3'nos	260	2206-2465	pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域で、転写を終結させ、3'ポリアダニル化を生じさせる (文献 6)。
その他の構成要素			
RB	25	198-222	TiB6S3 由来の T-DNA の右側境界反復配列 (文献 8)。
LB	25	2519-2543	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界反復配列 (文献 8)。
<i>aadA</i>	2075	2544-4618	トランスポゾン Tn7 由来のストレプトマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子 (文献 14) を含む配列。
pVS1ori	3780	4619-8389	<i>Pseudomonas</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点 (文献 12)。
ColE1	1165	8390-9555	プラスミド pBR322 由来の複製起点 ColE1 ori を含む配列 (文献 4)。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

* *Streptomyces hygroscopicus* から得た野生型の *bar* 遺伝子は、植物で使用されるコドンに適合するように GTG→ATG に、また、翻訳の効率を上げるために AGC→GAC に改変した。GTG→ATG の改変では実際に翻訳されるアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC→GAC の改変により、セリンからアスパラギン酸に変化している。しかし、本改変によって改変 *bar* 遺伝子産物である PAT 蛋白質 (以下、「改変 PAT 蛋白質」とする。) の機能に変化はないことが確認されている (文献 20, 25, 27)。

表 2 531 の作出に用いられたベクターPV-GHBK04 の構成要素の由来及び機能

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>krustaki</i> の産生する野生型 <i>Cry1Ac</i> 蛋白質と 99.4% のアミノ酸配列の相同性を持つ蛋白質をコードする。
7S 3'	ダイズの β -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>npt II</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>npt II</i>	<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フोट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。転写を終結させる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>Ataphylococcus aureus</i> 由来の 3''(9)-0-アデノグリコシドアデニルトランスフェラーゼ (AAD) をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
<i>oriV</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する <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。

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985ap.pdf より抜粋)

表 3 15985 の作出に用いられたベクターPV-GHBK11L の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<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。
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>cry2Ab</i> 遺伝子発現カセット	
E35S	2 重エンハンサーをもつ、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。なお、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。

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985ap.pdf より抜粋)

ロ 構成要素の機能

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

LLCotton25、531 及び 15985 の作出に用いられた供与核酸の構成要素それぞれの機能は、表 1 (p. 7)、表 2 (p. 8) 及び表 3 (p. 9) にそれぞれ示した。

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 *bar* 遺伝子】

作物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、作物は枯死に至る。

導入された改変 *bar* 遺伝子がコードするホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素（改変 PAT 蛋白質）は、グルホシネートをアセチル化して N-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても作物が枯死しない。

改変 PAT 蛋白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い親和性を示すが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造の類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生じさせることはない（文献 25）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても改変 PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル基転移反応は阻害されることはなかった（文献 20, 27）。

改変 *bar* 遺伝子産物のアミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索 (Swiss Prot, trEMBL, GeneSeq-Prot, PIR, PDB, DAD, GenPept) 及びアレルギーエピトープ検索を行った。その結果、本蛋白質は既知の毒素及びアレルギーとの相同性は示さなかった。

【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。15985 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 Bt 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、15985 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、Cry II B、CryB2 又は Cry II Ab と呼ばれている。Cry2Ab 蛋白質は、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 (*Helicoverpa 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 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】

15985 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。改変 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。一方、Cry2Ab 蛋白質は上記の改変 Cry1Ac 蛋白質が殺虫活性を示すチョウ目害虫に加えて、ヨトウムシ類 (Fall Armyworm、Beet Armyworm) やアオムシ類 (Soybean Looper) に対しても殺虫活性を示す。したがって、改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質の両蛋白質を発現する 15985 は Tobacco budworm (*Heliothis virescens*)、Pink bollworm (*Pectinophora gossypiella*)、Cotton bollworm (*Helicoverpa zea*)、ヨトウムシ類 (Fall Armyworm、Beet Armyworm) そしてアオムシ類 (Soybean Looper) に対して殺虫活性を示すことになる。また、両 Bt 蛋白質に対して感受性を示す Tobacco budworm (*Heliothis virescens*) を用いて、531 と 15985 の殺虫効果を比較したところ、15985 の殺虫効果 {15985、531 それぞれの粉末を 0.2% 寒天溶液で 20,000 倍に希釈したものを、孵化して 12~24 時間後の Tobacco budworm の幼虫に摂食させた後、3 齢期まで生存した割合を % で出し、その生存率をあらかじめ作成しておいた標準曲線を用いて改変 Cry1Ac 蛋白質濃度 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重) に換算することにより導かれる} が 531 に比べ約 4 倍近いことが確認された (文献 9)。なお、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害虫になれないと考えられている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

—

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

LLCotton25 の作出に用いたプラスミドベクター pGSV71 は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pBR322 (文献 4) 及び緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のプラスミドベクター pVS1 (文献 12) を基に構築された (文献 23)。531 及び 15985 の作出に用いられたベクターは、プラスミド pBR322 に由来する。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

LLCotton25 の作出に用いられたベクターpGSV71 の塩基数は 9555bp であり、プラスミド地図及び制限酵素切断部位を図 1 (p. 14) に示した。

531 の作出に用いられたベクターPV-GHBK04 及び 15985 の作出に用いられたベクターPV-GHBK11 の全塩基数は、それぞれ 11407bp と 8718bp である。プラスミド地図及び制限酵素切断部位をそれぞれ図 2 (p. 15) 及び図 3 (p. 16) に示した。

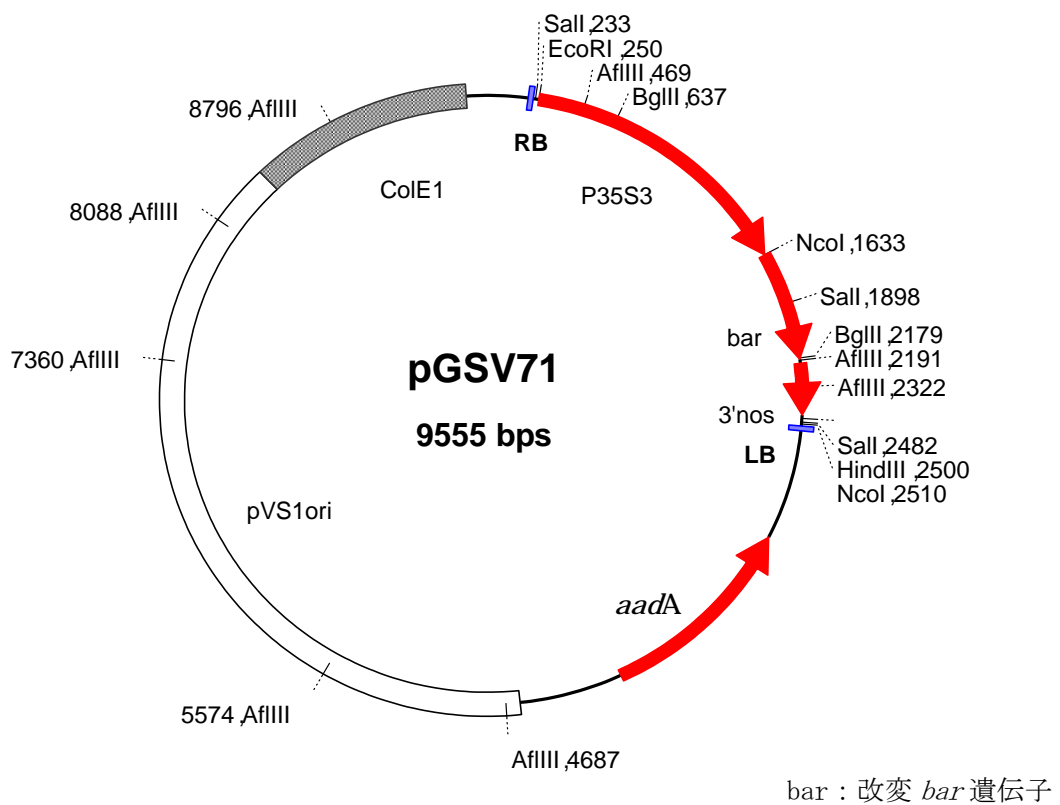


図1 LLCotton25の作出に用いたプラスミド pGSV71の地図及び制限酵素切断部位
 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

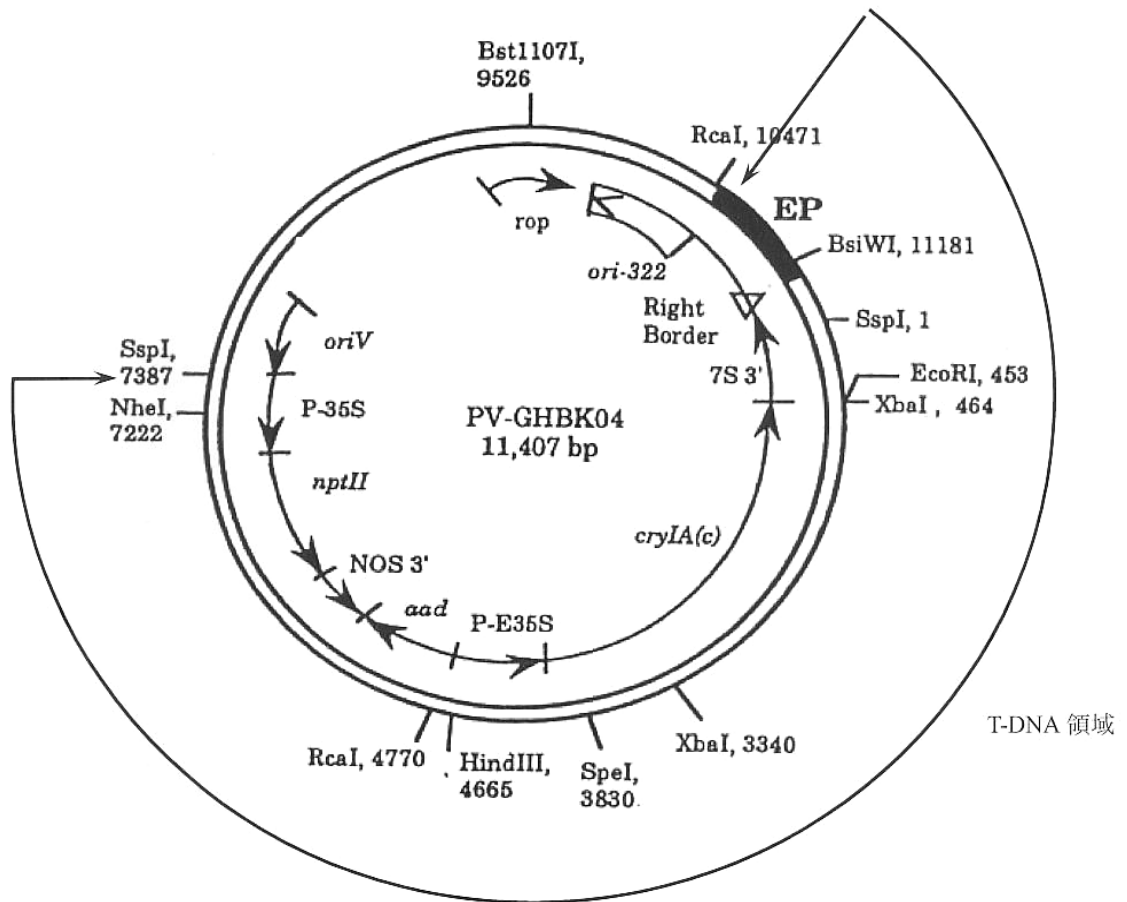


図2 531の作出に用いたプラスミドPV-GHBK04の地図及び制限酵素切断部位
 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985_1445ap.pdfより抜粋)

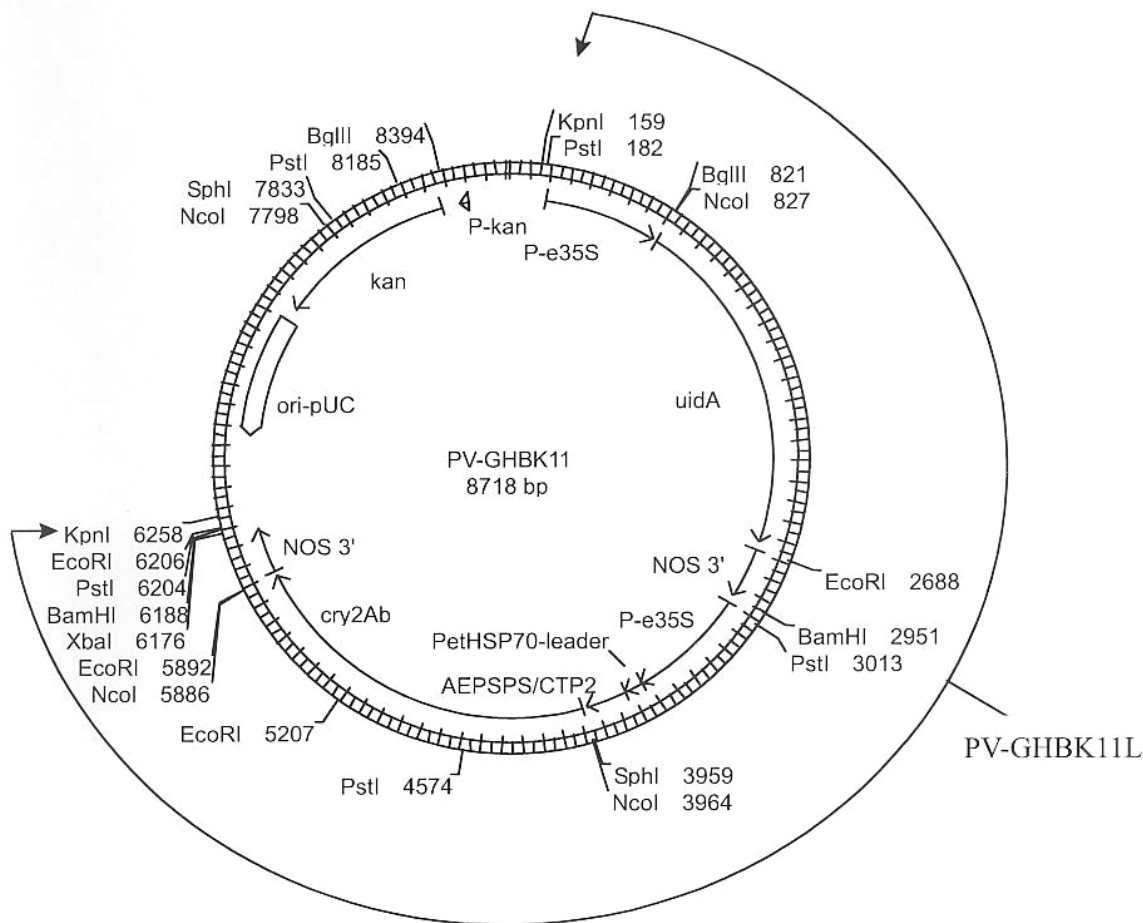


図3 15985の作出に用いたプラスミドPV-GHBK11の地図及び制限酵素切断部位
 (http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985_1445ap.pdfより抜粋)

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

LLCotton25 の形質転換に用いたプラスミド pGSV71 はストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子(大腸菌由来 *aadA* 遺伝子) (文献 14) を持つ。*aadA* 遺伝子は、大腸菌を用いて形質転換用プラスミド pGSV71 を構築する際に選択マーカーとして用いられたもので、この遺伝子は植物で機能するプロモーターを持たないため、植物での発現は考えられない。さらに、プラスミド pGSV71 は大腸菌のプラスミド pBR322 由来複製起点 ColE1ori 及び緑膿菌のプラスミドベクター pVS1 の複製起点 pVS1ori を有するが、これらはそれぞれ大腸菌及び緑膿菌において自律的複製を行わせる機能を有するが、植物中においては機能しない。これらの配列は T-DNA 領域の外側に位置しており、植物体内には導入されていないことがサザンブロット解析により確認されている。

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

—

(3) 遺伝子組換え植物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

LLCotton25、531 及び 15985 それぞれの作出に用い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切断部位については、それぞれ図 1 (p. 14)、図 2 (p. 15) 及び図 3 (p. 16) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

LLCotton25 の作出では、従来ワタ品種 Coker312 へのプラスミド pGSV71 の導入はアグロバクテリウム法を用いて行われた。Coker312 の幼体から切除した組織片(胚軸から幼根までの領域)を Ti プラスミド pGV3000 とバイナリーベクター pGSV71 を含む *A. tumefaciens* の培養液に曝露して感染させ、プラスミド pGSV71 上にある RB 及び LB で挟まれた T-DNA 領域をワタゲノムに組み込ませた。

531 の宿主である従来ワタ品種 Coker312 へのベクター PV-GHBK04 の導入は、アグロバクテリウム法により行なわれた。

15985 の宿主である組換えワタ品種 DP50B への PV-GHBK11L の導入は、パーティクルガン法により行なわれた。なお、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。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

LLCotton25については、再生培地に移して組織片を完全な植物体まで再生させ、さらにグルホシネートを含む再生培地を用いてグルホシネート耐性株を選抜した。

531については、アグロバクテリウム法によりベクターPV-GHBK04中のT-DNA領域をCoker312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。

15985については、531と非組換えワタ品種DP50との間で交配を繰り返して得られた組換えワタ品種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。

② アグロバクテリウム菌体の残存の有無

LLCotton25については、アグロバクテリウム菌体はclaforanを加えた再生培地によって除去されている。

531については、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再生培地に移して培養した。

③ 育成の経過及び系統樹

LLCotton25については、得られた再生個体について選抜育種を行い、改変PAT蛋白質の発現量や農業形質等を総合的に判断してLLCotton25が選抜された。

531については、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さらに選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外ほ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531が選抜された。

15985については、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、さらに選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外ほ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15985が選抜された。

本スタックワタは、LLCotton25と15985を交雑育種法で掛け合わせることで作出された。LLCotton25及び15985に品種Aで戻し交配を繰り返し、遺伝的背景に品種Aを導入した後、両系統を交配させた。その後、自殖を繰り返し、本スタックワタを得た。

育成の経過を図4(p.20)に示した。

なお、LLCotton25、531及び15985の我が国における承認状況は以下の通りである。

LLCotton25

2004年6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

査基準の手續第三条第二項の規定に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

2006年2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續き第4条の規定に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

2006年2月 農林水産省より、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項の規程に基づき、我が国への輸入（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）の安全性確認を受けた。

531

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利用のための指針」に基づき、我が国への輸入（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確認を受けた。

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續き」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

2004年11月 農林水産省より「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」の規程に基づき、輸入（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）の安全性確認を受けた。

15985

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利用のための指針」に基づき、我が国への輸入（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。
- 2004年12月 農林水産省より「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」の規程に基づき、輸入（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）の安全性確認を受けた。

社外秘情報につき非公開

図4 本スタックワタの育成経過

(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 移入された核酸の複製物が存在する場所

LLCotton25の形質転換次代(T1)及び戻し交配第一代(BC1F1)において、単一優性遺伝子座で予想される分離比(除草剤グルホシネート耐性:感受性がそれぞれ、T1世代3:1、BC1F1世代1:1)に適合する分離を示したことから、挿入遺伝子は染色体上の1ヶ所に存在すると考えられる。

531については、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、本組換えワタのゲノムDNA中に存在していることが明らかにされている。

15985については、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。

ロ 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

LLCotton25には1コピーの核酸の複製物が移入されており、導入された核酸の複数世代における伝達の安定性については、既に生物多様性影響評価において確認されている。

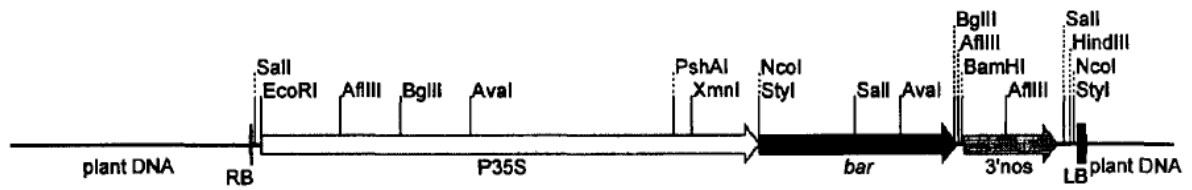
531には改変 *cryIAc* 遺伝子発現カセット、*npt II* 遺伝子発現カセットそして *aad* 遺伝子発現カセットより構成される第1挿入遺伝子と、第1挿入遺伝子の5'末端側に逆向きに隣接し、改変 *cryIAc* 遺伝子の3'領域断片と7S3'ターミネーターより構成される第2挿入遺伝子、そして第3挿入遺伝子として245bpの7S3'ター

ミネーター断片が存在していることが明らかとなった。また、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、サザンブロット分析により明らかとなった。なお、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ない。この理由としては、隣接して挿入されている第一並びに第二挿入遺伝子に対して、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、自殖系統である R5 及び R6 世代ではそのまま残ったが、商業品種では戻し交配を行う過程で分離したことが考えられた。この分離した第 3 挿入遺伝子は転写を終結させる因子である 7S3' 配列の断片であるために、本組換えワタにおけるチョウ目害虫抵抗性には寄与していない。したがって、第三挿入遺伝子は戻し交配による育種が行われている間の選抜の対象にはなっていなかった。

15985 には 1 コピーの核酸の複製物が移入されており、複数世代における伝達の安定性については、既に生物多様性影響評価において確認されている。

それぞれに移入された T-DNA 領域を図 5、6 及び 7 に図示した (p. 22)。

本スタックワタ (F6 世代) については、本スタックワタに導入された改変 *bar* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び *cry2Ab* 遺伝子がそれぞれ発現する改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質の発現量を ELISA 法によりそれぞれ LLCotton25、531 及び 15985 と比較したが、いずれも有意差は認められず (表 6、p. 25 及び別添資料 3)、本スタックワタにおいて改変 *bar* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び *cry2Ab* 遺伝子が親系統と同程度に発現していることが確認された。



bar : 改変 *bar* 遺伝子

図5 LLcotton25 の挿入遺伝子地図

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

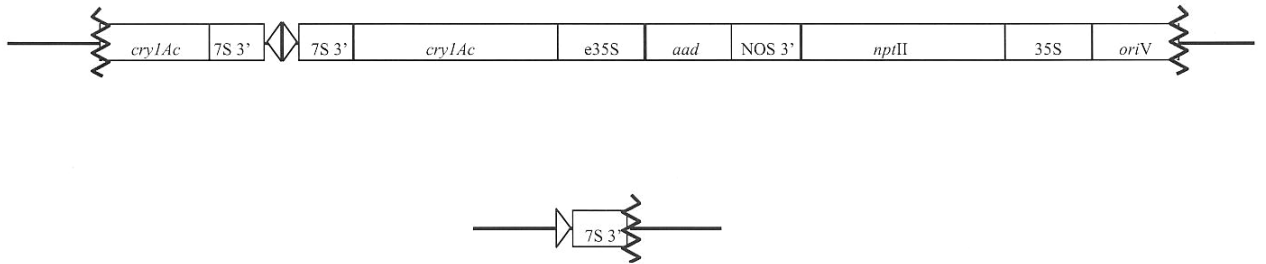


図6 531 の挿入遺伝子地図

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985ap.pdf より抜粋)

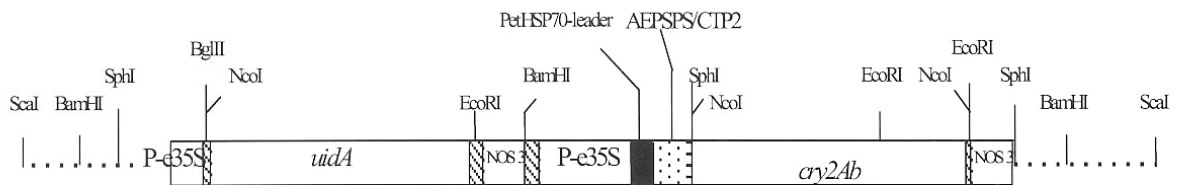


図7 15985 の挿入遺伝子地図

(http://www.bch.biodic.go.jp/download/lmo/public_comment/15985ap.pdf より抜粋)

ハ 染色体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

—

ニ (6) のイ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

LLCotton25 については、除草剤グルホシネート散布による個体間及び世代間の安定性が確認されている。また、ELISA 法により種子、リント皮及び綿毛における改変 PAT 蛋白質が測定されており、これらの組織で発現していることが確認されている。

531 における改変 Cry1Ac 蛋白質の発現の安定性は、育種過程における選抜の際に ELISA 分析により確認している。

15985 については、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。なお、15985 中には改変 Cry1Ac 蛋白質と 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 とその宿主である 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ず、改変 Cry1Ac 蛋白質と Cry2Ab 蛋白質が 15985 中で互いに相互作用を示すことは認められていない。なお、NPT II 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。

本スタックワタについては、除草剤グルホシネート耐性については除草剤グルホシネート散布試験 (表 4, p. 24 及び別添資料 1)、チョウ目害虫抵抗性については標的昆虫への給餌試験 (表 5, p. 25 及び別添資料 2) を行い、それぞれ親系統と比較した。また、本スタックワタにおける改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質を ELISA 法により測定し、それぞれの発現量を親系統における発現量と比較した (表 6, p. 25 及び別添資料 3)。

除草剤グルホシネート耐性に関しては、本スタックワタ (F6 世代)、LLCotton25 及び非組換えワタに 4 段階に希釈した除草剤グルホシネート (1x、8x、16x 及び 32x) を散布し、各濃度における除草剤グルホシネートに対する薬害程度を調査した。その結果、いずれの濃度においても本スタックワタと LLCotton25 の間に有意差は認められなかった (表 4, p. 24 及び別添資料 1)。

また、チョウ目害虫抵抗性に関しては、本スタックワタ (BC3F5 世代)、15985 及び非組換えワタの着蕾初期及び中期の花蕾を Cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) の幼虫に食べさせ、3 日後及び 6 日後の致死率を測定した。その結果、着蕾初期の花蕾を給餌した 3 日後及び 6 日後において、本スタックワタと 15985 の間に有意差は認められなかった。他方、着蕾中期の花蕾を給餌した 3 日後の致死率は本スタックワタがやや高く有意差が認められたが、6 日後には有意差は認められなかった (表 5, p. 25 及び別添資料 2)。よって、本調査でみられた有意差は常に認められるものではなく、本スタックワタと 15985 の標的昆虫に対する殺虫効果は同程度と考えられる。

さらに、本スタックワタ (F6 世代)、LLCotton25 及び 15985 の葉において、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質、改変 PAT 蛋白質の発現量をそれぞれ ELISA 法で定量した。その結果、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質量に関して、本スタックワタと 15985 の間に有意差は認められなかった。また、改変 PAT 蛋白質量に関して、本スタックワタと LLCotton25 の間に有意差は認められなかった (表 6, p. 25 及び別添資料 3)。

以上のことから、本スタックワタにおいて、改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質はそれぞれの親系統と同程度に発現しており、これらの蛋白質が相互に影響し、形質発現に影響を及ぼすことはないと考えられる。

表 4 除草剤グルホシネートに対する薬害程度の比較

系統名	薬害程度 ¹ (平均値±標準偏差)			
	1 倍	8 倍	16 倍	32 倍
本スタックワタ	1.0±0.4	3.4±0.7	3.7±0.5	4.0±0.0
LLCotton25	0.5±1.4	3.7±0.5	3.7±0.5	3.9±0.3
有意差検定	ns	ns	ns	ns
非組換えワタ	4.9±0.3	5.0±0.0	5.0±0.0	5.0±0.0

統計手法：t-検定、ns：5%水準で有意差なし

¹薬害程度の評価方法 (達観評価)：

- 0；薬害<10%、子葉のクチクラに痕跡程度の青銅色化
- 1；10-20%の薬害、子葉に中程度の青銅色化、本葉に痕跡程度の変化
- 2；21-40%の薬害、子葉に中程度の青銅色化、本葉に少しの変化と巻き上がり
- 3；41-60%の薬害、子葉に中程度から激しい青銅色化、本葉に中程度の変化と巻き上がり
- 4；61-80%の薬害、子葉及び本葉に中程度から激しい変化、巻き上がり壊死
- 5；81-100%の薬害、子葉及び本葉に激しい白化、壊死、落葉

²薬量：1 倍；除草剤グルホシネート約 884g/ha に相当、8 倍；約 7072g/ha に相当、16 倍；約 14144g/ha に相当、32 倍；約 28288g/ha に相当

散布方法：温室内で 2005 年 11 月 15 日に 4 インチポットに播種した。同年 12 月 9 日に 2~3 葉期の各系統の植物体に 4 種類の濃度の除草剤グルホシネートを散布し、12 月 12 日にその薬害程度を評価した。各系統の 1 濃度の散布に 12 株を使用した。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

表5 本スタックワタにおける *Helicoverpa zea* に対する殺虫効果

着蕾初期 ^a	致死率 (平均値±標準偏差) (単位%)	
	3日後	6日後
本スタックワタ	58.3±19.2	99.1±3.9
15985	63.0±23.3	99.1±3.9
有意差検定	ns	ns
非組換えワタ	0.0±0.0	3.7±7.1
着蕾中期 ^b	3日後	6日後
本スタックワタ	61.1±18.1	99.1±3.9
15985	45.4±22.0	90.7±14.3
有意差検定	*	ns
非組換えワタ	0.9±3.9	3.7±7.1

統計手法：マン・ホイットニー-U 検定、*：5%水準で有意、ns：有意差なし

^a：着蕾初期（植え付け後約8週） ^b：着蕾中期（植え付け後約11週）

各系統 9 株を温室内で栽培し、各株から得られた着蕾初期及び中期の花蕾を Cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) に対する殺虫効果の測定に使用した。湿った濾紙を敷いた 6 穴プレートの各穴に 1 個の花蕾とともに 1 匹の *H. zea* の 3 齢幼虫を入れた。3 日後に致死率を計算した後、さらに新しい花蕾を供給し、その 3 日後に再び致死率を計算した。サンプル数としては、各系統 9 株を 2 反復測定し、18 測定値/系統を得た。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

表6 葉 1g における改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質、改変 PAT 蛋白質含量の ELISA による定量

	蛋白質量 (平均値±標準偏差) (µg/g 葉)		
	改変 Cry1Ac	Cry2Ab	改変 PAT
本スタックワタ	1.19±0.2	80.3±12.8	60.9±8.7
15985	1.26±0.2	75.9±12.0	ND
LLCotton25	ND	ND	65.9±10.6
有意差検定 ^a	ns	ns	ns
非組換えワタ	ND	ND	ND

^a：有意差検定は t-検定を用いて、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質においては本スタックワタと 15985 の間で行なった。改変 PAT 蛋白質においては本スタックワタと LLCotton25 の間で行なった。ns：5%水準で有意差なし

サンプル数は各系統の 5 株の葉から 2 反復で抽出し、その抽出物を 2 反復で ELISA 分析を行なった (合計 20 測定値/系統)。

ND：検出せず

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者にある。)

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に伝達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) 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

LLCotton25 に挿入された DNA 及び周辺ゲノム配列を利用した 20mer 及び 21mer のプライマー対を用いた PCR 法によって、本イベントを特異的に識別することが

できる。また、通常 50ng のテンプレート DNA を用いることで効率的に検出できる。LLCotton25 の種子や植物体が極少量あれば検出及び識別は可能であり、反復試験において高い再現性のある結果が得られている。なお、本 PCR 法は実際の LLCotton25 の栽培管理において有効に使用されている。

15985 を検出及び識別するための方法としては、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。

本スタックワタを検出及び識別するためには、1 つの種子又は植物体を上述の 2 方法で分析し、いずれの分析でも陽性の結果が出た場合、本スタックワタであることが確認される。

(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

本スタックワタ中では、改変 *bar* 遺伝子がコードする改変 PAT 蛋白質、改変 *cry1Ac* 遺伝子がコードする改変 Cry1Ac 蛋白質、*cry2Ab* 遺伝子がコードする Cry2Ab 蛋白質が発現し、除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性を示す。

第一、2 (1) ロで述べたように、改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有するため、宿主の代謝系に影響を及ぼすとは考え難い。また、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。さらに、第一、2 (4) ニで述べたように、本スタックワタの形質発現程度について除草剤グルホシネート散布試験及び標的昆虫への給餌試験を行なった結果、それぞれ親系統と同等に発現していることが確認された。また、ELISA 法による蛋白質発現量の測定において、いずれも親系統との間に有意差は認められなかった。以上のことから、これらの 3 つの蛋白質が相互に影響する可能性はないと考えられる。

ロ 以下に挙げる生理学的また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相違の有無及び相違がある場合はその程度

第一、2 (6) イで述べたように、本スタックワタ中において、各親系統に挿入された遺伝子由来の改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質及び改変 PAT 蛋白質は相互に影響する可能性はないと考えられる。したがって、本スタック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、その親系統である LLCotton25

及び 15985 の諸形質を個別に調査した結果を用いて評価することとする。LLCotton25は2003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 T5 世代を用いて隔離ほ場試験を行なった。また、参考として 2000年及び 2001年に米国において行われた LLCotton25 と非組換えワタとの比較試験の結果及び 2001年にフランスで行われた繁殖性試験の結果を用いて評価した。15985の隔離ほ場試験は、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、それぞれ R4 世代と R1 世代の種子を用いて、2004年5月から2005年3月まで行なわれた。また、本隔離ほ場試験は、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 を用いて行なった。なお、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。

① 形態及び生育の特性

LLCotton25については発芽揃い、発芽率、草型、草丈、総分枝数、節数、葉形、葉の大きさ、花色、花の形状、花弁色、開花日、着蕾数、さく（果実）の形状、さくの大きさ、さく当たりの室数及び種子数、開じょ期、繊維色（綿毛色）、種子の色及び形状、収穫期、1株当たりの収穫さく数、未収穫さく数及び総さく数、1さく当たりの新鮮重量、収穫期における地上部及び地下部の重量について、15985については発芽揃い、発芽率、草型、稈長、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株当たりのさく数、未収穫のさく数、さくの室数、さく当たりの種子数、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、それぞれ組換えワタと対照の非組換えワタ間の形態及び生育の特性の差異を調査した。その結果、生物多様性に影響を及ぼすような差異は認められなかった。したがって、本スタックワタにおいて、生物多様性に影響を及ぼすような差異はないと考えられる。

② 生育初期における低温耐性

LLCotton25の幼植物（本葉2葉期）20個体を4℃・12時間日長の人工気象器内に搬入し、経時的に低温に対する反応を調査した結果、搬入6日後には全個体が枯死し、低温耐性は認められなかった。

15985については、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なっていないが、米国の22箇所のは場において翌春発生する自生個体の観察が行なわれている。なお、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なわれており、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 15985 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。

よって、本スタックワタは両親系統と同様に、生育初期の低温耐性は低いと考えられる。

③ 成体の越冬性

ワタは我が国で栽培された場合には、結実後冬季には通常自然に枯死する。

隔離ほ場（露地）で栽培した LLCotton25 の成体は、12 月下旬までの低温及び降霜で完全に枯死し、成体の越冬性は認められず、15985 については、隔離ほ場試験終了時（平成 12 年 11 月 27 日）に部分的に枯死が始まっていることを確認している。

よって、本スタックワタも成体における越冬性を獲得していないと考えられる。

④ 花粉の稔性及びサイズ

我が国においては、ワタの商業栽培はほとんど行なわれておらず、本スタックワタの種子を販売する予定もない。したがって本スタック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我が国の自然条件下でこぼれ落ちて生育あるいは自生化して他の植物を駆逐した場合等が想定された。しかし、花粉に関しては、こぼれ落ちた種子が発芽した後に成体になるまで発生しないことと、これまでに、輸送中にこぼれ落ちた種子が、我が国の自然条件下で生育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なわなかった。

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、LLCotton25 ではさくの大きさ、さく当たりの室数、さく当たりの種子数、種子の形状、1 株当たり未収穫さく数、1 株当たり収穫さく数及び 1 株当たり総さく数について、15985 では 1 株当たりのさく数、さくの室数、さく当たりの種子数について非組換えワタとの間で差異を調査している。その結果、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。

ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくく（文献11）、種子の脱粒性は低い（文献13）。隔離ほ場において、開じょした LLCotton25 のさくの形状は非組換えワタと同様であり、種子は綿毛に覆われていることが確認されている。また、15985 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、自然条件での脱粒性は観察されなかった。したがって、本スタックワタにおいても非組換えワタと差異はないと考えられる。

休眠性に関して、現在の栽培品種は一般に深い休眠性を有していないと報告されている。LLCotton25 の休眠性及び発芽率については、自然交雑率を調べるため隔離ほ場で栽培した LLCotton25 及び非組換えワタから 2003 年 9 月中旬に収穫後室温で保存した種子を同年 10 月 20 日に隔離ほ場内に設置した小型ビニルハウス内に播種した結果、全て容易に発芽した。よって、LLCotton25 と非組換えワタの発芽率は同等であり、種子の休眠性は非組換えワタと同様に浅いと考えられる。

15985 については、米国の 3 ヶ所のほ場試験において収穫された 15985、組換え母本ワタ 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、幾つかの温度条件下では、15985 と対照の組換え母本ワタ DP50B との間で統計的有意差 ($p \leq 0.05$) 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、15985、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。また、発芽率については、第一、2(6)ロ①の形態及び生育の特性で示したように、組換えワタ非組換えワタとの間で差異は認められなかった。

よって、本スタックワタの休眠性及び発芽率についても、非組換えワタと相違はないと考えられる。

⑥ 交雑率

我が国には、本スタックワタが属する四倍体ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑可能な近縁野生種は存在しない。よって、本スタックワタの交雑率については検討を行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

有害物質の産生性に関して、LLCotton25 と非組換えワタとの間で、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった結果、いずれの試験においても有意差は認められなかった。

また、15985 と組換え母本ワタ DP50B 及び非組換えワタ DP50 との間で、鋤込み試験、後作試験、土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験において有意差は認められなかった。

さらに、第一、2(6)イで述べたように、本スタックワタの形質発現程度につ

いて、除草剤グルホシネート耐性に関する生物検定（p. 24, 表 4 及び別添資料 1）及び害虫抵抗性に関する生物検定（p. 25, 表 5 及び別添資料 2）を行なった結果、それぞれ親系統と同等に発現していることが確認された。また、ELISA 法により本スタックワタの改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質量を比較したが、いずれの蛋白質も親系統との間に有意差は認められなかった（p. 25, 表 6 及び別添資料 3）。

以上から、本スタックワタはこれらの蛋白質を併せ持つが、植物体内において、これらの蛋白質が相互に影響し、新たに有害物質を産生する可能性は極めて低いと考えられる。

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) 実験室当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

LLCotton25 の栽培方法、使用方法及び貯蔵方法については、従来のワタの場合と相違はない。

15985 は、1997 年から 1999 年までの 3 年間、米国の 88 ヶ所のほ場において導入遺伝子の発現及び生育特性を評価した結果、対照の組換え母本ワタ DP50B 及び

非組換えワタ DP50 との間で新たに 15985 に挿入された *cry2Ab* 遺伝子及び *uidA* 遺伝子が発現していること以外は、差異は認められなかった。また、病害虫感受性や越冬性に関しても相違は観察されなかった。

LLCotton25、531 及び 15985 の国外における承認状況は以下の通りである。なお、本スタックワタについての個別の承認は米国及びオーストラリアでは要求されていない。

LLCotton25

- | | |
|---------|---|
| 2003年3月 | 米国農務省 (USDA) より、輸入及び栽培の承認を得た。 |
| 2003年4月 | 米国食品医薬品局 (FDA) より、食品及び飼料の安全性が確認された。 |
| 2006年2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許可を得た。 |

531

- | | |
|---------|---|
| 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許可を受けた。 |
| 1995年7月 | 米国農務省 (USDA) より無規制裁培の許可を受けた。 |
| 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許可を受けた。 |
| 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許可を受けた。 |
| 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許可を受けた。 |

15985

- | | |
|----------|--|
| 2001年3月 | 米国環境省 (EPA) は Cry2Ab 蛋白質に対し、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許可を受けた。 |
| 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 |

安全性許可を受けた。

また、LLCotton25、531及び15985の我が国における承認状況は以下の通りである。

LLCotton25

- 2004年6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の第三条第二項の規定に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2006年2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第4条の規定に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。
- 2006年2月 農林水産省より、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項の規程に基づき、我が国への輸入（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）の安全性確認を受けた。

531

- 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利用のための指針」に基づき、我が国への輸入（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確認を受けた。
- 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。
- 2004年11月 農林水産省より「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」の規程に基づき、輸入（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）の安全性確認を受けた。

15985

- 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利用のための指針」に基づき、我が国への輸入（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。
- 2004年12月 農林水産省より「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」の規程に基づき、輸入（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）の安全性確認を受けた。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタックワタは LLCotton25 と 15985 を交雑育種法により掛け合わせた品種であり、それぞれの特性を併せ持つ。第一、2 (6) で述べたとおり、

- ① 改変 PAT 蛋白質は基質特異性が高いこと、
- ② 改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質はいずれも酵素活性を持たず、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられること、
- ③ 生物検定及び ELISA 法によって測定した結果、本スタックワタの除草剤グルホシネート耐性、Cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) に対する抵抗性並びに改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質の発現量について、各親系統と同程度であったこと

から、これらの蛋白質が本スタックワタの植物体内において相互に影響を受ける可能性は考え難く、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられる。

したがって、本スタックワタの生物多様性影響の評価は、LLCotton25 及び 15985 を個別に調査した結果を用いて行なった。

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

本スタックワタの親系統である LLCotton25 及び 15985 の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、生育初期の低温耐性、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、休眠性及び発芽率について、LLCotton25 及び 15985 をそれぞれ非組換えワタとの比較において評価した。その結果、競合における有意性に影響を及ぼすような性質は認められなかった。

また、LLCotton25 は改変 *bar* 遺伝子の発現により除草剤グルホシネートに耐性を示す。しかし、除草剤グルホシネートが頻繁に散布されることのない我が国の自然環境下では、この形質を有することが競合における優位性を高めるものではないと考えられる。他方、15985 に付与されたチョウ目害虫抵抗性は、同種間での競合における優位性をある程度高め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植物であるワタが、本形質を付与されたことによって、自然条件下で自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性が高まるとは考えられない。

本スタックワタは除草剤グルホシネート及びチョウ目害虫の両方の形質を併せ

持つが、これらの形質が相互に影響することはなく、これらの形質を併せ持ったとしても、自然環境下において競合における優位性が高まるとは考えられない。

以上のことから、本スタックワタにおいて、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の判断

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

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

これまでに、ワタが野生動植物等に影響を及ぼすような有害物質等を産生するという報告はない。

我が国では、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、本スタックワタの栽培用種子を販売する予定もないため、本スタック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、輸送中に我が国の自然条件下でこぼれ落ちて生育あるいは自生化して他の植物を駆逐する場合等が想定された。しかし、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。

LLCotton25 及び 15985 の有害物質の産生性について、それぞれ後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった結果、いずれの試験においても非組換えワタとの間に有意差は認められなかった。

本スタックワタは、改変 *bar* 遺伝子の発現により改変 PAT 蛋白質を産生する。しかし、改変 PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しており、植物体内において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ないと考えら

れる（文献 25, 27）。したがって、改変 PAT 蛋白質が宿主の代謝系においてアセチル基を転移し、有害物質を産生することはないと考えられる。また、改変 *bar* 遺伝子産物のアミノ酸配列について、包括的な相同性検索及びアレルゲンエピートプ検索を行った結果、本蛋白質は既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は示さなかった。したがって、改変 PAT 蛋白質が有害物質として、野生動植物等に影響を及ぼすことはないと考えられた。

また、本スタックワタには、チョウ目害虫抵抗性を示す改変 Cry1Ac 蛋白質及び Cry2Ab 蛋白質が発現しているため、花粉による非標的チョウ目昆虫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軽く、粘着性があるため飛散する可能性は少ない。したがってワタを直接摂食しない非標的チョウ目昆虫が本スタックワタの花粉に暴露される可能性は低いと考えられる。

本スタックワタ植物体内において、改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質はいずれも宿主の代謝系に影響を及ぼすことはなく、また、本スタックワタ植物体中におけるこれらの蛋白質の発現について生物検定及び ELISA 法によって測定を行なった結果、各親系統と同程度であったことから、これらの蛋白質が本スタックワタの植物体内において相互に影響を受ける可能性は考え難く、意図せぬ有害物質を産生することは考え難い。

したがって、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した。

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

これまでに、我が国において *G. hirsutum* の自生は報告されておらず、交雑可能な近縁種の自生も報告されていない。したがって、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) 影響の具体的な内容の評価

—

(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の判断

以上のことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4 その他の性質

上記の他に、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ワタの性質はないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

ワタは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、自生が確認された例はなく、雑草及び帰化植物としての報告もない。なお、現在では在来の栽培種である二倍体ワタ *G. arboreum* の商業的栽培はなく、僅かに観賞用として作られる程度に過ぎない。また、*G. hirsutum* の商業的な栽培も行われていない。

第一、2 (6) で述べたとおり、本スタックワタ植物体内において、改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質はいずれも宿主の代謝系に影響を及ぼすことはなく、また、本スタックワタ植物体中におけるこれらの蛋白質の発現について生物検定及び ELISA 法によって測定した結果、各親系統と同程度であったことから、これらの蛋白質が本スタックワタの植物体内において相互に作用することではなく、本スタックワタが意図しない形質を獲得したとは考えられない。したがって、本スタックワタの生物多様性影響の評価は、LLCotton25 及び 15985 を個別に調査した結果を用いて行なった。

競合における優位性に関する形質として、本スタックワタの親系統である LLCotton25 及び 15985 において、形態及び生育の特性、生育初期の低温耐性、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、休眠性及び発芽率について、それぞれ非組換えワタとの相違を比較、検討したが、いずれにおいても競合において優位性を高める形質は獲得していないと判断した。

また、本スタックワタは除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性を併せ持つため、除草剤グルホシネートが散布されている環境下、またチョウ目害虫の存在下においては生存に優位に作用する。しかし、栽培作物であるワタが自然環境下において自生するとの報告はなく、これらの形質を併せ持ったとしても、自然環境下において自生し、優占化することは考え難い。

以上から、本スタックワタについて、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した。

我が国においては、ワタの商業栽培はほとんど行われておらず、本スタックワタの栽培用種子を販売する予定もないため、本スタック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、輸送中に我が国の自然条件下でこぼれ落ちて生育あるいは自生化して他の植物を駆逐する場合等が想定された。しかし、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。

有害物質の産生性に関して、LLCotton25 及び 15985 について、それぞれ後作試

験及び鋤込み試験並びに土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験においても非組換えワタとの間に有意差は認められなかった。

また、改変 PAT 蛋白質、改変 Cry1Ac 蛋白質、Cry2Ab 蛋白質が既知のアレルゲンとの相同性は示していないことが確認されている。また、これらの蛋白質はいずれも植物体内で独立して働いており、宿主の代謝系に影響して新たに意図せぬ有害物質を産生することは考えられない。さらに、生物検定及び ELISA 法により本スタックワタ植物体中における各蛋白質の発現を測定した結果、いずれも各親系統と同程度であったことから、これらの蛋白質が本スタックワタの植物体内において相互に影響を受ける可能性は考え難い。

以上のことから、本スタックワタは新たに有害物質を産生することは考えられず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

我が国において、本スタックワタが属する *G. hirsutum* と交雑可能な近縁野生種は報告されていない。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した。

以上から総合的に評価して、本スタックワタを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

別添資料 1： LLCotton25 と本スタックワタにおける除草剤グルホシネート耐性に関する生物検定

社外秘情報につき非開示

別添資料 2： 15985 と本スタックワタにおける殺虫効果に関する生物検定

社外秘情報につき非開示

別添資料 3： 改変 PAT 蛋白質及び改変 Cry1Ac 蛋白質並びに Cry2Ab 蛋白質の ELISA 法による定量

社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書の概要（食用、飼料用に供する場合）

平成 18年6月14日

氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ジョン グレイ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ(改変*bar*, 改変*cry1Ac*, *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.)(LLCotton25×15985, OECD U I: ACS-GH001-3×MON-15985-7)、(以下、本スタックワタとする。)の第一種使用において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。なお、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合とは、本スタックワタに関して、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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は研究開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は本スタックワタ穀粒の我が国への輸入業者、我が国において本スタックワタ穀粒を配給した業者、輸入した本スタックワタ穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにした本スタックワタ穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて本スタックワタ穀粒を我が国に配給している、またはその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

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

確認された明確な生物多様性影響が生ずるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明

らかにした個人や団体に、本スタックワタを不活性化する措置か、さもなくば本スタックワタの環境への放出を防止するための措置及びすでに環境に放出された本スタックワタの拡散を防止する措置について連絡、指導する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

科学的な評価に基づき、本スタック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認められた場合には、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社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。