

除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ (*cp4 epsps, cryIAc*,  
*Gossypium hirsutum* L.)(1445×531, OECD UI: MON-01445-2×MON-00531-6)  
申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書..... 1

### 生物多様性影響評価書の概要

#### 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

- 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報
    - (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況..... 2
    - (2) 使用等の歴史及び現状..... 2
    - (3) 生理学的及び生態学的特性..... 3
  - 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報
    - (1) 供与核酸に関する情報..... 5
    - (2) ベクターに関する情報..... 12
    - (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) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 16
  - 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..... 25
    - (2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置..... 25
    - (3) 国外における使用等に関する情報..... 25
- #### 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..... 26
  - 2 有害物質の産生性..... 27
  - 3 交雑性..... 27
  - 4 その他の性質..... 28
- #### 第三 生物多様性影響の総合的評価..... 29

緊急措置計画書..... 31

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 6 月 15 日

農林水産大臣 亀井善之殿  
環境大臣 小池百合子殿

申請者 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 印  
住所 東京都中央区銀座 4 - 10 - 10  
銀座山王ビル 8F

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

|                     |                                                                                                                                 |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 遺伝子組換え生物等の種類<br>の名称 | 除草剤グリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ( <i>cp4 epsps, cryIAc, Gossypium hirsutum</i> L.)<br>(1445 × 531, OECD UI : MON-Ø1445-2 × MON-ØØ531-6) |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容 | 食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為                                                                                      |
| 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法 |                                                                                                                                 |

## 生物多様性影響評価書の概要

### 第一 生物多様性影響の評価にあたり収集した情報

#### 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

##### (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

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

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

ハ．ワタ属の野生種は熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯に分布しており、野生の2倍体種はその地理的分布から、オーストラリア群(11種)、アフリカ・アラビア群(8種)及びアメリカ群(12種)の3群に分けられている。また、野生2倍体種に加え、新大陸に自生する野生4倍体種には、*G. tomentosum*(ハワイ)、*G. mustelinum*(ブラジル北西部)、*G. darwinii*(ガラパゴス)、*G. lanceolatum*(メキシコ)、*G. barbadense*(アンチル列島、中南米)及び*G. hirsutum*(中米)がある。*G. hirsutum*の自生個体が群生していることは稀で、多くの場合海岸沿いないしは小島に分散して生育している。

尚、わが国において*G. hirsutum*を含め4倍体栽培ワタと交雑が可能な*Gossypium*属植物の自然分布は報告されていない。

##### (2) 使用等の歴史及び現状

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

ロ．ワタ属は41種から成るが、このうち栽培種は、旧大陸の「アジア綿」と総称される2倍体種(n=13)の*G. herbaceum*と*G. arboreum*及び、新大陸の「陸地綿」と呼ばれる4倍体種(n=26)の*G. hirsutum*と*G. barbadense*である。現在、「アジア綿」は、インド、アフ

リカ及びアジアの限定された地域で栽培されているのみで、世界で生産されるワタの約98%は2つの「陸地綿」で、その90%は *G. hirsutum* 種となっている。

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

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

2002年のわが国における種子の輸入量は約15万トンであり、その内の約96%がオーストラリアから輸入されている。輸入された種子の内、約4万トンが搾油用として用いられ、残りのほとんどは、牛の飼料用として用いられた。尚、我が国では、大阪府内の製油会社が唯一、種子を海外から輸入して搾油を行っている。また、現在、輸入されている栽培用種子は、そのほとんどが米国から輸入されており、主に観賞用として栽培されている。この栽培用種子はある特定の種苗会社により輸入されており、その種苗会社によると、米国において第三者に委託して輸入する栽培用種子は非組換えワタであることをPCR法により確認しているとのことである。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

#### イ 基本的特性

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

#### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育は平均気温25を最適とし、20~28に適する。降雨量は年1,000~1,500mmが適しており、生育期には相当の降雨を必要とする。しかし開花期以降の多雨は落花・落さくを増加させる。また少雨では繰綿歩合が低下する。北米のワタ作地帯は北緯37~39°であり、北半球では一般に北緯43°が北限で、ヨーロッパでは42°、中

央アジアでは 44.3° まで分布している。日本では奥羽南端(37.5°)までとされる。土壌は排水良好な砂質壤土に適し、アルカリ土壌に強く酸性を嫌う。また相当塩濃度の高い干拓地にも生育する。

## ハ 繁殖又は増殖の様式

完熟した種子は開じょの際に出てくるが、基本的に綿毛に覆われているために脱粒しにくい。種子の休眠性はきわめて浅い。

ワタは栄養繁殖せず、種子繁殖する。自然条件下において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性があるという報告はこれまでのところない。

ワタの受粉様式に関しては、他家受粉も可能であることが知られているが、基本的には自家受粉である。尚我が国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。

ワタの花粉重は比較的重く、粘着性があるため風媒により交雑することは考えにくい。花粉はマルハナバチ(*Bombus* sp.)やミツバチ(*Apis mellifera*)によって媒介されることがある。しかし、虫媒により花粉が飛散する範囲は限られており、花粉に蛍光粒子を付着させて周辺の花への花粉の飛散を追跡した報告によると、意図的にハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約45m～60m離れた花畑でワタの花粉が付着していたのは1.6%程度の花のみであった。また、ワタ畑から1m離れた場合の交雑率は0.4%以下であり、16m離れると0.3%以下まで減少していた試験結果が報告されている。更に遺伝子組換えワタのマーカ―遺伝子を用いた交雑試験の結果によると、30×136mのワタ畑から1m離れた場所での交雑率は5%であったのに対して、7m離れた地点では1%以下に減少しており、1%以下の交雑率はワタ畑から最も離れた25mの地点でも散発的に認められている。

## ニ 有害物質の生産性

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

## ホ その他の情報

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

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

## 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

除草剤グリホサート耐性ワタ(*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum*) (1445, OECD UI : MON-Ø1445-2) (以下、1445 とする)とチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.)(531, OECD UI : MON-ØØ531-6) (以下、531 とする)を従来の育種法を用いて交配させた品種(*cp4 epsps*, *cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.) (1445 × 531, OECD UI : MON-Ø1445-2 × MON-ØØ531-6) (以下、「本スタック系統ワタ」とする)は、親系統である 1445 と 531 の 2 つの組換えワタのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では 1445 と 531 の調製等に関する情報について個別に述べた。

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

1445 の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は表 1 に示した通りである。

531 の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は表 2 に示した通りである。尚、531 中で発現する改変 Cry1Ac 蛋白質は、植物中での発現量を高めるために、野生型の 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。531 中で発現する改変 Cry1Ac 蛋白質は、以下「改変 Cry1Ac 蛋白質」とする。

#### ロ 構成要素の機能

##### 【1445 の作出に用いた目的遺伝子】

1445 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 1 に示した通りである。

##### *cp4 epsps* 遺伝子

グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。目的遺伝子である *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。*cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発

現する組換え植物ではシキミ酸合成が正常に機能して生育することができる。

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

1445 では CP4 EPSPS 蛋白質が発現することにより除草剤グリホサートに耐性を持つ。このため、播種前の耕起を行っていない畑にグリホサートを 1 回散布した後は、生育期間中に、雑草の生育にあわせて再びグリホサートを 1~2 回散布するだけで雑草の防除が可能になる。ワタ栽培では、1 作期当たり 3~5 回の除草剤散布が必要であると考えられており、1445 の栽培により、除草剤の使用回数の低減と、土壌中の化学肥料や農薬が風雨により河川に流亡することの少ない「不耕起栽培」が期待できる。

### nptII遺伝子

*nptII* 遺伝子によってコードされる neomycin phosphotransferase type II (NPTII)酵素蛋白質は、アデノシン 5'-三リン酸(ATP)の末端リン酸基を抗生物質のアミノ配糖分子の水酸基に転移させる。この結果、パロモマイシン、カナマイシンなどのアミノグリコシド系抗生物質は不活性化される。通常、これらのアミノグリコシド系抗生物質は、リボソーム上の蛋白質と特異的に結合して蛋白質合成を阻害し細胞を殺すが、NPTII 蛋白質によってこれらの抗生物質がリン酸化されると、リボ

ソーム上の標的蛋白質と結合できなくなる。このため、蛋白質合成阻害が起こらず細胞を殺すことができなくなる。

CP4 EPSPS 蛋白質及び NPTII 蛋白質が、既知の接触アレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース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。

#### 【531 の作出に用いた目的遺伝子】

531 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 に示した通りである。

#### 改変 cry1Ac 遺伝子

チョウ目害虫抵抗性を付与するための目的遺伝子である改変 cry1Ac 遺伝子は、*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たものである。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 (*Heliothrips zea*) を中心としたチョウ目昆虫に対して殺虫活性を示す。改変 Cry1Ac 蛋白質は、植物での発現を高めるために野生型 Cry1Ac 蛋白質の N' 末端のアミノ酸配列のみを改変したものであり、改変 Cry1Ac 蛋白質のチョウ目害虫に対する活性は、野生型 Cry1Ac 蛋白質と同等である。改変 Cry1Ac 蛋白質を含む Cry1Ac 蛋白質は上記のワタの主要害虫以外にもメイガ科の European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) などに対しても殺虫活性を持つが、チョウ目昆虫以外の幼虫に対しては殺虫活性を持たないことが知られている。

改変 Cry1Ac 蛋白質を含めた *B.t.* 菌の産生する *B.t.* 蛋白質は、標的昆虫の中腸上皮の特異的受容体と結合して陽イオン選択的小孔を形成し、その結果、消化プロセスを阻害して殺虫活性を示す。また、531 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各種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。531 は、改変 Cry1Ac 蛋白質が発現する事により、ワタの栽培における主要チョウ目害虫である Cotton bollworm (*Heliothrips zea*)、Tobacco budworm (*Heliothis virescens*) のチョウ目昆虫に対する抵抗性が付与される。

改変 Cry1Ac 蛋白質が発現することにより 531 は、ワタ栽培における主要チョウ目害虫である Tobacco budworm、Pink bollworm 及び Cotton bollworm などに対する抵抗性が付与されている。これまでワタ栽培には、チョウ目害虫の発生を抑える為に大量の殺虫剤が必要とされ、世界中で使用されている殺虫剤の約 25% がワタの栽培時に用いられ

たが、531 を導入することにより、環境中に長期間残存して、生物多様性にも影響を与えることが懸念されているこれらの化学農薬の使用量が大幅に削減されたという調査結果が米国、オーストラリア、中国などの栽培国で報告されている。また、531 は、ワタを食害する限られた種類のチョウ目害虫のみに殺虫活性を示す為、広い殺虫スペクトラムを持つ化学農薬と異なり、アブラムシなどの二次害虫を捕食する益虫などの生存には影響を与えない。その結果、中国では531 を栽培するほ場内の益虫の数が、従来の栽培方法を用いているほ場と比較して24%増加していると報告されている。

改変 Cry1Ac 蛋白質及び NPTII 蛋白質が、既知の接触アレルギーと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベースを用いて比較したところ、既知アレルギーと構造的に類似性のある配列を共有していなかった。

表 1 発現ベクターPV-GHGT07 の各構成要素

| 構成要素                                                 | 由来及び機能                                                                                                                                      |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット                           |                                                                                                                                             |
| CMoVb                                                | Figwort mosaic virus の 35S プロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に關与する。                                                                                    |
| ctp2                                                 | シロイヌナズナ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )の <i>epsps</i> 遺伝子の中で、EPSPS 蛋白質の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4 EPSPS 蛋白質を輸送する。    |
| <i>cp4 epsps</i>                                     | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。                                                                     |
| E9 3'                                                | エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。                                                    |
| <i>nptII</i> 遺伝子発現カセット                               |                                                                                                                                             |
| P-35S                                                | カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の 35S プロモーター領域。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に關与する。                                                                                   |
| <i>nptII</i> (Kan)                                   | 大腸菌のトランスポゾン Tn5 より単離された遺伝子で、neomycin phosphotransferase type II(NPTII)酵素蛋白質をコードする。                                                          |
| NOS 3'                                               | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。                                            |
| <i>Gox</i> 遺伝子発現カセット(挿入遺伝子解析の結果、1445 中には挿入されていなかった。) |                                                                                                                                             |
| CMoVb                                                | Figwort mosaic virus の 35S プロモーター。目的遺伝子の全組織での恒常的発現に關与する。                                                                                    |
| ctp1                                                 | <i>A. thaliana</i> 由来の rubisco の small subunit 1A の N 末端側に存在する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ GOX 蛋白質を輸送する。                             |
| <i>Gox</i>                                           | <i>Achromobacter</i> sp.strain LBAA のグリホサート分解酵素 (glyphosate oxidoreductase ; <i>gox</i> )由来の変異体 v247 の C-末端をコードする配列。GOX 蛋白質によりグリホサートが分解される。 |
| NOS 3'                                               | <i>Agrobacterium tumefaciens</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素(NOS)遺伝子の 3'非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。                                            |
| その他の構成要素(挿入遺伝子解析の結果、1445 中には挿入されていなかった。)             |                                                                                                                                             |
| <i>ori-V</i>                                         | 広域宿主プラスミド RK2 から単離された複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。                                                       |
| <i>Aad</i>                                           | Tn7 アデニルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する。                                                                            |

| 構成要素                  | 機能及び由来                                                                                                                                          |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 右側境界配列 (Right Border) | Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列(25bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される。 |
| <i>ori322</i>         | <i>E. coli</i> 由来のプラスミド pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E.coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。                                                             |
| <i>rop</i>            | <i>E. coli</i> 由来であり、 <i>E. coli</i> 中で複製されるプラスミドのコピー数を制御する。                                                                                    |

表 2 発現ベクターPV-GHBK04 の各構成要素

| 構成要素                       | 由来及び機能                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <i>E35S</i>                | 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>Heliothis 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Cry1Ac蛋白質をコードする遺伝子。 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> の産生する野生型Cry1Ac蛋白質と99.4%のアミノ酸配列同一性を持つ蛋白質をコードする。 |
| 7S 3'                      | ダイズの -conglycinin遺伝子の3'非翻訳領域であり、mRNAのポリアデニル化シグナルを含む。目的遺伝子の転写を終結させる機能を持つ。                                                                                                                                                                                                                                            |
| <i>NptII</i> 遺伝子発現カセット     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 35S                        | カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター領域。                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| <i>nptII</i>               | <i>E. coli</i> のトランスポゾンTn5に由来する遺伝子。ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼIIをコードし、植物にカナマイシン耐性を付与する。遺伝子導入の際、組換え体植物を選抜するためのマーカーとして用いられる。                                                                                                                                                                                                 |
| <i>NOS3'</i>               | ノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域であり、目的遺伝子の転写を終結させる機能を持つ。                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| その他の構成要素                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 右境界配列 (RB)                 | TiプラスミドpTiT37に由来する、ノパリン型T-DNAの右境界配列 (24bp)を含むDNA断片。右境界配列は、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへのT-DNAの伝達の際、伝達の開始点として利用される。                                                                                                                                                                                     |
| <i>aad</i>                 | <i>Staphylococcus aureus</i> 由来の3''(9)-O-アミノグリコシドアデニリルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン、及びストレプトマイシン耐性を付与する。                                                                                                                                                                                                      |

| 構成要素              | 機能及び由来                                                                                                                                                                                                  |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <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わる <i>rop</i> 領域及び <i>E. coli</i> から <i>Agrobacterium tumefaciens</i> への接合伝達に必要な <i>oriT</i> 配列を含む。 |

## (2) ベクターに関する情報

### イ 名称及び由来

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

### ロ 特性

1445 及び 531 の作出に用いられたプラスミドベクターの全塩基数は、それぞれ 12,032bp 及び 11,407bp である。

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

本プラスミドベクターの感染性は知られていない。

## (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

表 1、表 2 を参照のこと。

### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

1445 の作出では、プラスミド・ベクターPV-GHGT07 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により従来ワタ品種 Coker 312 へ導入した。

531 の作出では、プラスミド・ベクターPV-GHBK04 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により従来ワタ品種 Coker 312 へ導入した。

## 八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

### 【1445 の育成の経過】

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHGT07 を Coker 312 の胚軸に導入した後、カナマイシンを含む培地上で再生個体を得た。

形質転換体をカルベニシリンとパロモマイシンを含む培地で培養した後、これらの抗生物質を含まない再生培地に移して培養することによって、アグロバクテリウムの残存性がないことを確認している。

得られた再生個体について挿入遺伝子や CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外圃場での実際のグリホサート耐性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病害虫感受性など)などから総合的に判断して 1445 が選抜された。

諸外国における認可状況は以下の通りである。

- 1995 年 7 月 11 日 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を得た。
- 1995 年 9 月 11 日 米国食品医薬品局(FDA)より食品及び飼料としての安全性認可を得た。
- 1996 年 2 月 21 日 米国環境省(EPA)より生育中のワタへの除草剤グリホサートの適用認可を得た。
- 2000 年 9 月 14 日 オーストラリア遺伝子技術規制局の暫定機関(IOGTR)から飼料及び環境への安全性認可を得た。
- 2000 年 11 月 24 日 オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)から食品としての安全性認可を得た。
- 2003 年 6 月 19 日 オーストラリア遺伝子技術規制局(OGTR)から飼料及び環境への安全性認可を得た。

我が国における認可状況は以下の通りである。

- 1997 年 12 月 9 日 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 1997 年 12 月 16 日 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第 4 章」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 1998 年 1 月 12 日 「組換え体利用飼料の安全性評価指針 6 の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。
- 2001 年 3 月 30 日 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。

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

#### 【531の育成の経過】

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHBK04中のT-DNA領域をCoker 312の胚軸に導入した後、カナマイシンを含む培地上で再生個体を得た。

形質転換体からアグロバクテリウムを除くため、形質転換体をカルベニシリンとパロモマイシンを含む培地で培養した後、これらの抗生物質を含まない再生培地に移した後、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。

得られた再生個体について挿入遺伝子や改変Cry1Ac蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外圃場での実際の害虫抵抗性及び農業形質(形態・生育に関する特性、収量に関わる特性、病害虫感受性など)などから総合的に判断して531が選抜された。

諸外国における認可状況は以下の通りである。

- 1995年6月 米国食品医薬品局(FDA)より食品及び飼料としての安全性認可を受けた。
- 1995年7月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。
- 1995年8月 米国環境省(EPA)はCry1Ac蛋白質に対し、残留基準値の設定の免除を認めた。
- 1996年8月 オーストラリア遺伝子技術規制局の暫定機関(IOGTR)から飼料及び環境への安全性認可を受けた。
- 2000年7月 オーストラリア・ニュージーランド食品基準局(FSANZ)から食品としての安全性認可を受けた。
- 2003年6月 オーストラリア遺伝子技術規制局(OGTR)から飼料及び環境への安全性認可を受けた。

我が国における認可状況は以下の通りである。

- 1997年4月 農林水産省より「農林水産分野等における組換え体の利用のための指針」に基づき、日本への輸入(加工用及び飼料用としての利用)について、指針への適合性が確認された。
- 1997年5月 厚生労働省(当時厚生省)より「組換えDNA技術応用食品・食品添加物の安全性評価指針第4章」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 1997年6月 農林水産省より「組換え体利用飼料の安全性評価指針6の(2)」に基づき、飼料利用としての安全性認可を受けた。

- 2001年3月 厚生労働省より「組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査基準」に基づき、食品利用としての安全性確認を受けた。
- 2003年3月 農林水産省より「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続き」に基づき、飼料利用としての安全性確認を受けた。

#### 【1445 × 531 の育成の経過】

本スタック系統ワタは、1445 と 531 の二つの組換えワタ同士を伝統的な育種法を用いて作出した。

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

##### 【1445 に移入した核酸の存在状態及び形質発現の安定性】

サザン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 1445 の染色体ゲノム中 1ヶ所に 1コピー組み込まれていることが確認された。次に、CMoVbプロモーター、*gox*遺伝子、*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、*nptII*遺伝子をプローブとしてサザンブロット分析を行った結果、CMoVbプロモーター、*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、そして*nptII*遺伝子は、1445 中に挿入されていたが、*gox*遺伝子は挿入されていないことが明らかとなった。このことから、1445 のゲノム中には、*gox*遺伝子を除く T-DNA 領域(*cp4 epsps*遺伝子、*aad*遺伝子、*nptII*遺伝子)が、1コピー組み込まれていることが確認された。尚、PCR法による簡単な選抜がR<sub>0</sub>世代(1445 の初代を示す。これ以降、自殖・継代した世代をRの後に付けて表現することとする。)で行われており、*gox*遺伝子に関しては、最初からワタゲノム中に導入されていなかったことが確認されている。更に挿入遺伝子の両近傍配列を決定することにより、挿入遺伝子地図を最終化した。

尚、1445 中には、*E. coli* 及び *Agrobacterium tumefaciens* を選抜する際のマーカーとして用いた *aad* 遺伝子も導入されていたが、*aad* 遺伝子は植物中で機能するプロモーターを持たない為、植物中では発現していない。実際に測定を行ったところ、*aad* 遺伝子の産物である AAD 蛋白質は、ELISA 検定における検出限界値(種子の生組織重 1mg あたり 0.025ng、葉の生組織重 1mg あたり 0.013ng)未満であった。

また挿入遺伝子が安定して後代に遺伝していることが、R<sub>3</sub> 及び R<sub>5</sub> 世代のサザンブロット分析で明らかとなった。更に、CP4 EPSPS 蛋白質及び NPTII 蛋白質も安定して発現していることが、R<sub>4</sub> 世代及び R<sub>5</sub> 世代の種子を ELISA 法で分析することにより明らかとなった。

##### 【531 に移入した核酸の存在状態及び形質発現の安定性】

サザンブロット分析、コスミドクローニング法、そしてゲノムウォーキング法により、挿入遺伝子の解析を行った結果、531 のゲノム DNA 中には、改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセット、*nptII* 遺伝子発現カセットそして *aad* 遺伝子発現カセットより構成される第 1 挿入遺伝子と、第 1 挿入遺伝子の 5'末端側に逆向きに隣接し、改変 *cry1Ac* 遺伝子の 3'領域断片と 7S3'ターミネーターにより構成される第 2 挿入遺伝子、そして第 3 挿入遺伝子として 245bp の 7S 3'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。

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

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

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

この理由としては、隣接して挿入されている第 1 並びに第 2 挿入遺伝子と比べると第 3 挿入遺伝子は染色体上で離れた位置に挿入されている為、戻し交配の過程で分離したことが考えられた。また、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、531 におけるチョウ目害虫抵抗性には寄与していない。従って、第 3 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い。

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

#### (5) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本ストック系統ワタ親系統である 1445、531 に挿入された遺伝子により、改変 *Cry1Ac* 蛋白質、CP4 EPSPS 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。第一の 2-(1)-口で述べたように、改変 *Cry1Ac* 蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系とは独立して

機能している。同じく、CP4 EPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではないことが示唆されていること、また、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物中の芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されていることから、宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。さらに、CP4 EPSPS 蛋白質は基質特異性が高い。以上のことから、これら 2 つの蛋白質が相互に作用するとは考えにくい。

実際に確認するため、除草剤グリホサート耐性については米国のほ場でラウンドアップの散布試験を行い、耐性度を観察した。除草剤グリホサートによる薬害の症状として生育阻害や生育遅延が一般的に見られるため、生育最盛期の節数と全長、開花最盛期に達するまでの日数を観察の対象とした。その結果、本スタック系統ワタの生育最盛期の節数と全長、開花最盛期に達するまでの日数は、CP4 EPSPS 蛋白質を単独で発現する 1445 とほぼ同程度であった (P18 表 3)。また、本スタック系統ワタにおけるチョウ目害虫抵抗性については米国のほ場において発生した害虫数を観察した。発生した害虫は Tobacco budworm (*Heliothis virescens*) 及び Cotton bollworm (*Helicoverpa zea*) の 2 種類であった。その結果、本スタック系統ワタにおける Tobacco budworm 及び Cotton bollworm の発生数は、改変 Cry1Ac 蛋白質を単独で発現する 531 と同程度だった (P18 表 4)。以上の結果から、これらの蛋白質の発現の程度は、掛け合わせによっても相互に影響し合わないことが示唆された。

以上のことから、本スタック系統ワタと宿主の属する分類学上の種であるワタとの相違については、1445、531 の諸形質を個別に調査した結果を用いて想定した。

表 3 1445 × 531 の交配後代品種への除草剤グリホサート散布による生物検定の結果

| 交配後代品種     | 生育最盛期の節数 |      | 生育最盛期の全長 |      | 開花最盛期に達するまでの日数 |      |
|------------|----------|------|----------|------|----------------|------|
|            | 節数(個)    | SEM  | 全長(cm)   | SEM  | 日数(日)          | SEM  |
| 1445 × 531 | 20.9     | 5.61 | 101.4    | 29.0 | 10.4           | 0.74 |
| 1445       | 21.5     | 5.07 | 101.0    | 26.6 | 10.1           | 0.78 |
| 非組換え体      | 22.0     | 6.08 | 104.3    | 27.2 | 9.3            | 0.06 |

各交配後代品種につき 4 箇所のほ場で 50 個体以上ずつを栽培し、3~4 葉期に 10a 当り除草剤グリホサート(製品名ラウンドアップ)350 ml を散布し、耐性度を観察した。これは通常であれば非組換え体が容易に枯死する散布量である。グリホサートによる薬害の症状として生育阻害や生育遅延が一般的に見られるため、生育最盛期の節数と全長、開花最盛期に達するまでの日数(開花始めを起点として開花最盛期に達するまでの日数)を観察の対象とした。非組換え体については除草剤グリホサート無散布の個体を供試して観察を行った。

表 4 1445 × 531 の交配後代品種におけるチョウ目害虫 Tobacco Budworm 及び Cotton bollworm の発生数

| 交配後代品種     | 発生した害虫数<br>(第一観察期) | 発生した害虫数<br>(第二観察期) |
|------------|--------------------|--------------------|
| 1445 × 531 | 5                  | 0                  |
| 1445       | 16                 | 24                 |
| 531        | 6                  | 2                  |
| 非組換え体      | 17                 | 24                 |

各交配後代品種につき、4 箇所のほ場につき 20 個体ずつ、合計 80 個体を栽培し、第一観察期(7/9 ~ 7/17)及び第二観察期(8/8 ~ 8/27)に発生した害虫数を観察した。第一観察期は開花始、第二観察期はさくの裂開開始期である。発生した害虫数は 4 箇所のほ場 80 個体全体の合計数である。発生した害虫数はいずれも観察時点で生存が認められた害虫数であり、またいずれも幼虫である。

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

531 では、チョウ目害虫抵抗性を付与する改変 *cry1Ac* 遺伝子によってコードされる改変 Cry1Ac 蛋白質が葉、種子、若葉そして生体中で発現していることが ELISA 分析によって確認されている。

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

ロ．1445 の R5 世代並びに組換え母本である Coker312 を対照品種として平成 9 年 5 月～平成 9 年 10 月まで、531 の R5 世代並びに組換え母本である Coker312 を対照品種として平成 8 年 6 月～平成 8 年 12 月まで、いずれも九州農業試験場の隔離ほ場において隔離ほ場試験を行い、1445 及び 531 の諸形質を個別に調査した。

#### 形態及び生育の特性

##### 【1445 の形態及び生育の特性】

19 項目(発芽揃い、発芽率、草型、幹長、開花期、花色、葉形、有効花蕾数、結果枝数、開じょ期、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、収穫期、1 さくの乾燥重量、収穫期の地上部・地下部の重量)について 1445 及び対照の非組換えワタ間の形態特性及び生育の差異を調査した。その中で、草型、幹長、有効花蕾数、結果枝数、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、1 さくの乾燥重量、及び収穫期の地上部・地下部の重量については、各プロットの各列から 5 個体を選び、それぞれ調査した。ただし、さくに関する調査は 1 個体当たり 2 さくについて行った。また、発芽揃い、発芽率、開花期、開じょ期、収穫期については、全個体を調査の対象とした。

その結果、発芽率、葉長及びさくの短径について、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められたが( $P < 0.05$ )、それ以外の項目については、差異は認められなかった。

統計学的有意差の認められた発芽率については、対照の非組換えワタの発芽率が平均で 95%であるのに対して、1445 の発芽率は 3 反復の平均で 55%と低かった。しかしながら、1992 年から 1994 年の 3 年間に米国及びプエルトリコを中心に行われた約 65 ヶ所

のほ場試験を通じて、1445 の発芽率に非組換えワタとの間で差がないことが確認されている。また、ドミニカ共和国で栽培された 1445 系統及び Coker312 の種子を用いて、温暖条件(31 / 24 , Day/Night)及び冷涼条件(19 )の 2 条件で、シャーレ内での発芽試験を行い、7 日目に発芽率を調査した結果があるが、この試験においても両者の発芽率に差異は認められていない。更に、今回の隔離ほ場試験に用いた種子サンプルについて、米国本社に問い合わせたところ、両方の種子は 1996 年に同一ヶ所の試験区から採取されたものであるが、対照の非組換えワタを収穫した後に、1445 の種子を収穫する際に大雨があり、多くの収穫種子で裂皮が認められ、対照の非組換えワタと比べると品質的に劣っていたとの報告を受けた。従って、今回の隔離ほ場で認められた発芽率の差は、挿入遺伝子に起因したのではなく、1445 の種子サンプルの裂皮による品質低下が原因であると結論された。

また、葉長及びさくの短径については統計学的有意差が認められ、1445 と対照の非組換えワタの葉長の平均値はそれぞれ 17.8cm と 17.1cm であり、短径の平均値はそれぞれ 3.5cm と 3.2cm であった。

#### 【531 の形態及び生育の特性】

19 項目(発芽揃い、発芽率、草型、幹長、開花期、花色、葉形、有効花蕾数、結果枝数、開じょ期、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、収穫期、1 さくの乾燥重量、収穫期の地上部・地下部の重量)について 531 及び対照の非組換えワタ間の形態特性及び生育の差異を調査した。その中で、草型、幹長、有効花蕾数、結果枝数、繊維の色(綿毛の色)、さく(ワタの果実)の形状、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数、種子の色、1 さくの乾燥重量、及び収穫期の地上部・地下部の重量については、各プロットの中央列から 3 個体以上を選び、合計 10 個体以上についてそれぞれ調査した。ただし、さくに関する調査は 1 個体当たり 2 さくについて行った。また、発芽揃い、発芽率、開花期、開じょ期、収穫期については、全個体を調査の対象とした。

その結果、1 株あたりのさく数において 531 と対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められ、531 の 1 株あたりのさく数の平均は 9.6 個、対照の非組換えワタの平均は 6.5 個であった。また、さくの乾燥重量についても同様に統計学的有意差が認められ、531 と対照の非組換えワタの平均値はそれぞれ 7.7g と 8.1g であった。その他の全ての項目に関しては統計学的有意差は認められなかった。

これらの有意差が認められた理由としては、殺虫剤散布を行ったのにも関わらず、対照の非組換えワタが、チョウ目害虫であるワタノメイガとアワノメイガによる食害を受けた為、1 株あたりのさく数が 531 と比較して減少し、その分個々のさくが肥大した結

果によるものだと考えられた。従って、531 とその対照の非組換えワタの間で 1 株あたりのさく数及びさくの乾燥重量には差異がないと判断された。

#### 【スタック系統ワタ 1445 × 531】

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

#### 生育初期における低温又は高温耐性

#### 【1445 の生育初期における低温又は高温耐性】

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

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

#### 【531 の生育初期における低温又は高温耐性】

隔離ほ場試験において、生育初期における低温耐性試験は行っていないが、米国の 3 箇所のほ場(Tifton, ジョージア州(GA ), Starkville, ミシシッピ州(MS), Loxley, アラバマ州(AL))において、1994 年の秋に R4 世代から収穫した種子をそのまま各ほ場に播種して翌春まで、その種子の発芽率、越冬性に関して調査している。尚、これら米国の 3 箇所のほ場はいずれも米国南部の代表的なワタの栽培地帯であり、我が国の平均的な気候条件と比較して冬季の冷え込みも比較的少ないことから、我が国よりもワタが生育し易い気候条件であると判断された。

調査の結果、播種した 531 の種子の発芽は 3 箇所全てのほ場で、翌春まで認められな

かった。

更に 1991 年から 1993 年までの 3 年間、米国の 21 箇所のほ場においてほ場試験が行われた際に、収穫時期が比較的早かったほ場では、ほ場内にこぼれ落ちた種子が収穫後の秋に発芽しているのが確認されたが、翌春には全て枯死していたと報告されている。以上のことから 531 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。

#### 【スタック系統ワタ 1445 × 531】

従って、本スタック系統ワタでも、播種した種子の発芽は認められず、発芽したとしても、翌春には枯死すると考えられる。

#### 成体の越冬性又は越夏性

ワタは基本的に多年生植物であるが、これは熱帯地方で生育した場合のみであり、日本及び世界のワタの栽培地帯では、結実後、冬季には通常自然に枯死する。実際に 1445 及び 531 の隔離ほ場試験終了時には、部分的に枯死が始まっていることを確認している。以上のことから、成体の越冬性試験は行わなかった。

#### 花粉の稔性及びサイズ

我が国においては、1445 及び 531 の種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培自体も行われていない。更に、我が国には 1445 及び 531 と交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、1445 及び 531 が我が国の生物多様性に影響を与えるとすれば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、人の管理が及ばない場所で生育或いは、自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。しかし、こぼれ落ちた種子が発芽した後に成体になるまで発生しないことと、これまでに、輸送中にこぼれ落ちた種子が、我が国の自然条件下で生育或いは自生化したという報告はされていないことから、1445 及び 531 において花粉の稔性及びサイズの調査は行わなかった。

#### 種子の生産量、休眠性及び発芽率

#### 【1445 の生産量、休眠性及び発芽率】

1445 の種子の生産量については、 の形態及び生育の特性で、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数について 1445 と対照の非組換えワタとの差異を調査して

いる。その結果、これらの項目について対照の非組換えワタとの間で差異は認められなかった。

ワタの種子休眠性は極めて浅いことが知られている。またその種子の自然条件下での寿命は短く、土壌温度が 15～16 に達する前に播種されると土壌中でほとんど腐敗することが知られている。実際に で示したように、米国の 3 箇所のほ場において、秋に収穫した種子をそのまま各ほ場に播種して、翌春まで観察した結果、対照の非組換えワタと同様に発芽個体は認められず、差異はなかった。この結果から、1445 の種子は、対照の非組換えワタの種子と同様に低温のために土壌中で腐敗したと考えられた。以上のことから 1445 の種子の低温での生存性及び越冬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為、休眠性に関する試験は行わなかった。

発芽率については、 の形態及び生育の特性で調査している。その結果、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められ、1445 の平均発芽率は 55%、対照の非組換えワタの平均発芽率は 95%であった。しかし、 の形態及び生育の特性で述べているように、この差異は挿入遺伝子に起因したものではなく、1445 の種子サンプルの裂皮による品質低下が原因であると結論された。

#### 【531 の種子の生産量、休眠性及び発芽率】

531 の種子の生産量については、 の形態及び生育の特性で示したように、1 株当りのさく数、さくの室数、さく当りの種子数について 531 と対照の非組換えワタとの差異を調査している。その結果、1 株あたりのさく数について、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められたが( $P < 0.05$ )、それ以外の項目については、差異は認められなかった。統計学的有意差の認められた 1 株あたりのさく数は、531 で 9.6 個、対照の非組換えワタで 6.5 個であった。

1 株あたりのさく数で有意差が認められた理由は、531 の の形態及び生育の特性で示したように、殺虫剤散布を行ったのにも関わらず、対照の非組換えワタが、チョウ目害虫であるワタノメイガとアワノメイガによる食害を受け、その結果 1 株あたりのさく数が 531 と比較して減少した為と考えられた。従って、531 とその対照の非組換えワタの間で 1 株あたりのさく数には差異がないと判断された。

脱粒性については、531 とその対照の非組換えワタは共に、収穫時種子は綿毛とリントに覆われており、自然条件下での脱粒性は観察されなかった。

ワタの種子休眠性は極めて浅いことが知られている。またその種子の自然条件下での寿命は短く、土壤温度が 15～16 に達する前に播種されると土壤中でほとんど腐敗することが知られている。実際に 531 の で示したように、米国の 3 箇所のほ場(Tifton, GA, Starkville, MS, Loxley, AL)において、秋に収穫した種子をそのまま各ほ場に播種して、翌春まで観察した結果、対照の非組換えワタと同様に発芽個体は認められなかった。この結果から、531 の種子は、対照の非組換えワタの種子と同様にほとんどが土壤中で低温のために腐敗したと考えられた。以上のことから 531 の種子の低温での生存性及び越冬能力は極めて低く、我が国の冬季における低温条件下では発芽能力を維持できないと判断された為、休眠性に関する試験は行わなかった。

発芽率については、531 の の形態及び生育の特性で調査している。その結果、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差は認められなかった。

#### 【スタック系統ワタ 1445 × 531】

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

#### 交雑率

わが国では 1445 及び 531 が属する 4 倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は存在しない。従って交雑率については試験を行わなかった。

#### 有害物質の産生性

で述べたように、1445 及び 531 が有害物質を産生して我が国の生物多様性に影響を与えるとすれば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、人の管理が及ばない場所で生育或いは自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、1445 及び 531 の隔離ほ場試験では、輸送中にこぼれ落ちた種子がその場で発芽し、生育或いは自生化する可能性の有無を中心に調査した。その一方で根や地上部からの有害物質に関しては、こぼれ落ちた種子が発芽して、ある程度まで生育した後でないと発生しないことと、これまでに、輸送中にこぼれ落ちた種子が、我が国の自然条件下で生育或いは自生化したという報告はされていないことから、有害物質の産生性に関する調査は行わなかった。

### 3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

食用、飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬、廃棄及びこれらに付随する行為

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

別添の緊急措置計画書を参照。

#### (3) 国外における使用等に関する情報

本スタック系統ワタの国外における商業栽培は、米国及びオーストラリアで行われている。

## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統ワタは 1445 と 531 を従来育種法により掛け合わせた品種である。従って、本スタック系統ワタは 1445 と 531 の特性を併せ持つ。第一の 2-(5)で述べたとおり、改変 Cry1Ac 蛋白質は酵素活性を持たず宿主の代謝系とは独立に機能しておりまた CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝系には影響を及ぼさないことから、本スタック系統ワタではこれら 2 つの蛋白質が相互に作用することはないと考えられる。従って、本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価は、1445 と 531 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

### 1 競合における優位性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

本スタック系統ワタの親系統である 1445 と 531 において競合における優位性に関わる諸形質について、第一、2-(5)の 形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、種子の生産性、休眠性及び発芽率に記載したように比較検討した。その結果、1445 における葉長及びさくの短径を除く全ての項目で対照の非組換えワタとの間に差異は認められなかった。

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

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

また本スタック系統ワタはチョウ目害虫抵抗性を有しているため、同種間では競合における優位性がある程度高まることが予想される。しかし、人の手助けがないと繁殖できない栽培作物であるワタが、本形質が付与されたによって自生化し、自己繁殖し、優占化する野生植物になるほど競合における優位性を持つとは考えられない。

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

従って、本スタック系統ワタにおいて、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

#### (2) 影響の具体的内容の評価

### (3) 影響の生じやすさの評価

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統ワタは、競争における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

## 2 有害物質の産生性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では、ワタの商業栽培は行われておらず、本スタック系統ワタの種子を販売する予定もない為、本スタック系統ワタが有害物質を産生して野生動植物に影響を与えるとすれば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちた後に、生育或いは自生化した場合が想定された。しかし、現在までにワタの種子が、輸送中にこぼれ落ちて、我が国の自然条件下で生育或いは、自生化したという報告はされていない。

また、第一、2-(5)の形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、種子の生産性、休眠性及び発芽率に記載したように、本スタック系統ワタの親系統である 1445 及び 531 の種子の越冬性、発芽率は、対照の非組換えワタと比較して大きな相違はないことから、本スタック系統ワタは従来の非組換えワタと同様に我が国の自然条件下で生育或いは、自生化する可能性は極めて低いと考えられた。

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

#### (2) 影響の具体的内容の評価

### (3) 影響の生じやすさの評価

#### (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

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

## 3 交雑性

#### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

我が国では本スタック系統ワタが属する4倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可

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

(2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本スタック系統ワタは交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

#### 4 その他の性質

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

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

我が国においては、本スタック系統ワタの種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培自体も行われていない。更に、我が国には本スタック系統ワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本スタック系統ワタが我が国の生物多様性に影響を与えるとするならば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちて生育或いは自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、輸送中にこぼれ落ちた種子の発芽性、自生化の可能性について行った調査結果を中心にして本スタック系統ワタの生物多様性影響を評価した。

尚、本スタック系統ワタは 1445 と 531 を掛け合わせた交配後代品種であり、本スタック系統ワタは 1445 並びに 531 の特性を併せ持つ。第一の 2-(5)で述べたとおり、本スタック系統ワタにおける CP4 EPSPS 蛋白質と改変 Cry1Ac 蛋白質が相互に作用することは考えにくい。従って、親系統 1445 と 531 の生物多様性影響の評価の結果を用いて本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価を行った。

本スタック系統ワタの親系統である 1445 と 531 において競合における優位性に関わる諸形質について、比較検討した。その結果、1445 における葉長及びさくの短径を除く全ての項目で対照の非組換えワタとの間に差異は認められなかった。葉長及びさくの短径で認められた有意差に関しては、その差異を平均値で見ると僅かであり、この差異のみで競合における優位性が高まるとは考えにくい。

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

本スタック系統ワタの親系統である 1445 と 531 において越冬性及び発芽率を比較検討した。その結果、対照の非組換えワタと比較して大きな差異はなかったことから、本スタック系統ワタは従来の非組換えワタと同様に我が国の自然条件下で生育或いは自生化する可能性は極めて低いと考えられた。従って、本スタック系統ワタの種子が輸送中にこぼれ落ちたとしても我が国の自然条件下で生育或いは自生化する可能性は極めて低いと考えられ、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

我が国では本スタック系統ワタが属する 4 倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生しておらず、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本スタックシステムワタを第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

## 緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成16年6月15日

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

第一種使用規程の承認を申請しているグリホサート耐性及びチョウ目害虫抵抗性ワタ (*cp4 epsps*, *cry1Ac*、*Gossypium hirsutum* L.)(1445 × 531, OECD UI : MON-Ø1445-2 × MON-ØØ531-6(以下、「本スタック系統ワタ」という)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本スタック系統ワタに関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

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