

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, cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB119, OECD UI:BCS-GH005-8）申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書	5
5	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	7
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	7
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	7
	① 和名、英名及び学名	7
10	② 宿主の品種名	7
	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	7
	(2) 使用等の歴史及び現状	7
	① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	8
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	8
15	(3) 生理学的及び生態学的特性	9
	イ 基本的特性	9
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	9
	ハ 捕食性又は寄生性	9
	ニ 繁殖又は増殖の様式	9
20	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	9
	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	10
	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	10
25	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	10
	ホ 病原性	10
	ヘ 有害物質の産生性	10
	ト その他の情報	11
30	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	12
	(1) 供与核酸に関する情報	12
	イ 構成及び構成要素の由来	12
	ロ 構成要素の機能	14

	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	14
5	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	14
	③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	16
	(2) ベクターに関する情報	16
	イ 名称及び由来	16
	ロ 特性	16
10	① ベクターの塩基数及び塩基配列	16
	② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	16
	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	17
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	18
15	イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	18
	ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	18
	ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	18
	① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	18
20	② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウ ムの菌体の残存の有無	18
	③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確 認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価 に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過	18
	(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
25	① 移入された核酸の複製物が存在する場所	20
	② 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	20
	③ 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	21
30	④ (6) の①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	21
	⑤ 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	22

	(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	23
	(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	23
5	① 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内容	23
	② 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	23
10	a 形態及び生育の特性	23
	b 生育初期における低温又は高温耐性	24
	c 生体の越冬性又は越夏性	24
	d 花粉の稔性及びサイズ	24
	e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	24
15	f 交雑率	25
	g 有害物質の産生性	25
	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	26
	(1) 使用等の内容	26
	(2) 使用等の方法	26
20	(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	27
	(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	27
25	(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	27
	(6) 国外における使用等に関する情報	27
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	29
	1 競合における優位性	29
30	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	29
	(2) 影響の具体的内容の評価	30
	(3) 影響の生じやすさの評価	30
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	30

2	有害物質の産生性	30
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
	(3) 影響の生じやすさの評価	32
5	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
3	交雑性	32
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	33
	(3) 影響の生じやすさの評価	33
10	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
4	その他の性質	33
	第三 生物多様性影響の総合的評価	34
15	参考文献	36
	別添資料の内容	37
	緊急措置計画書	38

第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 5 月 28 日

5

農林水産大臣 石破 茂 殿
環境大臣 齊藤 鉄夫 殿

10

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

15

20 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。

25

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> , <i>cry2Ae</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.） (GHB119, OECD UI: BCS-GH005-8)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、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	所在地：宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 名称：国立大学法人宮崎大学・遺伝子組換え植物隔離ほ場（仮称） 使用期間：承認日から平成 24 年 5 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。

	<p>(3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えワタの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ワタの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。</p> <p>(4) 隔離ほ場周辺には、防風林を設置している。</p> <p>2 隔離ほ場での作業要領</p> <p>(1) 本遺伝子組換えワタ及び比較対照のワタ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。</p> <p>(2) 本遺伝子組換えワタを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ワタが漏出しない構造の容器に入れる。</p> <p>(3) (2) により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び比較対照のワタを隔離ほ場内で鋤込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えワタが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行なう。</p> <p>(6) (1) から (5) までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

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

5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

① 和名、英名及び学名

和名：ワタ（リクチメン）

英名：Upland cotton

10 学名：*Gossypium hirsutum* L.

② 宿主の品種名

宿主の品種名は、四倍体栽培ワタ（*G. hirsutum* L.）のCoker312である。

15 ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

G. hirsutum（以下、「ワタ」とする。）は四倍体のワタの栽培種であり（文献42）、我が国の自然環境下において、本種及び本種と交雑可能な*Gossypium*属（以下、「ワタ属」とする。）植物の分布は報告されていない。

ワタ属は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯から半乾燥地帯にかけて、世界におよそ50
20 種（文献15）が分布し、その生物学的多様性の中心は、主にアフリカ・アラビア半島、オーストラリア及びメキシコの3地域である（文献26）。本属のうち二倍体種は、アフリカ、アラビア半島、パキスタン及びおそらくそれ以東に分布するアフリカ・アラビア群（*Gossypium*亜属）の約14種（文献33, 40）、オーストラリア群（*Sturtia*亜属）の約17種（文献6）、そして、メキシコ西部、ガラパゴス諸島及びペルーに分布するアメリカ群（*Houzingenia*亜属）の約14種（文献1）であり、四倍体種は、メ
25 ソアメリカ（メキシコ及び中央アメリカ）、南アメリカ、ガラパゴス諸島及びハワイ諸島に分布するアメリカ・太平洋群（*Karpas*亜属）の5種である（文献42）。なお、二倍体種の*G. arboreum*及び*G. herbaceum*は旧大陸（アフリカ・アジア）において、一方、四倍体種のワタ（*G. hirsutum*）及び*G. barbadense*は新大陸（*G. hirsutum*はメソ
30 アメリカ、*G. barbadense*は南アメリカ）において、それぞれ栽培化された（文献26）。

(2) 使用等の歴史及び現状

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

ワタ属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*G. arboreum*の綿布片が発掘され、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た。これらのことから、古代インド人とペルーのインディオによって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年頃の洞窟からワタ (*G. hirsutum*) のさくが発掘され、ワタ属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50)。

中南米で栽培されたワタ (*G. hirsutum*) は1700年前頃メキシコから米国に入り、内陸部で一年生の早生種が栽培されるようになり、その後、米国の主要作物となったが、南北戦争で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50)。今日生産されるワタ属の95%以上は四倍体種であり、ワタ (*G. hirsutum*) が90%以上、長繊維綿、ピマ綿またはエジプト綿と呼ばれる*G. barbadense* が5%程度を占める (文献26)。

我が国における在来の栽培種は*G. arboreum*とされ、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とされ、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49)。しかし、輸入綿におかれて次第に衰微し、第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったものの、現在ではその商業的な栽培はなく、観賞用としてわずかに栽培されているにすぎない (文献50)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2007年の世界における綿実の生産量は約7,250万tであり、主な生産国は中国 (2,287万t)、米国 (1,200万t)、インド (948万t)、パキスタン (650万t) である (FAO, 2008)。

2007年度には、約14万 t の搾油用の綿実が我が国に輸入されている (文献52)。また、綿実油は2007年度に5,702 tが輸入され、主な輸入先は米国 (3,533 t) 及びオーストラリア (1,834 t) であった。他方、2007年度の綿実油粕の輸入量は4,481 tであり、主な輸入先は中国 (4,182 t)、米国 (299 t) であった (文献47)。

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49)。

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49）。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ワタは多年生植物で低木にもなるが、商業的には一年生作物として栽培される（文献26）。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である（文献28）が、一般的には茎長1mから1.5mで栽培されている（文献26）。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽もしくは実生の生育には15℃以上が要求され、38℃以上になると生育遅延が起こる（文献26）。日中の最適温度は30~35℃であるが、35℃以上になると結実が抑制され、25℃以下では生産量が著しく減少する（文献30）。また、正常な生育には、180~200日以上は無霜期間並びに栽培期間中に500mm以上の降雨量もしくは灌水を要する（文献12）。さらに、ワタは酸性に弱い、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49）。

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個の種子が含まれる。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50）、種子の脱粒性は低い（文献21）。品種によっては収穫後2~3ヶ月の休眠期を持つ（文献12）。また、水分含有率10%以上の種子は貯蔵中に急速に活力が失われることが知られており（文献29）、自然環境では寿命は比較的短いと考えられる。

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発芽特性

ワタは種子繁殖であり、自然条件下で植物体を再生しうる組織又は器官から発芽するという報告はなされていない。

5

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、媒介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21）。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。また、アポミクシスについての報告はない。

10

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタは一花に50～125以上の葯を形成し、一つの葯で350～900個の花粉粒が生産される（文献26）。ワタの花粉粒は大きく重く、やや粘着性があるため、風で花粉が運ばれることはほとんどなく（文献35）、自然交雑の程度は主にマルハナバチ（*Bombus*属）やミツバチ（*Apis*属）等の媒介昆虫の活動に依存している（文献23, 26）。米国における放飼昆虫を用いた雄性不稔系統（非組換え体）と在来系統との交配試験により、花粉源からの距離が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37）。他方、花粉源に除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10mを超えると耐性個体の出現程度は0.3%以下となり偶発的なものに限られ、60m以上では耐性個体の出現は認められなかった（文献44）。また、花粉の寿命については、25℃飽和湿度条件において、8時間後では約90%、16時間後では約31%、32時間後では7.6%と低下し、蛾（*Helicoverpa armigera*）の口吻に付着した場合には、8時間後には約19%となり、花粉の生存率はさらに低下することが確認されている（文献31）。

15

20

25

ホ 病原性

—

30

へ 有害物質の産生性

ワタが、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を産生することは知られていない。

ト その他の情報

ワタの種子には、ヒトや動物が大量に摂取した場合に悪影響を及ぼし得るゴッシポールやシクロプロペン脂肪酸が含まれている（文献26）。そのため、飼料としてのワタ種子の給餌量は制限されているが、反芻動物はこれらの物質を第一胃で消化して無毒化するため、影響を受けにくい（文献20）。

ゴッシポールは腺組織に存在するテルペノイドで、二つの異性体(+/-)があり、主に (-) ゴッシポールが活性を示す（文献34）。また、両異性体には遊離型と結合同型があり、種子には遊離型ゴッシポールが含まれる。遊離型ゴッシポールは、非反芻動物、鳥類並びに多くの昆虫や微生物に対して毒性を示し、哺乳類においては食欲減退、体重減少や呼吸困難等を引き起こす（文献3）。しかし、搾油粕中のゴッシポールは蛋白質と結合して毒性を失い（文献26）、粗油中のゴッシポールは脱ガム、脱酸、脱色の各工程で除去される（文献48）。

シクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸）は粗油中に1%ほど含まれており、不飽和化酵素を阻害し、鶏では卵白の変色やふ化率の低下などを引き起こすが、水素添加など精製過程で除去される（文献16, 25）。

ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、野生動物が摂食するという例は報告されていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

5 イ 構成及び構成要素の由来

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*, *cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB119, OECD UI:BCS-GH005-8）（以下、「GHB119」とする。）の作出に用いられた供与核酸の構成要素を表1に示した。

また、改変*bar*遺伝子産物である改変PAT蛋白質のアミノ酸配列を図1に、*cry2Ae* 10 遺伝子産物であるCry2Ae蛋白質のアミノ酸配列を図2に示した（p.13）。

表1 ベクターpTEM12の構成要素の位置、サイズ、由来及び機能

構成要素	ベクター上の位置	サイズ (bp)	由来及び機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット			
3' nos	26 - 335	310	pTiT37由来のノパリン合成酵素遺伝子の3'非翻訳領域（文献11）を含む配列で、転写を終結させ、3'ポリアダニル化を生じさせる。
改変 <i>bar</i>	336 - 887	552	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> に由来するホスフィントリシン・アセチル基転移酵素（PAT蛋白質）をコードする遺伝子（文献36）を含む配列で、除草剤グルホシネートに耐性を付与する。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。
Pcsmv XYZ	888 - 1423	536	Cassava Vein Mosaic Virus 35S RNA遺伝子のプロモーター領域（文献39）。構成的に転写を開始させる。
Cry2Ae遺伝子発現カセット			
P35S2	1424 - 1920	497	Cauliflower Mosaic Virus 35S RNA遺伝子のプロモーター領域（文献24）を含む配列。構成的に転写を開始させる。
5' cab22L	1921 - 1990	70	<i>Petunia hybrida</i> （ペチュニア）由来のchlorophyll a/b binding protein遺伝子のリーダー配列を含む配列（文献18）。 <i>cry2Ae</i> 遺伝子の発現レベルを増加させる。
TPssuAt	1991 - 2155	165	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のRuBisCo小サブユニットの輸送ペプチド遺伝子 <i>ats1A</i> のコード領域（文献9）。
<i>cry2Ae</i>	2156 - 4051	1896	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dakota</i> 由来の害虫抵抗性遺伝子のコード領域で、チョウ目害虫抵抗性を付与する。なお、本遺伝子は、ワタにおける発現に適するように塩基配列が改変されているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない（文献2）。

3'35S	4052 - 4320	269	Cauliflower Mosaic Virusの35S RNA遺伝子の3'非翻訳領域 (文献32) を含む領域。転写を終結させる。
その他			
RB	4321 - 4345	25	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) のT-DNA由来の右側境界反復配列 (文献43)。
—	4364 - 4537		プラスミドpTiAch5の断片 (文献45)。
<i>nptI</i> -fragment	4538 - 5248		トランスポゾンTn903由来のネオマイシン ホストトランスフェラーゼをコードする <i>nptI</i> 遺伝子 (文献27) の断片。なお、本配列は断片であるため機能しない。
ORI ColE1	5249 - 6421		<i>Escherichia coli</i> のプラスミドpBR322由来複製起点 (文献4) を含む配列。
ORI pVS1	6422 - 10192		<i>Pseudomonas</i> のプラスミドpVS1 (文献19) の複製起点 (文献17) を含む配列。
<i>aadA</i>	10193 - 11961		<i>E.coli</i> 由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (文献14) を含む配列。
—	11962 - 12266		プラスミドpTiAch5の断片 (文献45)。
LB	1 - 25	25	<i>R.radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のT-DNA由来の左側境界反復配列 (文献43)。

(注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

```

1  MDPERRPADI RRATEADMPA VCTIVNHYIE TSTVNFRTPEP QEPQEWTDL VRLRERYPWL
61  VAEVDGEVAG IAYAGPWKAR NAYDWTAEAT VYVSPRHQRT GLGSTLYTHL LKSLEAQQGF
121 SVVAVIGLPN DPSVRMHEAL GYAPRGLRA AGFKHGNWHD VGFWQLDFSL PVPVPRVLPV
181  TEI

```

5

図1 改変PAT蛋白質のアミノ酸配列

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

```

1  NNVLNNGRTT ICDAYNVVAH DPFSFEHKS L DTIRKEWMEW KRTDHSLYVA DIVGTVSSFL
61  LKKVGSLLGK RILSBLWGLI PPSGSTNLMQ DILRETEQFL NQRLNTDTLA RVNAELBGLQ
121 ANIREFNQVQV DNFLNPTQNF VPLSITSSVN TMOQLFLNRL PQFRVQGYQL LLLPLFAQAA
181 NMHLSFIRDV VLNADEWGIS AATLRTYQNY LKNYTTREYSN YCINTYQTAF RGLNTRLHDM
241 LEFRTYMPLN VFEYVSIWSL PKYQSLVSS GANLYASGSG PQQTQSFTSQ DWPFLYSLFQ
301 VNSNYVLNGF SGARLTQTFP NIGGLPGTTT THALLAARVN YSGGVSSGDI GAVFNQNFSC
361 STFLPPLLTP FVRSWLDGSG DRGGVNTVIN WQTESFESTL GLRCGAFAR GNSNYPPDYF
421 IRNISGVPLV VRNEDLRRPL HYNEIRNIBS PSGTPGGLRA YMVSVHNRKN NIYAVHNGT
481 MIHLAPEDYT GFTTISPIHAT QVNNQTRTFI SEKFGNQGDS LRFEQSNTTA RYTLRGNGNS
541 YNLVLRVSSL GNSTIRVTIN GRVYTASNVN TTTNNDGVND NGARFLDINM GNVVASDNTN
601 VPLDINVTFN SGTQFELMNI MFVPTNLPEI Y 631

```

10

15

図2 Cry2Ae蛋白質のアミノ酸配列

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

ロ 構成要素の機能

① 目的遺伝子、発現調整領域、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

供与核酸の構成要素それぞれの機能は表1 (p.12~13) に示した。

5

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

Cry2Ae蛋白質

10 GHB119に導入された*cry2Ae*遺伝子がコードするCry2Ae蛋白質は、632アミノ酸、分子量71 kDaの殺虫活性蛋白質 (Bt蛋白質) である。Cry2Ae蛋白質は、土壤中に普遍的に存在するグラム陽性菌の*B. thuringiensis* subsp. *dakota*から単離された野生型Cry2Ae蛋白質の活性領域 (コア蛋白質) とN-末端の43アミノ酸を含む。なお、
15 GHB119に導入された*cry2Ae*遺伝子は、ワタにおける発現に適するようにコドンを変更しているが、この変更によりコードされるアミノ酸は変化していない (文献2)。

Cry2Ae蛋白質は、チョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ (*tobacco budworm* : *Heliothis virescens*)、アメリカタバコガ (*cotton bollworm* : *Helicoverpa zea*)、オオタバコガ (*Old world bollworm* : *Helicoverpa armigera*)、ワタアカミムシ (*pink bollworm* : *Pectinophora gossypiella*)、シマジロクサヨトウ (*fall armyworm* : *Spodoptera frugiperda*)、シロイチモジヨトウ (*beet armyworm* : *Spodoptera exigua*) 等に殺虫活性を示す (文献2; 別添資料6, p.6, 表3)。Cry2Ae蛋白質を含むBt蛋白質は、標的昆虫に摂取されると、中腸において特定のプロテアーゼにより消化されて活性ポリペプチド (コア蛋白質) となり、中腸上皮の刷子縁膜小胞 (BBMV) の特定の受容体
25 と結合し、中腸の円柱細胞にイオンチャネルを形成し (文献7)、恒常性が失われ、敗血症を引き起こし、死に至る (文献5, 22)。

なお、Cry2Ae蛋白質はミツバチ (*Apis mellifera*) 及びテントウムシ (*Coleomegilla maculata*) の成育及び生存に影響を及ぼさないことが確認されている (別添資料6, p. 10~11, 表6~7)。また、Cry2Ae蛋白質は、その他の非標的昆虫であるクサカゲロウ (*Chrysoperla rufilabris*)、トビムシ (*Folsomia candida*) 及びミジンコ (*Daphnia magna*) に対しても影響を及ぼす可能性が低いことが確認されている (表2, p.15)。さらに、ヒトを含む哺乳類においては、Bt蛋白質は消化器系に存在するプロテアー

ゼや酸性の消化液によってコア蛋白質を含めて消化されること、また、消化器官にはコア蛋白質の受容体は存在しないことから、Cry2Ae蛋白質を含むBt蛋白質を摂取しても影響を受ける可能性は極めて低い。

5 表2 非標的昆虫に対するCry2Ae蛋白質の影響評価

生物種	生育ステージ	評価項目	結果
クサカゲロウ (脈翅目) (Green Lacewing: <i>Chrysoperia rufilabris</i>)	幼虫	致死	NOEC ¹ 27 µg/g ²
トビムシ (トビムシ目) (Springtail: <i>Folsomia candida</i>)	幼虫	致死、生殖	44 µg/g で致死率に影響なし
ミジンコ (双殻目) (<i>Daphnia magna</i>)	未成熟	致死、発達、生殖	NOEC 48 µg/g

¹: NOEC: 無影響濃度

²: ELISA による給餌飼料中の Cry2Ae 蛋白質量の平均値。

(注: 本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

10 Cry2Ae蛋白質のアミノ酸配列に基づき、データベース (Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PIR、DAD、PDB及びGenPept) に登録されている蛋白質との相同性を検索した。その結果、種々のバクテリア株由来の他のBt蛋白質との相同性が認められたが、既知の毒素蛋白質又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

15 改変PAT蛋白質

植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、植物は枯死に至る。

20

改変 bar 遺伝子が産生する改変PAT蛋白質 (ホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素) 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植物は枯死しない。

25

改変 PAT 蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が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 36)。また、過剰の各種アミノ酸の存

在下でも、改変 PAT 蛋白質によるグルホシネートへ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 41）。これらのことから、改変 PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有すると考えられる。

5 改変PAT蛋白質のアミノ酸配列について、各種データベース（Swissprot、trEMBL、GeneSeq-Prot、PIR、PDB、DAD及びGenPept）に登録されている蛋白質との相同性検索を行った結果、既知の毒素蛋白質又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

10 なお、改変*bar*遺伝子は、我が国において平成18年2月に第一種使用規程承認が得られている除草剤グルホシネート耐性ワタLLCotton25（OECD UI: ACS-GH001-3）に導入されたものと同一の遺伝子である。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

15 Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質は、植物の代謝系とは独立して機能すると考えられる。また、改変*bar*遺伝子産物である改変PAT蛋白質は、グルホシネートに対して高い基質特異性を有している。したがって、これらの蛋白質が宿主の持つ代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

20 (2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

GHB119の作出に用いたベクターは、pGSC1700（文献8）に由来するプラスミド pTEM12である（図3, p.17）。

25

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

pTEM12の塩基数は12,266 bpである。

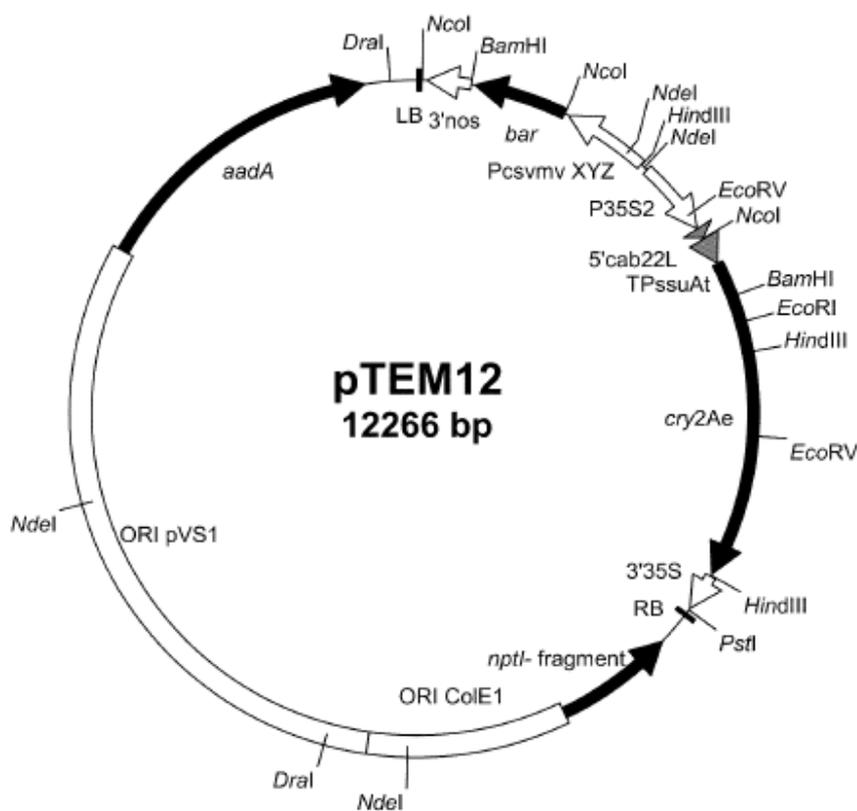
30 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pTEM12はT-DNA領域の外側に以下の配列（p.17）を有するが、これらの配列はT-DNA領域外に位置しており、GHB119には導入されていないことがサザンブロット分析により確認されている（別添資料1, p.17, Figure 4.2）。

- *E. coli*のプラスミドpBR322由来複製起点 (ORI ColE1) (文献4) 及び*Pseudomonas*
 のプラスミドベクターpVS1の複製起点 (ORI pVS1) (文献17)。それぞれ、*E. coli*
 及び*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) において自律的複製を行わせる機能を有する。
 - *E. coli*由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子 (*aadA*) (文献14) を含
 5 む配列。*E. coli*及び*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) において選抜マーカーとして
 利用した。

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
 pTEM12には伝達性を示す因子は含まれておらず、感染性はない。

10



15

図3 pTEM12のベクター地図
 図中の「*bar*」は「改変*bar*」を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

(3) 遺伝子組換え生物等の調整方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

5 宿主内には、pTEM12上のLBとRBに挟まれた*cry2Ae*遺伝子発現カセット及び改変
bar 遺伝子発現カセット（[3'nos]-[改変 *bar*]-[Pcsmv XYZ]-[P35S2]-[5'cab22L]-
[TpssuAt]-[*cry2Ae*]-[3'35S]）が移入された（図3, p.17）。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

10 宿主への核酸の移入は、アグロバクテリウム法（文献10）を用いて行った。宿主
ワタCoker312の胚軸部分から培養した胚形成カルスを、非腫瘍形成性ヘルパーTiプ
ラスミドpEHA101及pTEM12を保持する非腫瘍形成性*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*)
C58C1^{Rif}株（文献38）の培養液に曝露し、共存培養して形質転換を行った。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

15 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

核酸が移入された組織片を、*claforan* 500mg/Lを含む再生培地において培養し、植
物体を再生させ、グルホシネートにより耐性個体を選抜した。

20 ② 核酸の移入方法がアグロバクテリウムの場合はアグロバクテリウム菌体の残存 の有無

核酸の移入後に*claforan* 500mg/Lを含む培地で培養し、形質転換に用いたアグロバ
クテリウム菌体を除去した。さらに、*claforan*を含まない培地で培養し、アグロバク
テリウム菌体の残存がないことを確認した。

25 ③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系 統、隔離ほ場試験に供した系統その他の生物多様性影響評価に必要な情報を収集 するために用いられた系統までの育成の経過

30 選抜された植物体をポットに移植して温室内で栽培し、さらに除草剤グルホシネ
ートによる選抜を行い、GHB119当代（T0）を得た。さらに、除草剤グルホシネ
ート耐性形質及び農業形質等により優良系統を選抜した。GHB119の育成の経過を図4
（p.19）に示した。なお、本申請の対象は、T0世代において除草剤グルホシネート
耐性を示した個体及びその後代である。

なお、我が国では、2009年に食品安全承認申請を厚生労働省へ、また、飼料安全性承認申請を農林水産省へそれぞれ提出する予定である。

5

社外秘情報につき非開示

図4 GHB119の育成の経過

(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

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 GHB119のT1及びBC1F1において、除草剤グルホシネートに対する耐性株／感受性株の分離比を調べた結果、挿入遺伝子に関して1遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比に適合する結果を示した（表3）。よって、GHB119に移入された挿入DNAは、ワタゲノム上の1ヶ所に存在すると考えられる。

表3 分離比の確認

世代	供試株数	期待値	実測値		χ ² 検定 ¹
			耐性株	感受性株	
T1	16	3 : 1	11	5	0.03
BC1F1	19	1 : 1	10	9	0.05

10 1) 1 遺伝子座支配と仮定。自由度 1、p=0.05 において、χ² 値 3.84 以上で帰無仮説が棄却される。
 (注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

② 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

15 GHB119 (T3) を用いたサザンブロット分析により、1コピーのT-DNA領域が移入されたことが確認された（別添資料1, p.8, Table 3.2, p.9～12, Figure 3.2）。また、シーケンス解析により、GHB119に移入されたDNAの塩基配列は、ベクターpTEM12上のT-DNA領域と一致することが確認された（別添資料2）。移入されたDNAの構成を図5に示した。

20

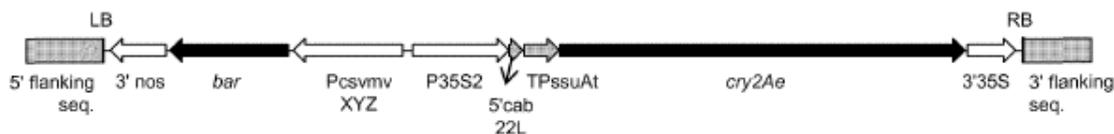


図5 GHB119に移入されたDNAの構成図

25

図中の「bar」は「改変bar」を示す。

(注：本図に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。)

また、GHB119の3世代 (F1, BC1F1, BC2F1) の葉から抽出したゲノムDNAについて、T-DNA領域に2つの切断部位を持つ制限酵素EcoRVで処理し、T-DNA領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、いずれの世代においても想

30

定されたサイズのバンドが同一パターンで検出され、移入された核酸は複数世代において安定して伝達していることが確認された（別添資料1, p.20, Figure 5.1）。

③ 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

GHB119には1コピーのT-DNA領域が移入されたため、本項目は該当しない。

④ (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

2007年に米国の温室内で栽培したGHB119（BC2F4）5株について、生育ステージ別に採取した根、茎、葉、蕾、頂端、さく、全地上部、花粉、蜜、花及び種子を用いて、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質の発現量をELISA法により測定した。その結果、改変PAT蛋白質は全ての組織において検出された。他方、Cry2Ae蛋白質は、蜜において検出限界（10.8 ng/g試料）以下であったが、その他の全ての組織では検出され、改変PAT蛋白質及びCry2Ae蛋白質はGHB119において個体間で安定して発現することが確認された（表4; 別添資料3, p.10, Table 5）。

表4 GHB119におけるCry2Ae蛋白質及び改変PAT蛋白質の発現量（ELISA）

組織	生育ステージ	改変PAT蛋白質 ($\mu\text{g/g}$ 生重) \pm 標準偏差 ¹	Cry2Ae蛋白質 ($\mu\text{g/g}$ 生重) \pm 標準偏差 ¹
根	生育期	19.2 \pm 3.5	3.24 \pm 0.55
	開花期	10.5 \pm 3.4	2.15 \pm 0.45
茎	生育期	20.9 \pm 4.3	2.45 \pm 0.76
	開花期	18.0 \pm 4.7	2.31 \pm 0.38
葉	生育期	27.4 \pm 6.9	9.33 \pm 3.39
	開花直前期	28.4 \pm 3.5	8.29 \pm 1.64
	開花期	19.6 \pm 3.7	4.44 \pm 1.78
蕾	開花期	16.2 \pm 3.4	1.76 \pm 0.75
頂端	開花期	25.3 \pm 9.2	2.38 \pm 0.65
さく	開花期	6.57 \pm 1.64	0.75 \pm 0.15
全地上部	開花期	19.0 \pm 4.8	9.80 \pm 4.25
花粉	開花期	0.47 \pm 0.33	0.33 \pm 0.27
蜜	開花期	0.01 \pm 0.01	ND ²
花	開花期	10.2 \pm 2.5	1.14 \pm 0.15
種子	収穫期	2.37 \pm 2.98	0.90 \pm 0.56

¹: 5株の平均値

²: 検出限界（10.8 ng/g 試料）以下

（注：本表に記載された情報に関する権利及び内容の責任は申請者にある。）

Cry2Ae蛋白質の発現に関して、アメリカタバコガ (*H. zea*) 及びニセアメリカタバコガ (*H. virescens*) の幼虫を対象に、T3世代のGHB119及び非組換えワタCoker312を用いて、人工飼料に4%又は10%の割合で葉の粉末を混和して給餌試験を行った。その結果、アメリカタバコガ (*H. zea*) において、10%Coker312給餌区では4日後に
5 10.5%、12日後に17%の致死率であったのに対し、10%GHB119給餌区では7日後に72%、12日後には100%の致死率が認められた。4%GHB119給餌区でも、17日後に73.5%の致死率が認められ、24日後には95%の幼虫が死亡した。また、ニセアメリカタバコガ (*H. virescens*) においては、4%Coker312給餌区では幼虫の致死率は、7
10 日後に14.8%、17日後に23.8%であったのに対し、4%GHB119給餌区では、4日後の致死率は100%であった (別添資料6, p.8, 表4)。

また、アメリカタバコガ (*H. zea*) の幼虫を対象に、BC2F5世代のGHB119とCoker312の葉の給餌試験を行った。米国のほ場において播種後50日以降、6回の時期に分けて採取した両系統の葉をそれぞれ幼虫に摂食させ、5日後に幼虫の致死率を調査した。その結果、1回目の採取時期において、系統間に統計学的有意差 (有意水準5%) は認められなかったものの、GHB119給餌区では65.00%、Coker312給餌区では34.17%となり、GHB119給餌区の方が高い致死率を示した。その他の採取時期においてはいずれも、GHB119給餌区がCoker312給餌区に比べて高く、統計学的有意差が認められた (別添資料6, p.9, 表5)。

以上から、GHB119のT3世代及びBC2F5世代において標的昆虫に対して殺虫活性
20 が認められ、Cry2Ae蛋白質は、GHB119において世代間で安定して発現することが確認された。

改変PAT蛋白質の発現に関して、第一、2 (4) ①で述べたとおり、GHB119のT1 (16株) 及びBC1F1 (19株) に除草剤グルホシネート散布試験を行った結果、理論
25 上の分離比に適合する割合で耐性個体が認められた。よって、改変PAT蛋白質は、GHB119において個体間及び世代間で安定して発現することが確認された (表3, p.20)。

⑤ 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
30 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

GHB119は伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然条件下において野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられる。

(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

GHB119は、移入されたDNAの周辺配列を利用したプライマーを用いたPCR法によって識別することができる（別添資料4）。なお、本識別法はGHB119の栽培管理に有効に利用されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

① 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

GHB119は、*cry2Ae*遺伝子がコードするCry2Ae蛋白質により、ワタ栽培におけるチョウ目害虫であるニセアメリカタバコガ (*H. virescent*)、ワタアカミムシ (*P. gossypiella*)、アメリカタバコガ (*H. zea*) 等に対して抵抗性を示す。また、改変*bar*遺伝子がコードする改変PAT蛋白質により、除草剤グルホシネートに耐性を示す。

② 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

2007年にスペインのカタルーニャ州、また、2008年に米国のルイジアナ州、サウスカロライナ州、ノースカロライナ州、アリゾナ州、テキサス州及びミシシッピ州において、それぞれ野外試験を行い、GHB119 (BC2F4) の形態及び生育の特性等についてCoker312と比較した（別添資料6, p.2～5）。また、バイエルクロップサイエンス社 結城中央研究所のPIP実験室において、生育初期の低温耐性及び有害物質の産生性について、GHB119 (BC2F4) とCoker312を比較した（別添資料5）。

a. 形態及び生育の特性

2007年にスペインにおいて、草丈、総節数、10さく当たりの種子数、10さく当たりの種子重、100粒重、開花までの日数及び結実までの日数が調査された。その結果、草丈について、GHB119が 53.81 ± 10.72 cm、Coker312が 58.84 ± 12.22 cmとなり、統計学的有意差が認められた。その他の調査項目については、GHB119とCoker312の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料6, p.3, 表1）。

また、2008年の米国での調査において、草丈、総節数、第一位さく数、第二位さく数、総さく数、平均節間長、第一位さく保持率、第二位さく保持率、開花までの

日数及び開じょまでの日数について、GHB119とCoker312を比較した。その結果、総さく数について、GHB119が 10.28 ± 6.59 個、Coker312が 12.54 ± 5.59 個となり、統計学的有意差が認められた。また、その他の調査項目については、GHB119とCoker312の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料6, p.5, 表2）。

5

b. 生育初期における低温又は高温耐性

我が国のP1P実験室において、GHB119及びCoker312の幼植物体を 5°C ・12時間明暗条件下で1ヶ月間育成し、1週間毎に萎縮程度について達観評価を行った。その結果、いずれの調査時においても系統間に統計学的有意差は認められず、低温条件に移してから4週間後には、両系統ともに全ての個体の枯死が確認された（別添資料5, p.9, 表3）。

10

c. 成体の越冬性又は越夏性

ワタは多年生植物で低木にもなる（文献26）が、生育初期では $24\sim 30^{\circ}\text{C}$ 、後期ではさらに高温が適しており、低温や降霜により枯死することが知られている（文献50）。したがって、ワタが我が国の冬季において越冬性を示し、多年生植物として自生する可能性は低いと考えられる。なお、成体の越冬性について、隔離ほ場試験において調査する予定である。

15

d. 花粉の稔性及びサイズ

本項目については、隔離ほ場試験において調査する予定である。

20

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関して、上記aで述べたとおり、2007年のスペインの調査において、10さく当たりの種子数、10さく当たりの種子重及び100粒重について、GHB119とCoker312の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料6, p.3, 表1）。また、2008年の米国における調査では、総さく数について統計学的有意差が認められたが、GHB119はCoker312に比べて低い値を示した（別添資料6, p.5, 表2）。

25

また、ワタの種子は地毛が絡み合っ分離にくいため（文献50）、開じょしたさくから脱粒する可能性は低いと考えられる。さく及び種子の形状については、隔離ほ場試験で調査する予定である。

30

なお、休眠性及び発芽率については、隔離ほ場試験において調査する予定である。

f. 交雑率

我が国には、ワタと交雑可能な近縁種は自生していないことから、交雑性試験は行わなかった。

5 g. 有害物質の産生性

我が国のPIP実験室内において、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体内に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては鋤込み試験を行った（別添資料5）。

10 後作試験

GHB119及びCoker312を3ヶ月間栽培した後の土壌において、検定植物としてダイコンを播種し、発芽率、草丈、生重及び乾物重について比較した。その結果、いずれの調査項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5, p.5, 表1）。

15

鋤込み試験

20 GHB119及びCoker312を播種後3ヶ月半栽培して植物体を収穫し、乾燥・粉碎して乾燥試料とした。この乾燥試料を重量約1%になるように混和した土壌に、検定植物のダイコンを播種し、発芽率、草丈、生重及び乾物重を比較した。その結果、いずれの調査項目についても系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5, p.7, 表2）。

なお、根から分泌され土壌微生物に影響を及ぼすものについては、隔離ほ場試験において調査を行う予定である。

25

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

5 隔離ほ場における栽培、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

所在地： 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地

10 名称： 国立大学法人宮崎大学・遺伝子組換え植物隔離ほ場（仮称）

使用期間： 承認日から平成24年5月31日まで

1) 隔離ほ場の施設

- 15 ① 部外者の立入を防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- ② 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 20 ③ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、GHB119の種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該ワタの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- ④ 隔離ほ場周辺には防風林を設置している。

2) 隔離ほ場での作業要領

- 25 ① GHB119及び比較対照のワタ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- ② GHB119を隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該ワタが漏出しない構造の容器に入れる。
- ③ ②により運搬又は保管をする場合を除き、GHB119の栽培終了後は、当該ワタ及び比較対照のワタを隔離ほ場内で鋤込む等により、確実に不活化する。
- 30 ④ 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずにGHB119が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- ⑤ 隔離ほ場が本来有す機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を

行う。

⑥ ①から⑤までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。

⑦ 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

5

(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

—

10

(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。

15

(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

—

20

(6) 国外における使用等に関する情報

GHB119は、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*cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (T304-40, OECD UI: BCS-GH004-7) (以下、「T304-40」とする。)とのスタック系統の交配親として使用される予定である。よって、米国及びカナダにおいて、GHB119単独での承認申請は行っていない。

なお、米国及びカナダにおけるGHB119とT304-40のスタック系統としての承認申請状況は下記の通りである。

米国において、無規制承認(栽培承認)を受けるため、2008年11月に米国農務省(USDA)に申請した。また、食品及び飼料安全承認を受けるため、2008年12月に米国食品医薬品局(FDA)に申請した。

カナダにおいて、2008年12月に、食品承認を受けるためカナダ保健省(Health

Canada) に、また、飼料及び環境安全承認を受けるためカナダ食品検査庁 (CFIA) にそれぞれ申請した。

我が国では、GHB119について、2009年に食品安全承認申請及び飼料安全承認申請をそれぞれ厚生労働省及び農林水産省へ提出する予定である。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

ワタは我が国において長期にわたる使用等の経験があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。

10 競合における優位性に関する形質として、2007年にスペインにおいて、草丈、総節数、10さく当たりの種子数、10さく当たりの種子重、100粒重、開花までの日数及び結実までの日数について調査した。また、2008年に米国において、草丈、総節数、第一位さく数、第二位さく数、総さく数、平均節間長、第一位さく保持率、第二位さく保持率、開花までの日数及び開じょまでの日数について調査した。その結果、
15 果、スペインの調査において、草丈について、GHB119が 53.81 ± 10.72 cm、Coker312が 58.84 ± 12.22 cmとなり、統計学的有意差が認められた（別添資料6, p.3, 表1）。また、米国の調査において、総さく数について、GHB119が 10.28 ± 6.59 個、Coker312が 12.54 ± 5.59 個となり、統計学的有意差が認められた（別添資料6, p.5, 表2）。

スペインの調査では、GHB119の草丈はCoker312に比べて有意に低かったが、
20 年の米国の調査では草丈に関して系統間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料6, p.5, 表2）ことから、遺伝子組換えによる形質の変化ではないと考えられる。また、米国の調査において、GHB119の総さく数はCoker312に比べて有意に少なかった。しかし、総さく数が少ないことは、競合において不利になると考えられることから、仮にこの差が常に生じたとしても、GHB119の競合における優位性を
25 高めるものではないと考えられる。

また、我が国のPIP実験室内において、GHB119とCoker312の生育初期の低温耐性を比較した結果、5°C条件下における萎縮程度に統計学的有意差は認められず、いずれも4週間後に枯死が認められた（別添資料5, p.9, 表3）。

30 これらのことから、形態及び生育に関して、GHB119の競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、GHB119は、Cry2Ae蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性、並びに改変PAT蛋白質による除草剤グルホシネート耐性を有する。しかし、チョウ目害虫抵抗性につ

5 いては、チョウ目昆虫の食害を受けにくいことにより既存のワタに比べ一時的に生存率が高まることがあったとしても、この性質のみによって栽培植物であるワタを自然条件下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考え難い。また、自然条件下において除草剤グルホシネートが選択圧となることは考え難い。よって、これらの性質により、GHB119の競合における優位性が高まることはないと考えられる。

10 以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位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。

10 (2) 影響の具体的内容の評価

—

15 (3) 影響の生じやすさの評価

—

20 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

20 以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、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した。

25 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

30 GHB119の種子には既存のワタの種子と同様に、非反芻動物等に対して毒性を示すゴシポール、並びに飽和脂肪酸の脱飽和を阻害し、鶏卵の変色やふ化率の低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、野生動物がワタの種子を摂食するという例は報告されていない。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

有害物質の産生性については、我が国のPIP実験室において後作試験及び鋤込み試験を行った結果、いずれの試験でも、検定植物の発芽率、草丈、生重及び乾物重について、GHB119区とCoker312区の間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料5, p.5, 表1及びp.7, 表2）。よって、GHB119は、新たに他感物質のような物質を産生していないと考えられる。

また、Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質、宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられることから、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生するおそれはないと考えられた。また、改変PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難く（文献36）、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。さらに、Cry2Ae蛋白質及び改変PAT蛋白質の各アミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索を行った結果、既知の毒素蛋白質又はアレルギーとの相同性は認められなかった。

GHB119は、Cry2Ae蛋白質によりチョウ目害虫抵抗性が付与されているため、隔離ほ場周辺に生息するチョウ目昆虫種がGHB119の植物体を摂食した場合、また、GHB119から飛散した花粉を摂食した場合に生存に影響を及ぼす可能性が考えられる。なお、ワタに飛来する可能性のある非標的昆虫として、ミツバチ (*A. mellifera*) 及びテントウムシ (*C. maculate*) を対象にCry2Ae蛋白質の投与試験が行われ、Cry2Ae蛋白質はこれらの成長及び生存に影響を及ぼさないことが確認されている（別添資料6, p.10～11, 表6～7）。

隔離ほ場周辺（宮崎県宮崎市）に生息するチョウ目昆虫種として、64種が挙げられた（文献46）。また、九州に分布するワタのチョウ目害虫として、ワタアカムシ (*Pectinophora gossypiella*)、ワタヘリクロノメイガ (*Diaphania indica*)、クワノメイガ (*Glyphodes pyloalis*)、ワタノメイガ (*Haritalodes derogata*)、オオタバコガ (*Helicoverpa armigera*)、シロナヨトウ (*Spodoptera mauritia*) が報告されている（本間, 2003）。

したがって、GHB119を隔離ほ場において栽培した場合に影響を受ける可能性のある野生動植物として、隔離ほ場周辺に生息する64種のチョウ目昆虫種並びに九州に分布するワタのチョウ目害虫として知られる6種が特定された。

(2) 影響の具体的内容の評価

5 (1) で特定されたチョウ目昆虫種のうち、ワタアカムシ (*P. gossypiella*) 及びオオタバコガ (*H. armigera*) に対するCry2Ae蛋白質の殺虫効果は確認されている (別添資料6, p.6, 表3) が、隔離ほ場周辺に生息するその他のチョウ目昆虫種に対する殺虫活性は調査されていないため、Cry2Ae蛋白質がこれらの昆虫種に殺虫活性を示す可能性は否定できない。

(3) 影響の生じやすさの評価

10

(1) で特定されたチョウ目昆虫種はいずれも絶滅危惧Ⅰ類、絶滅危惧Ⅱ類、準絶滅危惧種には指定されておらず、隔離ほ場周辺のみ分布する種も認められなかった (文献46, 51)。また、ワタのチョウ目害虫として特定された6種はいずれもワタのみを食草とする種ではない (文献51)。したがって、GHB119の植物体の摂食による影響が生ずるのはチョウ目昆虫の幼虫が隔離ほ場内に局所的に存在する場合に限られる。しかし、そのような可能性は低く、GHB119の植物体を幼虫が摂食することにより個体群の維持に影響を及ぼすとは考え難い。また、GHB119から飛散した花粉の摂食による影響に関しては、ワタの花粉は比較的強く粘着性があることから、風により飛散することはほとんどない (文献35)。さらに、放飼昆虫を用いた交雑試験でも花粉源からの距離が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37)。よって、仮に飛散してもその範囲は極めて限られたものであると考えられる。したがって、ワタを摂食しないチョウ目昆虫種が花粉に暴露される可能性は低いと考えられる。

25 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、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した。

30 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

我が国において、GHB119の宿主が属する種であるワタ (*G. hirsutum*) と交雑可能な近縁種野生種は自生していないため、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。

5 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

10

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無の判断

15 以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、交雑性に起因して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

20

上記の他に、隔離ほ場で使用する範囲内では、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性質はないと考えられる。

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経験があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。

5

競合における優位性に関しては、形態及び生育の特性について、スペイン及び米国における野外試験並びに我が国でのPIP実験室において調査した結果、GHB119の競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、GHB119は、*cry2Ae*遺伝子の発現によるチョウ目害虫抵抗性及び改変*bar*遺伝子の発現による除草剤グルホシネート耐性を付与されている。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で生育することを困難にさせる主要因ではないこと、また、自然環境下において除草剤グルホシネートが選択圧となる可能性は考え難いことから、これらの形質により競合における優位性を高めることはないと考えられた。

15 以上から、隔離ほ場で使用する範囲内では、競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

有害物質の産生性に関して、GHB119の種子は既存のワタの種子と同様に、非反芻動物等に対して毒性を示すゴシポール及び飽和脂肪酸の脱飽和を阻害し、鶏卵の変色やふ化率の低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、野生動物がワタの種子を摂食するという例は報告されていない。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

また、我が国のPIP実験室において後作試験及び鋤込み試験を行った結果、根から分泌され他の植物に影響を与えるような物質、並びに、植物体内に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるような物質は、新たに産生していないと考えられた。

さらに、Bt蛋白質が酵素活性を示すとする報告はなされておらず、Cry2Ae蛋白質は宿主の代謝系とは独立して機能すると考えられること、また、改変PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することは考え難いことから、いずれの蛋白質についても、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられた。さらに、Cry2Ae蛋白質及び改変PAT蛋白質の各アミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索を行った結果、既知の毒素蛋白質又はアレルゲンとの相同性は認められなかった。

また、Cry2Ae 蛋白質により、隔離ほ場周辺に生息するチョウ目昆虫種が GHB119 の植物体を摂食した場合、また、GHB119 から飛散した花粉を摂食した場合に、生存に影響を及ぼす可能性が考えられた。よって、影響を受ける可能性のある野生動物として、隔離ほ場周辺に生息する 64 種のチョウ目昆虫及びワタを食草とすることが知られているチョウ目害虫 6 種が特定された。しかしながら、これらのチョウ目昆虫種はいずれも絶滅危惧 I 類、絶滅危惧 II 類及び準絶滅危惧種には指定されておらず、隔離ほ場周辺のみ分布する種は認められなかった。したがって、GHB119 の植物体の摂食による影響が生ずるのはチョウ目昆虫の幼虫が隔離ほ場内に局所的に存在する場合に限られるが、そのような可能性は低く、植物体の直接的な摂食によりその個体群の維持に影響を及ぼすとは考え難い。また、GHB119 から飛散した花粉の摂食による影響に関しては、ワタの花粉は比較的強く粘着性があることから、風により飛散する可能性は低く、仮に飛散してもその範囲は極めて限られたものであると考えられる。したがって、ワタを摂食しないチョウ目昆虫種が GHB119 の花粉に暴露される可能性は低いと考えられた。

15 以上から、GHB119 が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、隔離ほ場で使用する範囲内では、有害物質の産生性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

20 交雑性に関して、我が国には GHB119 の宿主が属するワタ (*G. hirsutum*) と交雑する可能性のある野生植物は自生していないことから、隔離ほ場で使用する範囲内では、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

25 以上から、GHB119 を第一種使用規程に従い、当該隔離ほ場において第一種使用等を行った場合、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

5

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

- 5 別添資料 1 挿入遺伝子の分子特性
(Summary report on the molecular characterization of Cry2Ae Cotton event GHB119)
社外秘情報につき非開示
- 10 別添資料 2 GHB119 に移入された核酸の塩基配列
(Full DNA sequence of event insert and integration site of *Gossypium hirsutum* transformation event GHB119)
社外秘情報につき非開示
- 15 別添資料 3 GHB119 における Cry2Ae 蛋白質及び改変 PAT 蛋白質の発現量分析
(Protein expression analysis of cotton event GHB119, expressing Cry2Ae and PAT/*bar* proteins)
社外秘情報につき非開示
- 20 別添資料 4 イベント識別方法
社外秘情報につき非開示
- 25 別添資料 5 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 GHB119 における環境安全性評価試験
社外秘情報につき非開示
- 30 別添資料 6 GHB119 の特性調査及び環境影響評価試験
社外秘情報につき非開示
- 35 別添資料 7 隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画
社外秘情報につき非開示

緊急措置計画書

平成 21 年 5 月 28 日

5 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

10 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*, *cry2Ae*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB119, OECD UI: BCS-GH005-8）（以下、「GHB119」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場合は、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。

15 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	
(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	Bayer CropScience, BioScience

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

25 弊社は栽培試験担当者及び管理責任者から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行なう。

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

30 GHB119の使用に伴い、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、栽培試験担当者及び管理責任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。

35 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

当該影響を生ずるおそれに基づき、上記2及び3において示した個人または団体に対し、GHB119を不活性化する措置またはGHB119の環境への放出を防止するための措置、並びに既に環境に放出されたGHB119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

10 GHB119が我が国の生物多様性に影響を及ぼす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。