

5 除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性並びにチョウ目害虫抵抗性ワタ (2*mepsps*, 改変 *bar*, 改変 *cry1Ac*, 改変 *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.) (GHB614 × LLCotton25 × 15985, OECD UI: BCS-GH002-5 × ACS-GH001-3 × MON-15985-7) (GHB614、LLCotton25 及び 15985 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有するものであって当該ワタから分離した後代系統のもの(既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。)を含む。) 申請書等の概要

	第一種使用規程承認申請書	5
10	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	6
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	6
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	6
	① 和名、英名及び学名	6
	② 宿主の品種名	6
15	③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	6
	(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	7
	② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	8
	(3) 生理学的及び生態学的特性	8
20	イ 基本的特性	8
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	8
	ハ 捕食性又は寄生性	9
	ニ 繁殖又は増殖の様式	9
	① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	9
25	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	9
	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	9
	④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命	9
30	ホ 病原性	10
	ヘ 有害物質の産生性	10
	ト その他の情報	10

2	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	17
5		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	17
		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	17
10		③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	21
	(2)	ベクターに関する情報	23
		イ 名称及び由来	23
		ロ 特性	23
		① ベクターの塩基数及び塩基配列	23
15		② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	23
		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	23
	(3)	遺伝子組換え生物等の調製方法	28
		イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	28
20		ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	28
		ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	28
		① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	28
		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	29
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	29
	(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	31
		① 移入された核酸の複製物が存在する場所	31
30		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	31
		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	32

	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 ……………	34
	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 ……………	35
5	(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…	35
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 ……………	35
	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 ……………	35
10	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……………	40
	a. 形態及び生育の特性……………	41
	b. 生育初期における低温又は高温耐性……………	44
	c. 成体の越冬性又は越夏性……………	44
15	d. 花粉の稔性及びサイズ……………	44
	e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率……………	45
	f. 交雑率……………	46
	g. 有害物質の産生性……………	46
20	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報……………	47
	(1) 使用等の内容……………	47
	(2) 使用等の方法……………	47
	(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……………	47
25	(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……………	47
	(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……………	47
	(6) 国外における使用等に関する情報……………	47
30	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価……………	49
	1 競合における優位性……………	49
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……………	49

	(2) 影響の具体的内容の評価	50
	(3) 影響の生じやすさの評価	51
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	51
2	有害物質の産生性	51
5	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	51
	(2) 影響の具体的内容の評価	52
	(3) 影響の生じやすさの評価	53
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	53
3	交雑性	53
10	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	53
	(2) 影響の具体的内容の評価	53
	(3) 影響の生じやすさの評価	53
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	53
4	その他の性質	53
15	第三 生物多様性影響の総合的評価	54
	参考文献	56
	別添資料の内容	56
20	緊急措置計画書	57

第一種使用規程承認申請書

平成 22 年 9 月 7 日

5

農林水産大臣 山田 正彦 殿  
環境大臣 小沢 鋭仁 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 ギャビン マーチャント 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	除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性並びに チョウ目害虫抵抗性ワタ ( <i>2mepsps</i> , 改変 <i>bar</i> , 改変 <i>cry1Ac</i> , 改変 <i>cry2Ab</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (GHB614 ×LLCotton25×15985, OECD UI: BCS-GH002-5× ACS-GH001-3×MON-15985-7) (GHB614, LLCotton25 及び 15985 それぞれへの導入遺伝子の組合せを有する ものであって当該ワタから分離した後代系統のもの (既に第一種使用規程の承認を受けたものを除く。) を含む。)
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	—

## 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（陸地棉）

10 英名：Upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

##### ② 宿主の品種名

15 除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性並びにチョウ目害虫抵抗性ワタ  
（*2mepsps*, 改変 *bar*, 改変 *cry1Ac*, 改変 *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.）  
（GHB614×LLCotton25×15985, OECD UI: BCS-GH002-5×ACS-GH001-3×  
MON-15985-7）（以下、「本スタック系統」とする。）は、以下の遺伝子組換えワタを  
従来の交雑育種法を用いて作出した交配後代種である。

20 ー 除草剤グリホサート耐性ワタ（*2mepsps*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB614, OECD  
UI: BCS-GH002-5）（以下、「GHB614」とする。）

ー 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。）

25 ー チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *cry1Ac*, 改変 *cry2Ab*, *Gossypium hirsutum* L.）（15985,  
OECD UI: MON-15985-7）（以下、「15985」とする。）

宿主はいずれもワタ（*G. hirsutum* L.）の品種Coker312である。

##### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

30

*G. hirsutum*（以下、「ワタ」とする。）は四倍体ワタの栽培種であり（文献72）、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種（文献23）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46）。ワタ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59；68）、オーストラリア群（*Sturtia*亜属）の約17種（文献9）、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3）であり、四倍体種はメソアメリカ（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72）。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46）。

## (2) 使用等の歴史及び現状

15

### 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（*G. hirsutum*）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82）。

25 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82）。今日生産されるワタ属栽培種の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46）。

30 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80）。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82）。

## ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5

2009年の世界における綿実の生産量は約6,400万tであり、主な生産国は中国（2,300万t）、インド（1,138万t）、米国（633万t）、パキスタン（617万t）である（文献18）。

2009年には、搾油用の綿実約11万t、綿実油2,862 tが輸入されている（文献81）。また、2008年の綿実油粕の輸入量は5,086 tであり、主な輸入先は中国（4,545 t）、米国（423 t）であった（文献78）。

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80）。

15

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80）。

20

## (3) 生理学的及び生態学的特性

### イ 基本的特性

25

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46）。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である（文献48）が、一般的には茎長1 mから1.5 mで栽培されている（文献46）。

### ロ 生息又は生育可能な環境の条件

30

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46）。生育の最適温度は、昼温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53）。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17）。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80）。

5

#### ハ 捕食性又は寄生性

\_\_\_\_\_

#### 10 ニ 繁殖又は増殖の様式

##### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

15 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82）、種子の脱粒性は低い（文献36）。品種によっては収穫後2～3ヶ月の休眠期を持つ（文献17）。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52）、自然環境では寿命は比較的短いと考えられる。

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

ワタは種子繁殖であり、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。

25

##### 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

30 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36）。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。

##### 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以上の蒴を形成し、一つの蒴で350～900個の花粉粒が生産される（文献46）。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64）、自然交雑の程度は主にマルハナバチ（*Bombus* 5 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42；46）。米国での調査では、除草剤耐性ワタの商業栽培ほ場から1640 m（1マイル）地点でも散発的な交雑（0.04%）が認められたことが報告されている（文献67）。しかし、同じく除草剤耐性ワタを用いた交雑試験では、媒介昆虫の活発な活動の条件下では花粉源からの距離が9 m以上で交雑率は1%以下になり、媒介昆虫の活動が乏しい条件下では1 10 m以上で1%以下であった（文献67）。また、除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10 m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、60 m以上では耐性個体の出現は認められなかった（文献76）。

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 15 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54）。

#### ホ 病原性

20 \_\_\_\_\_

#### 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 25 を産生することは知られていない。

#### ト その他の情報

30 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46）。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34）。

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62)。また、両異性体には遊離型と結合型があり、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5)。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46)、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79)。

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、油の精製工程で除去される (文献28 ; 45)。

ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、綿実は大量の繊維に覆われているため鳥類のような種子を摂食する動物は好まず、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや種子の形態により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

本スタック系統はGHB614、LLCotton25及び15985それぞれの特性を有する。よって、以下では各親系統の調製等に関する情報について個別に述べた。

- 5     なお、15985は*Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*由来の改変*cry1Ac*遺伝子が導入された  
チヨ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  
10     り返し育成された組換えワタ品種DP50Bに、新たに*B.thuringiensis* ssp. *kurstaki*由来の改  
変*cry2Ab*遺伝子を導入することにより作出された。したがって、以下では531の調製等  
に関する情報についても述べている。

### (1) 供与核酸に関する情報

#### イ 構成及び構成要素の由来

15

GHB614、LLCotton25、531及び15985の作出に用いられた供与核酸の構成要素をそれぞれ表1～表4（p.13～16）に示した。また、供与核酸の構成を図1～4（p.24～27）に図示した。

20

表1 GHB614の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	ベクター上の位置	サイズ (bp)	機能
2mepsps遺伝子発現カセット			
Ph4a748At	0026-1036	1011	シロイヌナズナ ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) 由来のヒストンH4のプロモーター領域を含む配列 (文献10)。植物中で構成的に2mepsps遺伝子の転写を開始させる。
intron1 h3At	1037-1553	517	シロイヌナズナ ( <i>A. thaliana</i> ) 由来のヒストンH3.3の第II遺伝子の第一イントロンを含む配列 (文献11)。
TPotp C	1554-1926	373	ヒマワリ ( <i>Helianthus annuus</i> ) 及びトウモロコシ ( <i>Zea mays</i> ) のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に合成された (文献37)。成熟した2mEPSPS蛋白質を色素体に輸送する。
2mepsps	1927-3264	1338	トウモロコシ ( <i>Z. mays</i> ) 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 ( <i>epsps</i> 遺伝子) に点突然変異を起こした、2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (2mEPSPS蛋白質) をコードする遺伝子 (文献38) で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。なお、2mEPSPS蛋白質では、野生型EPSPS蛋白質のアミノ酸の102番目のトレオニンがイソロイシンに、また、106番目のプロリンがセリンにそれぞれ改変されている。また、 <i>epsps</i> 遺伝子の色素体膜輸送ペプチドをコードする配列は、取り除かれている。
3'histonAt	3265-4007	743	<i>A. thaliana</i> 由来のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域 (文献10) を含む配列で、転写を終結させ3' ポリアデニル化を生じさせる。
その他			
LB	0001-0025	25	<i>Rizobium radiobacter</i> ( <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ) 由来のT-DNA由来の左側境界反復配列 (文献75)。
RB	4008-4032	25	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来のT-DNA由来の右側境界反復配列 (文献75)。
—	4033-4224	192	右側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片 (文献77)。
nptI断片	4225-4935	711	ネオマイシン ホスホトランスフェラーゼをコードするトランスポゾンTn903由来のnptI遺伝子 (文献47) の断片。なお、本配列は断片であるため機能しない。
ORI ColE1	4936-6108	1173	<i>Escherichia coli</i> のプラスミドpBR322 (文献7) 由来複製起点を含む配列。
ORI pVS1	6109-9879	3771	<i>Pseudomonas</i> のプラスミドベクターpVS1 (文献32) の複製起点 (文献29) を含む配列。
aadA	9880-11648	1769	<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20) を含む配列。
—	11649-11953	305	左側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片 (文献77)。

(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帰属する。)

表2 LLCotton25の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	ベクター上の位置	サイズ (bp)	機能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット			
P35S3	250-1634	1385	カリフラワーモザイクウイルス 35S 転写物遺伝子由来のプロモーター領域で、転写を開始させる (文献 44)。
改変 <i>bar</i>	1635-2186	552	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の <i>bialaphos resistance (bar)</i> 遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する (文献 65)。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N 末端の 2 つのコードン (GTG 及び AGC) は ATG と GAC にそれぞれ置換されている。なお、GTG→ATG の置換ではアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC→GAC の置換ではセリンからアスパラギン酸に変化している。
3'nos	2206-2465	260	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'ポリアデニル化を生じさせる (文献 16)。
その他			
RB	198-222	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界反復配列 (文献 25)。
LB	2520-2544	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界反復配列 (文献 25)。
<i>aadA</i>	2545-4618	2074	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 39) を含む配列。
pVS1ori	4619-8389	3771	<i>Pseudomonas</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点 (文献 32)。
ColE1	8390-9555	1166	プラスミド pBR322 由来の複製起点 ColE1 ori を含む配列 (文献 7)。

(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帰属する。)

表 3 531 の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	機能
改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット	
P-E35S	2 重エンハンサー (文献 35) 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 (文献 44)。
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> ssp. <i>kurstaki</i> の産生する野生型 <i>Cry1Ac</i> 蛋白質とのアミノ酸配列相同性は 99.4%だが、コア蛋白質のアミノ酸配列は野生型 <i>Cry1Ac</i> 蛋白質と同一である (文献 1)。
7S 3'	ダイズの $\beta$ -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 (文献 56)。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	
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 (文献 55 ; 56)。
<i>nptII</i>	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来する遺伝子 (文献 4)。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 (文献 22)。
NOS3'	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域 (文献 6 ; 16)。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>R. radiobacter</i> ( <i>A. 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 (文献 6 ; 16)。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn 7 由来のアミノグリコシド改変酵素である 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼの細菌プロモーター、コード領域及びターミネーター。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 (文献 20)。
<i>ori-V</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>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) ABI 株においてベクターに自律増殖能を付与する (文献 60)。
<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>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) への接合伝達に必要な <i>oriT</i> 配列を含む (文献 7 ; 63)。

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

表 4 15985 の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	機能
<i>uidA</i> 遺伝子発現カセット	
P-E35S	2 重エンハンサー (文献 35) 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 (文献 44)。
改変 <i>uidA</i>	大腸菌プラスミド pUC19 由来の <i>uidA</i> 遺伝子。GUS ( $\beta$ -D-glucuronidase) 蛋白質をコードする (文献 26)。GUS 蛋白質はグルクロン酸と種々のアグリコンとの縮合体である $\beta$ -グルクロニドを加水分解する酵素であり、形質転換の際に可視定量マーカーとして用いられる。
NOS'3	<i>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域 (文献 6 ; 16)。転写を終結させポリアデニル化を誘導する。
改変 <i>cry2Ab</i> 遺伝子発現カセット	
P-E35S	2 重エンハンサー (文献 35) 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 (文献 44)。
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>A. 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 (文献 66)。
改変 <i>cry2Ab</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> ssp. <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改変 Cry2Ab 蛋白質をコードする遺伝子 (文献 73)。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>R. radiobacter</i> ( <i>A. tumefaciens</i> ) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域 (文献 6 ; 16)。転写を終結させポリアデニル化を誘導する。

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



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

5

GHB614、LLCotton25、531及び15985の作出に用いた供与核酸の構成要素それぞれの機能は表1～表4 (p.13～p.16) に示した。

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

10

### 2mEPSPS蛋白質

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 蛋白質 (EC 2.5.1.19) は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路である、シキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、ホスホエノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生ずる可逆反応を触媒する。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素-基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻害する (文献8)。その結果、植物は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、枯死する。

20

GHB614に導入された2mepsps遺伝子は、トウモロコシ (*Z. mays*) からクローニングされたEPSPS蛋白質をコードするepsps遺伝子の2ヶ所のヌクレオチドが点突然変異により置き換えられた遺伝子である。2mepsps遺伝子が産生する2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列は、野生型のEPSPS蛋白質のアミノ酸の102番目のトレオニンがイソロイシンに、また106番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している。これにより、2mEPSPS蛋白質はグリホサートに対する結合親和性が低くなり、グリホサートによる活性阻害を受けずシキミ酸合成経路が機能するため、グリホサートの存在下でも生育することができる。

25

また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2008年に各種データベース (Uniprot\_Swissprot、Uniprot\_TrEMBL、PDB、DAD、GenPept及びAllergenOnline) に登録されている蛋白質との包括的相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

30

## 20 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、植物は枯死する。

改変*bar*遺伝子のN末端の2つのコドンは、植物で使用されるコドンに適合するためにGTG→ATGに、また、翻訳の効率を上げるためにAGC→GACに置換されている。GTG→ATGの置換では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の置換ではセリンからアスパラギン酸に変化している。

改変*bar*遺伝子がコードする改変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に対する阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアの蓄積が回避され、除草剤グルホシネートを散布されても植物は枯死しない。

改変PAT蛋白質のアミノ酸配列について、2009年に各種データベース(Uniprot\_Swissprot、Uniprot\_TrEMBL、PDB、DAD、GenPept及びAllergenOnline)に登録されている蛋白質との包括的相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

## 20 改変Cry1Ac蛋白質

改変*cry1Ac*遺伝子は既に植物体内での発現量を高める目的で塩基配列にサイレント変異を加えてあり、尚且つCry1Ac蛋白質のアミノ酸配列との相同性が非常に高い*cry1Ab*遺伝子の最初の1,398塩基(アミノ酸配列では1-466番目)(文献51)と*cry1Ac*遺伝子の1,399~3,534番目(アミノ酸配列では467-1178番目)の塩基(文献1; 21)を結合させることにより構築された。なお、構築に用いた*cry1Ac*遺伝子の1,399~3,534番目については、植物体内での発現を高める目的で塩基配列にサイレント変異を新たに導入した後に、*cry1Ab*遺伝子と結合させた。改変*cry1Ac*遺伝子から発現する改変Cry1Ac蛋白質は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73から産生される野生型のCry1Ac蛋白質と比較して7つのアミノ酸が異なるが、これらの置換は既に第一種使用の承認(平成16年11月22日)を受けているチョウ目害虫抵抗性ワタ(*cry1Ac*, *Gossypium hirsutum* L.) (531, OECD UI: MON-00531-6)(以下「531」という。)中で発現している改変Cry1Ac蛋白質と同一である。7つのアミノ酸の違いのうち、6つはアミノ酸配列の466番目までに存在し、これは改変Cry1Ac蛋白質の前半部分の由来であるCry1Ab蛋白質と野生型

のCry1Ac蛋白質の間のアミノ酸配列の違いによるものである。また、766番目のアミノ酸の違いは*B. thuringiensis* のCry1Ac蛋白質の持つ多様性に起因するものであり、遺伝子のクローニングに用いた株がもともと有していたアミノ酸変異であると考えられた。結果として本スタック系統で発現する改変Cry1Ac蛋白質の推定アミノ酸配列と、  
5 *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株から生産される野生型Cry1Ac蛋白質の推定アミノ酸配列（文献1; Genbank accession M11068）との相同性は99.4%である。

Cry1A蛋白質はチョウ目昆虫のみに殺虫活性を持つことが知られている（文献13）。また、Cry1Ac蛋白質に分類される蛋白質は95%の相同性の範囲内で多様性を持っており（文献13）、*B. thuringiensis*から同定されたCry1Ac蛋白質にいくつかの変異型が存在することも知られている（文献69）。上述したように、本スタック系統で発現する改変Cry1Ac蛋白質と*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD-73株が生産する野生型Cry1Ac蛋白質との相同性は99.4%であり、Cry1Ac蛋白質がもともと有する95%以上の相同性の範囲内であるため、改変Cry1Ac蛋白質のチョウ目昆虫に対する殺虫スペクトラムは自然  
15 自然界に存在するCry1Ac蛋白質と同等と考えられる。

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（AD\_2010<sup>1</sup>）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は共有してなかった。

20

### 改変Cry2Ab蛋白質

改変*cry2Ab*遺伝子がコードする改変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*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki*に由来し、Cry2Ab2、CryIIB、CryB2またはCryIIAbとも呼ばれている（文献13；40；73）。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。改変Cry2Ab蛋白質は植物中での発現を高めるために野生型Cry2Ab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、コア蛋白質のアミノ酸配列に関しては変化していないため、チョウ目害虫に対する活性は、野生型のCry2Ab蛋白質と同等であると考えられる。

30

改変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（AD\_2010<sup>1</sup>）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。

#### 5 改変cry1Ac遺伝子+改変cry2Ab遺伝子

15985中では531由来の改変Cry1Ac蛋白質に加えて、新たに改変Cry2Ab蛋白質が発現しているため、これまで531では防除効果が得られなかったヨトウムシ類（Fall Armyworm、Beet Armyworm）やアオムシ類（Soybean Looper）を防除することが可能になる（文献2；61）。

10 前述したように改変Cry1Ac蛋白質と改変Cry2Ab蛋白質に感受性を示すチョウ目害虫は重複することから、15985に対しチョウ目害虫が抵抗性を獲得するためには両Bt蛋白質に対して抵抗性を獲得しなければならない。このことから15985は、改変Cry1Ac蛋白質のみを単独で発現する531と比べて、両Bt蛋白質に感受性を示す標的チョウ目害虫が抵抗性を獲得する確率をより一層低く出来ると期待されている。

15

#### 改変 GUS 蛋白質

*uidA* 遺伝子によってコードされている *E. coli* 由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼ（ $\beta$ -glucuronidase, GUS）蛋白質は、グルクロン酸と種々のアグリコンとの縮合体である  $\beta$ -グルクロニドを加水分解する酵素である（文献 49）。組織化学的検定には、基質として 5- ブ ロ モ -4- ク ロ ロ -3- イ ン ド リ ル - $\beta$ - グ ル ク ロ ニ ド（5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronide, X-gluc）が用いられている。この基質は GUS により加水分解を受け二量化しインジゴチンの青色の色素を生成することから、*uidA* 遺伝子は植物形質転換の過程で可視定量マーカーとして使用される（文献 33）。

25 （文献 26）は植物における安全性を広範囲で論評しており、植物中で選抜マーカーとして使用されている *E.coli* 由来の GUS 蛋白質は食品として安全であると述べている（文献 26）。また GUS 様活性は 50 以上の植物の胚、果実、種皮及び胚乳などの多くの組織で検出されている（文献 31）。これらの植物には、リンゴ、ソラマメ、テンサイ、キャベツ、ニンジン、セロリ、トウモロコシ、キュウリ、レタス、セイヨウナシ、トウガラシ、ダイコン、ダイズ、ホウレンソウ及びトマトなどといった多くの食用作物が含まれる。

30

---

<sup>1</sup> FARRP (Food Allergy Research and Resource Program) Allergen Online database (FARRP, 2010) に2010年1月の時点で登録されていた配列からなるデータベース。

## NPT II 蛋白質

NPT II 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質の有するアミノ配糖体の水酸基をリン酸化する反応を触媒する酵素である (文献 57)。NPT II 蛋白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている (文献 14 ; 15 ; 50)。

### ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

## 10 2mEPSPS蛋白質

2mEPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、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おり (文献 30 ; 71) 実際に、通常の 40 倍の EPSPS 蛋白質を産生する植物培養細胞において、芳香族アミノ酸は過剰に合成されないことが報告されている (文献 58)。また、2mEPSPS 蛋白質を発現する GHB614 の種子における芳香族アミノ酸 (フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン) の含有量は、宿主品種の種子と比較して統計学的有意差は認められなかった。

また、EPSPS 蛋白質は PEP 及び S3P 以外に S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS 蛋白質とシキミ酸の反応性は低く (文献 27)、高い基質特異性を有している。

以上から、2mEPSPS蛋白質は高い基質特異性を示し、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

## 25 改変PAT蛋白質

改変*bar*遺伝子産物の改変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、改変PAT蛋白質が各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、また、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ずることはない (文献65)。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、改変PAT蛋白質の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いことが報告されている (文献70)。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し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

### 改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質

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、改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab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。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。

### 改変GUS蛋白質

GUS蛋白質の基質であるグルクロニドは、脊椎動物の生体内ではUDP グルクロン酸がグルクロニル基の供与体となり、UDP グルクロノシルトランスフェラーゼ (UDPglucuronosyltransferase) の作用により合成される。生理学的にはこの反応は解毒の意味を持ち、ステロイド、ビリルビン、アニリン、安息香酸などが肝臓中でグルクロニドに合成され尿中に排出される。植物中では $\beta$ -グルクロニドの存在は殆ど知られていないが、これまでに明らかとなっているものを挙げるとサポニン-グルクロニド (文献 74)、クエルセチン-グルクロニド及びフラボノイド-グルクロニド (文献 43) がある。植物におけるこれらの $\beta$ -グルクロニドの生理学的活性は殆ど不明で遺伝子組換え植物中で発現する *E. coli* 由来の GUS 蛋白質及び腸の GUS 蛋白質の基質に成り得るかということも解っていない。しかし、グルクロニドは水に易溶性の二次代謝物として液胞やアポプラストへの排泄により一次代謝から取り除かれることが知られている (文献 41)。

さらに15985の構成成分の分析において、対照の組換え母本DP50B (531) 及び非組換え系統DP50との間に意味を持つと考えられる差異が認められなかったことや米国や日本で行われた環境安全性試験で形態、生育特性に差異が認められなかったこと、そして他の食用作物においてGUS様活性が認められていることからGUS蛋白質の発現が、植物の代謝経路に重要な影響を及ぼすとは考えにくい。

### NPT II 蛋白質

②で述べたとおり、NPT II 蛋白質は、ネオマイシン、カナマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、ブチロシンのような限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与していることが報告されている (文献 14 ; 15 ; 50)。さらに、NPT II 蛋白質の構造活性学的な検討の結果、NPT II 蛋白質はアミノグリコシド系抗生物質のアミノ配糖体の構造の微細な変化 (例：水酸基を除去する、アミノ基を改変する等) により、アミノグリコシド系抗生物質を基質とすることができなくなることが示されている (文献 50)。以上のことから、NPT II 蛋白質がワタ中で発現することに

より新規の代謝系が生じたり、新規の代謝産物が生じたりすることはないと考えられる。

## (2) ベクターに関する情報

5

### イ 名称及び由来

GHB614の作出に用いられたベクターは、*E. coli*由来のプラスミドpBR322及び  
*Pseudomonas*由来プラスミドpVS1等を基に構築されたpGSC1700（文献12）に由来する  
10 pTEM2（図1, p.24）である。

LLCotton25の作出に用いられたベクターは、*E. coli*由来のプラスミドpBR322及び  
*Pseudomonas*由来プラスミドpVS1を基に構築されたpGSV71（図2, p.25）である。

531 及び 15985 の作出に用いられたプラスミドベクターPV-GHBK04 及び  
PV-GHBK11 はいずれも、pBR322 に由来する。pBR322 は *E. coli* 由来の合成プラスミ  
15 ドである。（図 3, p.26; 図 4, p.27）

### ロ 特性

#### ① ベクターの塩基数及び塩基配列

20

GHB614 : pTEM2 ; 11,953 bp

LLCotton25 : pGSV71 ; 9,555 bp

531 : PV-GHBK04 ; 11,407 bp

15985 : PV-GHBK11 ; 8,710 bp

25

#### ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pTEM2、pGS71、PV-GHBK04及びPV-GHBK11の各構成要素については、それぞれ  
表1～表4（p.13～p.16）に示した。

30

#### 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

pTEM2、pGSV71、PV-GHBK04及びPV-GHBK11の感染性はいずれも知られていない。

5

10

15

20

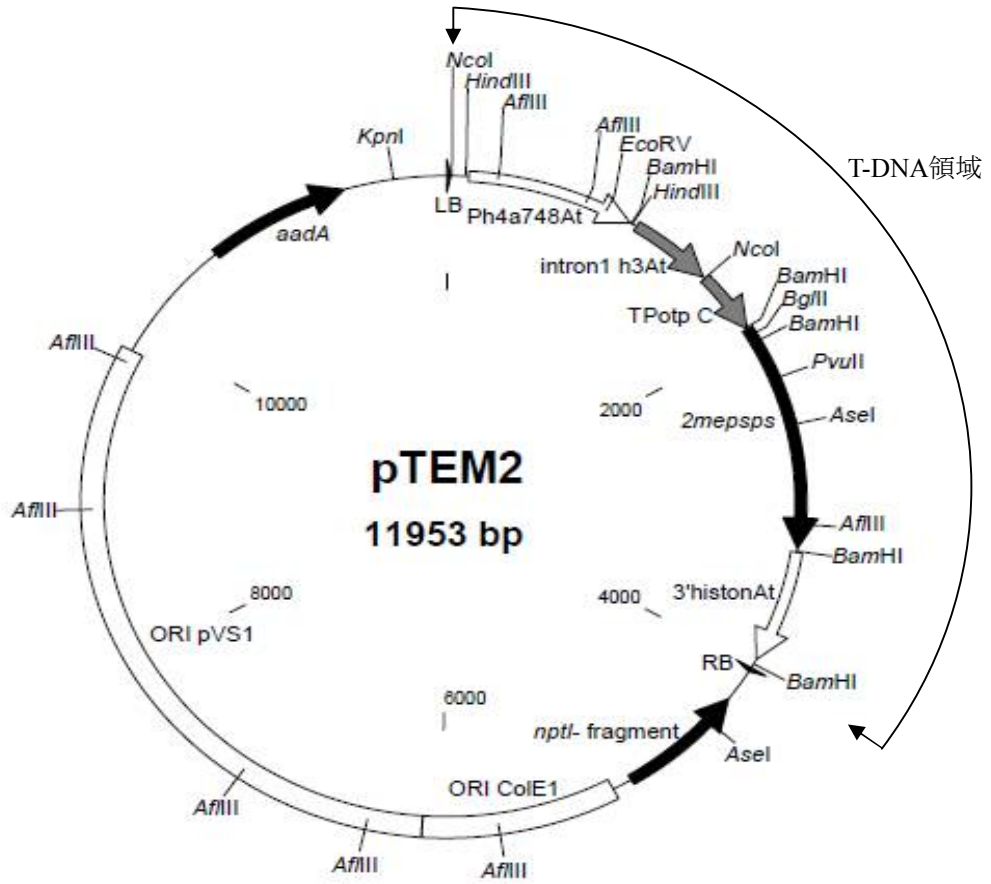


図1 GHB614の作出に用いたpTEM2のベクター地図及び制限酵素切断部位  
 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

25



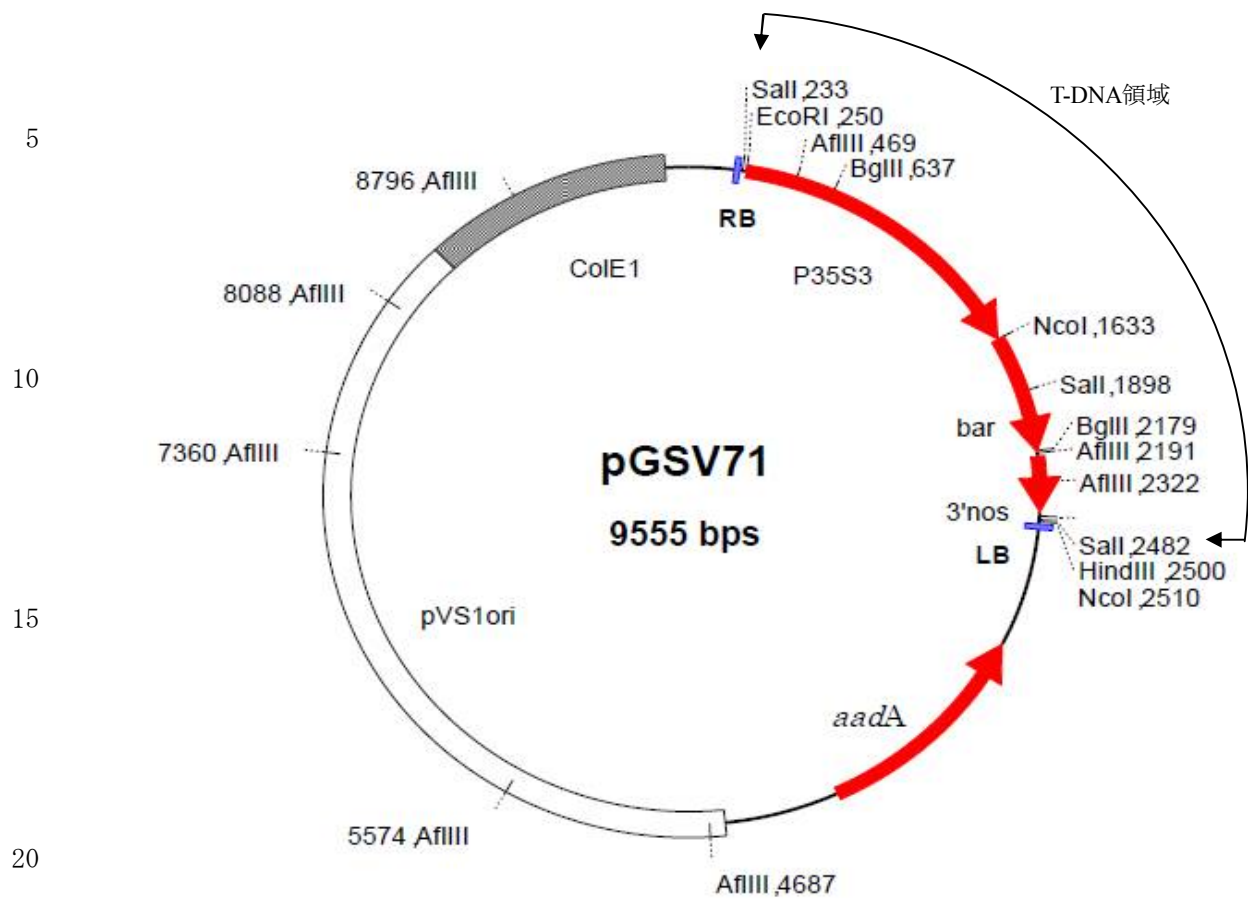


図2 LLCotton25の作出に用いたpGSV71のベクター地図及び制限酵素切断部位

図中のbarは改変bar遺伝子を示す。

(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帰属する。)

5

10

15

20

25

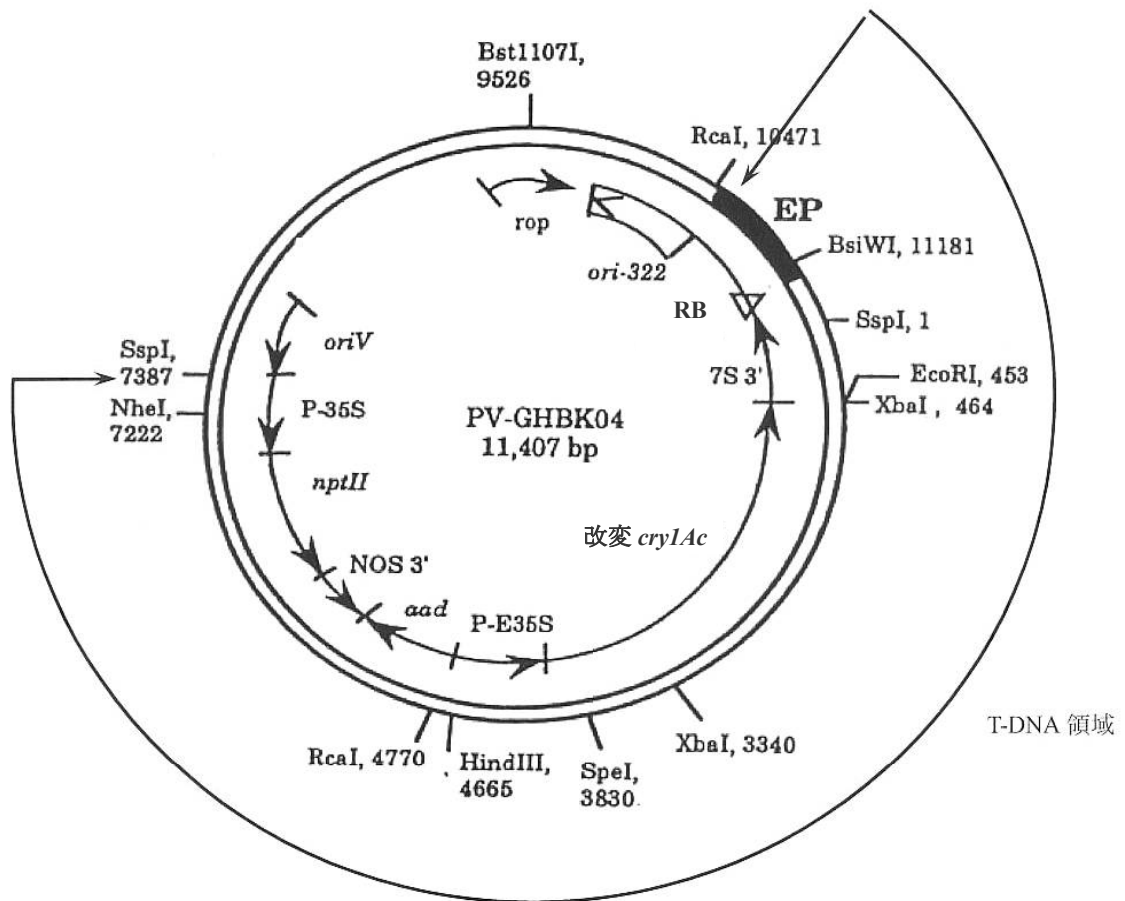


図3 531の作出に用いたPV-GHBK04のベクター地図及び制限酵素切断部位  
(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。)

5

10

15

20

25

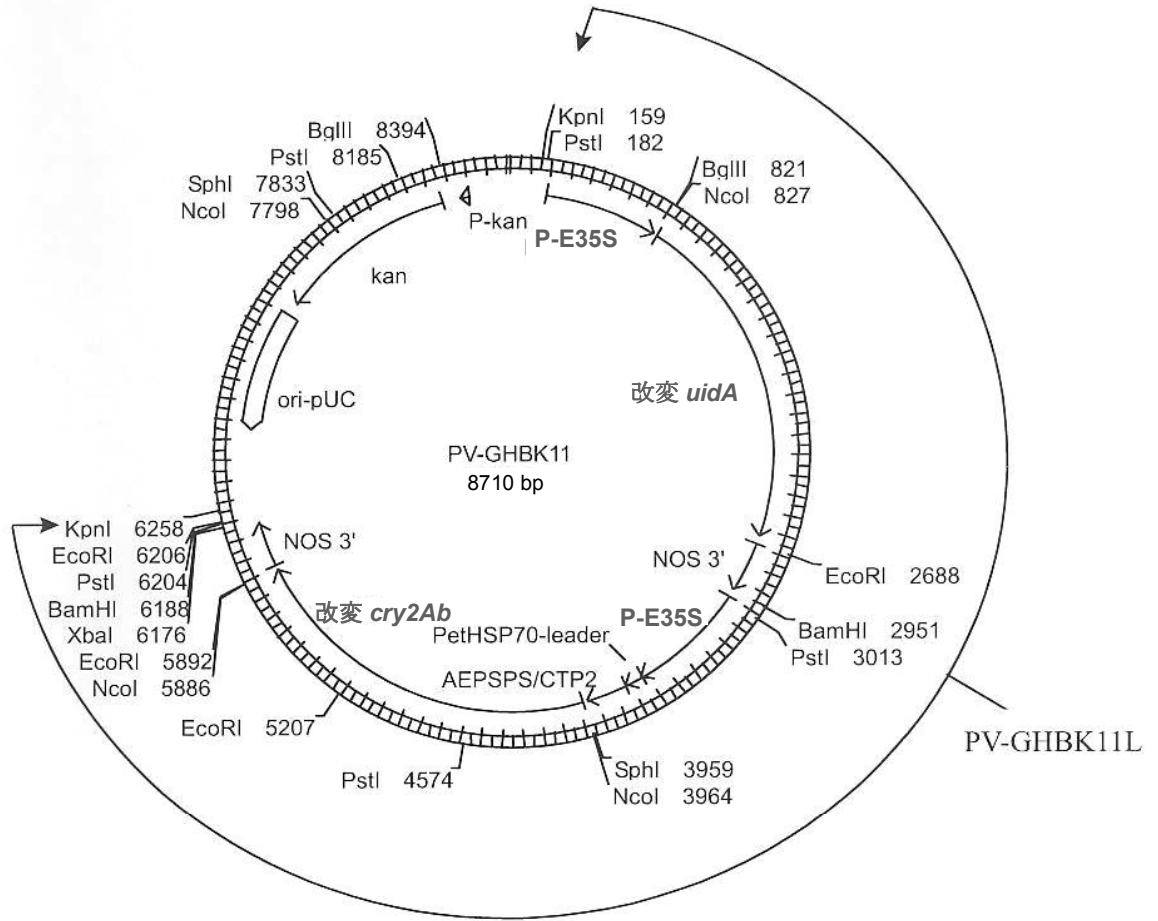


図4 15985の作出に用いたPV-GHBK11のベクター地図及び制限酵素切断部位  
 (注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。)

### (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

- 5 GHB614及びLLCotton25の作出には、それぞれpTEM2 (図1, p.24) 及びpGSV71 (図2, p.25) のT-DNA領域が宿主内に移入された。

531の作出に用いられ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による切断部位に関しては図3 (p.26) に記載した。

10

- 15985の作出に用いられ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による切断部位に関しては図4 (p.27) に記載した。なお、植物細胞に遺伝子を導入する際には、PV-GHBK11を制限酵素*KpnI*で処理し、改変*uidA*遺伝子発現カセット ([P-e35S]-[改変 *uidA*]-[NOS3']) 及び改変 *cry2Ab* 遺伝子発現カセット ([P-e35S]-[PetHSP70 leader]-[AEPSPS/CTP2]-[改変 *cry2Ab*]-[NOS3']) から構成される直鎖状DNA断片PV-GHBK11L を用いた。

15

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 20 GHB614 : アグロバクテリウム法  
LLCotton25 : アグロバクテリウム法  
531 : アグロバクテリウム法  
15985 : パーティクルガン法

#### 25 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

核酸が移入された細胞の選抜は以下の方法で行った。

- 30 GHB614 : グリホサートを含む培地で培養  
LLCotton25 : グルホシネートを含む培地で培養  
531 : カナマイシンを含む培地で培養  
15985 : 改変GUS蛋白質を用いた組織化学的染色法

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菌体の残存の有無

5 GHB614及びLLCotton25では、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。

10 531では、形質転換体からアグロバクテリウム菌体を除くため、形質転換体をカルベニシリン含有培地で培養した後、この抗生物質を含まない胚発芽培地中で培養することによってアグロバクテリウムの残存がないことを確認している。

15985はパーティクルガン法で作出されたため、本項目は該当しない。

15 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

20 GHB614及びLLCotton25については、再生個体をポットに移植して温室内で栽培し、組換え当代（T0世代）を得た。また、GHB614については除草剤グリホサート耐性、LLCotton25については除草剤グルホシネート耐性の各目的形質及び農業形質等により優良系統を選抜した。

25 531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選抜した。

30 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改変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選抜した。

本スタック系統は、GHB614、LLCotton25及び15985をそれぞれ同じ商業品種で戻し

交配した後、三系交雑により作出した。本スタック系統の育成の経過を図5に示した。

なお、本申請の対象は、GHB614とLLCotton25の掛け合わせにより作出したF1世代の自殖後代に、さらに15985を掛け合わせて作出した本スタック系統の当代（F1世代）及びその後代である。また、我が国におけるGHB614、LLCotton25及び15985並びに本

5

表5 我が国におけるGHB614、LLCotton25及び15985並びに本スタック系統の承認状況

	環境	食品	飼料
GHB614	2010年6月 第一種使用規程承認	2010年1月 安全性確認	2010年6月 安全性確認
LLCotton25	2006年2月 第一種使用規程承認	2004年6月 安全性確認	2006年2月 安全性確認
531	2004年11月 第一種使用規程承認	2001年3月 安全性確認	2003年3月 安全性確認
15985	2004年12月 第一種使用規程承認	2002年10月 安全性確認	2003年3月 安全性確認
本スタック系統	2010年9月 申請	2010年6月申請	2010年 届出予定

10

（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帰属する。）

15

社外秘情報につき非開示

20

図5 本スタック系統の育成の経過

25

(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 GHB614、LLCotton25、531及び15985に移入された核酸はいずれもワタの染色体上に存在することが確認されている。

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

10

【GHB614及びLLCotton25】

GHB614及びLLCotton25において、それぞれ1コピーのT-DNA領域が移入されたことがサザンブロット分析により確認されている。また、挿入遺伝子の伝達の安定性については、それぞれ複数世代におけるサザンブロット分析により確認されている。

15

【531】

サザンブロット分析、コスミドクローニング法、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*aadA*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7S 3'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242 bp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（図6, p.33）。

25 サザンブロット分析に関しては、7種類のプローブと6通りの制限酵素処理を組み合わせることにより行われた。

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。さらにこれらの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。

また、複数の自殖世代及び戻し交配世代を用いたサザンブロット分析により、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確認されたが、戻し交配世代のゲノム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かった。

5 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ため、戻し交配の過程で分離したことが考えられた。すなわち、第3挿入遺伝子は転写を終結させる因子である7S3'配列の断片であり、531における目的形質であるチョウ目害虫抵抗性には寄与していないため、生育にかかる選抜の過程で脱落したことが考えられた。

#### 10 【15985】

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15985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 (図7, p.33)。続いて改変 *cry2Ab* 遺伝子発現カセット及び改変 *uidA* 遺伝子発現カセットの完全性をそれぞれの構成要素をプローブとして用いて確認した結果、改変 *cry2Ab* 遺伝子発現カセットは完全な状態で挿入されているが、改変 *uidA* 遺伝子発現カセットは一部が欠損して挿入されていることが示唆された。この改変 *uidA* 遺伝子発現カセットの欠損した部位については、挿入遺伝子の近傍配列をゲノムウォーキングで解析した結果、P-E35Sの5'末端側の約279 bpと、約24 bpのマルチクローニングサイト由来のポリリンカーであることが確認された。

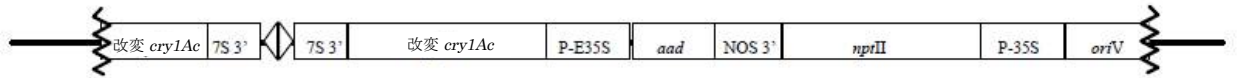
20 また、挿入遺伝子の伝達の安定性は複数世代のサザンブロット分析によって確認されている。

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

25

GHB614、LLCotton25及び15985に移入された核酸はいずれも1コピーであるため、本項目は該当しない。





5

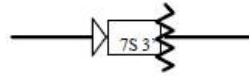
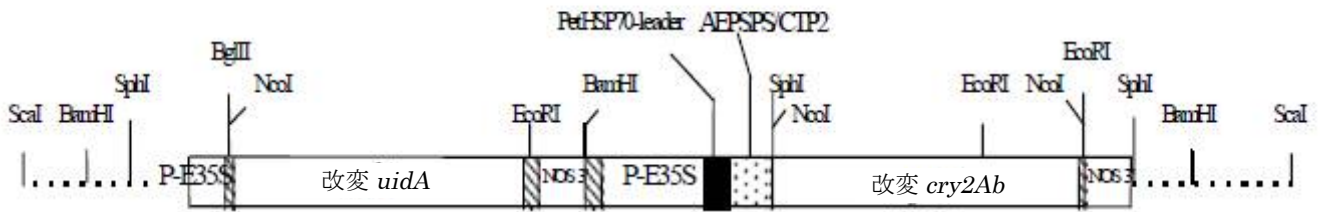


図 6 531 の挿入遺伝子地図

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

15



20

図 7 15985 の挿入遺伝子地図

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

④ (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

5 各親系統における蛋白質の発現の安定性については以下の方法により確認されている。

GHB614 : ELISA法及び除草剤グリホサート散布試験により2mEPSPS蛋白質の発現の安定性を確認。

LLCotton25 : ELISA法及び除草剤グルホシネート散布試験により改変PAT蛋白質の発現の安定性を確認。

10 531 : 簡便ELISA法により改変Cry1Ac蛋白質の発現の安定性を確認。

15985 : ウェスタンブロット分析により改変Cry2Ab蛋白質の発現の安定性を確認。

15 なお、15985については、挿入遺伝子の塩基配列を解析した結果、*uidA*遺伝子の5'末端から1,490番目の塩基が、*E. coli*に導入されている植物発現用プラスミド中の*uidA*遺伝子の塩基配列と比較してグアニン (G) からアデニン (A) に変化しており、その結果アミノ酸のN末端から377番目のアミノ酸残基がグルタミン酸 (E) からリシン (K) に変化していることが明らかとなった (この蛋白質を以下「GUSE377K」とする)。

20 このGUSE377Kに関しては、①アミノ酸の変化が認められたアミノ酸配列N末端から377番目は、植物、微生物そして哺乳動物中で発現している全てのGUS蛋白質ファミリー中で共通して保存されている活性部位に含まれるアミノ酸ではない。②このアミノ酸の変異はGUS蛋白質の活性部位及び三次元構造に影響を及ぼさない。③蛋白質データベース (SwissProt ver.30, PIR ver.41) を用いてGUSE377Kが既知アレルゲンとアミノ酸配列を共有するかどうか調べた結果、GUSE377Kは既知アレルゲンとの間に配列の相同性を持たないことが示されたことから、通常のGUS蛋白質とGUSE377Kの構造と機能は同等であると考えられた。

30 さらに今回の挿入遺伝子の解析を行った世代は米国での環境安全性評価を行ったR3世代とR1世代から派生した複数のBC2F3世代であり、解析した全ての世代において*uidA*遺伝子の5'末端から1,490番目の塩基がアデニン (A) であることが明らかとなった。よって、*uidA*遺伝子の5'末端から1,490番目のグアニン (G) からアデニン (A) への変化は、*E. coli*中での植物発現用プラスミドの増殖あるいは、パーティクルガン法による遺伝子導入の際に起こったものであり、後代へ遺伝する際に起こったものではないと結論された。

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

5 GHB614及びLLCotton25に移入された核酸はいずれも伝達性に係わる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。

10 531の作出に用いられたプラスミドPV-GHBK04は、自律増殖可能な宿主域が*E. coli*と*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物に対する伝達性は考えられない。

15 15985に用いられたプラスミドPV-GHBK11は、自律増殖可能な宿主域が*E. coli*と*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) などのグラム陰性菌に限られており、自然条件下において野生動植物に対する伝達性は考えられない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

20 GHB614及びLLCotton25は、それぞれ移入された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。

また、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。

25 本スタック系統を検出及び識別するためには、上記の方法を種子1粒ごと又は植物体1個体ごとについてそれぞれの方法で分析する必要がある。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

30 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

本スタック系統は各親系統が有する以下の特性を有する。

GHB614：2*mepsps*遺伝子が付与する除草剤グリホサート耐性。

LLCotton25：改変*bar*遺伝子が付与する除草剤グルホシネート耐性。

15985：改変*cry1Ac*遺伝子及び改変*cry2Ab*遺伝子が付与するチョウ目害虫抵抗性。

5 なお、15985は、改変*uidA*遺伝子が付与する $\beta$ -グルクロニドの加水分解能、並びに、  
*nptII*遺伝子が付与するカナマイシン耐性を有するが、これらはいずれも形質転換の際  
の選抜マーカーとして用いられた。改変*uidA*遺伝子及び*nptII*遺伝子はそれぞれ改変  
GUS蛋白質及びNPT II蛋白質をコードする。改変GUS蛋白質の基質となるグルクロニ  
ドが植物体内に存在するかどうかは明らかではないが、グルクロニドは水に易溶性の  
10 二次代謝物として液胞やアポプラストへの排泄により一次代謝から取り除かれる（文  
献41）。また、NPT II蛋白質は限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応に  
のみ関与することが報告されている（文献14；15；50）。よって、これらの蛋白質は  
いずれも宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

GHB614で発現する2mEPSPS蛋白質は、EPSPSと同様にシキミ酸経路においてホス  
15 ホエノールピルビン酸（PEP）及びシキミ酸-3-リン酸（S3P）と結合し、5-エノールピ  
ルビルシキミ酸-3-リン酸（EPSP）を生ずる反応を触媒する酵素である。EPSPSはシキ  
ミ酸経路における律速酵素ではなく、EPSPS活性が増大しても本経路の最終産物であ  
る芳香族アミノ酸は過剰に生成されないことが報告されている（文献58）。また、EPSPS  
はS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、その反応性は低  
20 く（文献27）、高い基質特異性を有している。これらのことから、2mEPSPS蛋白質は  
高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

LLCotton25で発現する改変PAT蛋白質は、グルホシネートにアセチル基を転移して  
不活性化させる酵素である。グルホシネートはL-アミノ酸に分類されるが、改変PAT  
25 蛋白質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ずる  
ことはない（文献65）。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  
のグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されないことが報告されている（文  
献70）。よって、改変PAT蛋白質はグルホシネートに高い基質特異性を有し、宿主の代  
30 謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

Bt蛋白質が酵素活性を有するとする報告はなされておらず、15985が発現する改変  
Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab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。

これらの蛋白質はそれぞれ異なる作用機作で独立して作用することから、本スタック系統においても、これらの発現蛋白質が機能的な相互作用を示し、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

実際に、本スタック系統において2mEPSPS蛋白質、改変PAT蛋白質、改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質が機能的な相互作用を示さないことを確認するため、2009年に米国にて除草剤散布試験を、また、同年にベルギーにてチョウ目害虫への給餌試験を行った。

#### 除草剤グリホサート散布試験

2009年に米国の温室にて本葉2～3葉期まで育成した本スタック系統、GHB614及び非組換えワタの苗各10個体に、標準使用量{有効成分 0.75ポンド(340g)／エーカー}、8倍、16倍及び32倍の濃度の除草剤グリホサートを散布し、散布7日後及び14日後における葉害の程度を調べた。

その結果、16倍区の散布7日後の結果において、本スタック系統とGHB614の葉害程度に統計学的有意差が認められたが、葉害スコアの平均値は本スタック系統が2.10、GHB614が2.80と差は僅少であった。また、同区の散布14日後の結果では両系統間に統計学的有意差は認められず、標準使用量区、8倍区及び32倍区においては、いずれも散布7日後、14日後共に、両系統間に差異又は統計学的有意差は認められなかった(表6, p.39)。

よって、本スタック系統における除草剤グリホサート耐性は親系統から変化していないと考えられる。

#### 除草剤グルホシネート散布試験

2009年に米国の温室にて本葉2～3葉期まで育成した本スタック系統、LLCotton25及び非組換えワタの苗に、標準使用量{有効成分 0.75ポンド(236g)／エーカー}、8倍、16倍及び32倍の濃度の除草剤グルホシネートを散布し、散布7日後及び14日後における葉害の程度を調べた。

その結果、8倍区の散布7日後の結果において、本スタック系統とLLCotton25の葉害程度に統計学的有意差が認められたが、葉害スコアの平均値は本スタック系統が1.00、

LLCotton25が0.00といずれも薬害は低かった。また、同区の散布14日後では両系統間に統計学的有意差は認められず、標準使用量区、16倍区及び32倍区においては、いずれも散布7日後、14日後共に、両系統間に差異又は統計学的有意差は認められなかった（表6, p.39）。

- 5 よって、本スタック系統における除草剤グルホシネート耐性は親系統から変化していないと考えられる。

#### チョウ目害虫への給餌試験

- 10 2009年にベルギーの温室にて栽培した本スタック系統、15985及び非組換えワタの播種後8週（初期さく）と播種後11週（中期さく）に採取したさくをそれぞれオオタバコガ（*Helicoverpa armigera*）の3齢幼虫に給餌し、給餌3日後及び6日後に致死率を調査した。その結果、初期さくを給餌した場合、給餌3日後及び6日後のいずれの結果でも本スタック系統区と15985区の致死率に統計学的有意差は認められなかった。他
- 15 方、中期さくを給餌した場合、給餌3日後の結果において本スタック系統区が34.26%、15985区が50.00%となり、系統間に統計学的有意差が認められたものの、給餌6日後には致死率は両系統区ともに90%以上を示し系統間に統計学的有意差は認められなかった。また、初期さく区と中期さく区の致死率を合わせた全致死率について本スタック系統と15985を比較した結果、給餌3日後及び6日後のいずれの結果においても系統間に統計学的有意差は認められなかった（表7, p.40）。

- 20 よって、本スタック系統におけるチョウ目害虫抵抗性は親系統から変化していないと考えられる。

表6 除草剤散布による葉害程度<sup>1</sup>の評価（平均値±標準偏差）<sup>2</sup>

除草剤グリホサート								
	標準使用量 <sup>3</sup>		8倍		16倍		32倍	
散布7日後								
本スタック系統 <sup>5</sup>	0.00	± 0.00	0.60	± 0.52	2.10	± 0.74	3.50	± 0.53
GHB614	0.00	± 0.00	0.80	± 0.42	2.80	± 0.42	3.70	± 0.48
有意差 <sup>6</sup>	—		ns		s		ns	
非組換えワタ	0.80	± 0.42	3.40	± 0.52	4.70	± 0.48	5.00	± 0.00
散布14日後								
本スタック系統	0.00	± 0.00	0.50	± 0.53	3.00	± 0.47	5.00	± 0.00
GHB614	0.00	± 0.00	1.00	± 0.00	3.50	± 0.53	5.00	± 0.00
有意差	—		ns		ns		—	
非組換えワタ	1.30	± 0.48	4.90	± 0.32	5.00	± 0.00	5.00	± 0.00
除草剤グルホシネート								
	標準使用量 <sup>4</sup>		8倍		16倍		32倍	
散布7日後								
本スタック系統	0.00	± 0.00	1.00	± 0.00	2.00	± 0.00	3.60	± 0.52
LLCotton25	0.00	± 0.00	0.00	± 0.00	2.20	± 0.63	3.70	± 0.48
有意差	—		s		ns		ns	
非組換えワタ	4.00	± 0.00	5.00	± 0.00	5.00	± 0.00	5.00	± 0.00
散布14日後								
本スタック系統	0.00	± 0.00	1.50	± 0.53	2.70	± 0.48	4.10	± 0.32
LLCotton25	0.00	± 0.00	1.10	± 0.32	3.00	± 0.67	4.10	± 0.32
有意差	—		ns		ns		ns	
非組換えワタ	4.60	± 0.52	5.00	± 0.00	5.00	± 0.00	5.00	± 0.00

<sup>1</sup>: 葉害程度の評価方法（達観評価）

0 = <10%の葉害; 子葉のクチクラに痕跡程度の青銅色化

1 = 10-20%の葉害; 子葉の中程度の青銅色化、本葉の痕跡程度の変化

5 2 = 21-40%の葉害; 子葉の中程度の青銅色化、本葉の少しの変化と巻上がり

3 = 41-60%の葉害; 子葉の中程度から激しい青銅色化と壊死、本葉の中程度の変化と巻上がり

4 = 61-80%の葉害; 子葉及び本葉における中程度から激しい変化、巻上がりと壊死

5 = 81-100%の葉害; 子葉と本葉の激しい白化、壊死、落葉

<sup>2</sup>: n=10

10 <sup>3</sup>: 有効成分 0.75 ポンド (340g) /エーカー。

<sup>4</sup>: 有効成分 0.52 ポンド (236g) /エーカー。

<sup>5</sup>: F4世代

15 <sup>6</sup>: マンホイットニーの U 検定（有意水準 5%）。ns: 本スタック系統と親系統の間に統計学的有意差は認められなかった。s: 本スタック系統と親系統の間に統計学的有意差が認められた。—: 本評価方法では分散が算出されず検定できなかった。

（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帰属する。）

表7 チョウ目害虫への給餌試験（致死率%±標準偏差）<sup>1</sup>

		本スタック系統 <sup>3</sup>	15985	有意差 <sup>4</sup>	非組換えワタ
初期さく (播種後8週)	3日後	47.22±15.46	39.81±15.30	ns	0.93±1.61
	6日後	92.59± 5.78	96.11± 4.19	ns	0.93±1.61
中期さく (播種後11週)	3日後	34.26± 4.24	50.00± 7.35	s	0.93±1.61
	6日後	96.29± 3.21	90.74± 3.20	ns	1.85±3.21
初期さく+中期さく <sup>2</sup>	3日後	40.74±12.38	44.91±12.10	ns	0.93±1.44
	6日後	94.44± 4.65	93.43± 4.45	ns	1.39±2.33

<sup>1</sup>: 調査は1試験区につき、6穴ウェルプレート6枚を1反復とし、3反復で行った。6穴ウェルプレートの各穴に*H. armigera*の3齢幼虫1匹とさくを1個入れ、給餌3日後と6日後にプレートあたりの致死率を測定した。なお、15985については十分な量の初期さくを採取できなかったため、3反復のうち1反復ではプレートあたり5匹で調査した。

<sup>2</sup>: 初期さくと中期さくにおける全致死率の平均値。

<sup>3</sup>: F4世代

<sup>4</sup>: マンホイットニーのU検定（有意水準5%）。ns: 本スタック系統と15985の間に統計学的有意差は認められなかった。s: 本スタック系統と15985の間に統計学的有意差が認められた。

（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帰属する。）

これらの生物検定の結果、除草剤耐性に関して、2mEPSPS蛋白質と改変PAT蛋白質との間、2mEPSPS蛋白質と改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質との間、並びに改変PAT蛋白質と改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質との間に、いずれも機能的な相互作用はないと考えられる。また、チョウ目害虫抵抗性に関して、改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質と2mEPSPS蛋白質及び改変PAT蛋白質との間に機能的な相互作用はないと考えられる。以上から、本スタック系統が獲得した各形質は掛け合わせにより変化していないと考えられる。

よって、本スタック系統と宿主の属する分類学上の種であるワタとの生理学的又は生態学的特性の相違については、親系統であるGHB614、LLCotton25及び15985を個別に調査した結果に基づき評価することとする。

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

GHB614：2008年に独立行政法人農業環境技術研究所において隔離ほ場試験を行った（別添資料1；社外秘情報につき非開示）。また、生育初期における低温耐性については、2007年に我が国の特定網室内において調査した（別添資料2；社外秘情報につ



き非開示)。

LLCotton25：2003年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  
(現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター)  
5 において隔離ほ場試験を行った(別添資料3; 社外秘情報につき非開示)。また、  
花粉の稔性及びサイズについては、2002年にフランスにおいて調査した(別添資料  
4; 社外秘情報につき非開示)。

15985：15985と対照の宿主ワタであるDP50B及び非組換えワタDP50を用いて九州農  
業試験場と日本モンサント社の河内研究農場(茨城県稲敷郡)の隔離ほ場で、2000  
年5月から2001年3月まで行われた(別添資料5; 社外秘情報につき非開示)。なお、  
10 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。

#### a. 形態及び生育の特性

15 形態及び生育の特性に関して、GHB614、LLCotton25及び15985とそれぞれ対照の非  
組換えワタとの間で、表8(p.43)に示す項目について調査した。

GHB614については、隔離ほ場試験に供試した種子(以下、「栽培試験用種子」とす  
る。)の発芽率において、対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた  
20 (別添資料1; 社外秘情報につき非開示)。この要因として、両系統の種子は採種地  
(GHB614: Catalonia, Spain; 非組換えワタ: Andalusia, Spain)を異にし、非組換えワタ  
の採種地では収穫前の降雨のため種子が劣化し発芽率に影響したものと考えられた。  
なお、両系統の未発芽種子は全て腐敗・死滅していたことが確認されている。

25 LLCotton25については、播種後60日目の茎長、播種後60日及び120日目の節数につ  
いて、対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められたが、その他の調査日  
の茎長及び節数にはいずれも統計学的有意差は認められなかった(別添資料3; 社外秘  
情報につき非開示)。

30 15985については、河内研究農場の隔離ほ場において行われた試験では、全ての項  
目に15985と対照の宿主ワタDP50B及び非組換えワタDP50の間で差異は認められな  
かった(別添資料5; 社外秘情報につき非開示)。

一方、九州農業試験場の隔離ほ場において行われた試験では、葉形(葉長)、地下

部重において統計学的有意差が認められたが、その他の項目について差異は認められなかった（別添資料5；社外秘情報につき非開示）。

表8 GHB614、LLCotton25及び15985における形態及び生育の特性の調査項目

項目	GHB614	LLCotton25	15985	
			河内研究農場	九州農業試験場
発芽揃い	○	○	○	○
開花期	○	○	○	○
開じょ期	○	○	○	○
収穫期	○	○	○	○
葉形	○	○	○	○
草型	○	○	○	○
花の形状	○	○	○	○
花の色	○	○	—	—
さくの形状	○	○	○	○
綿毛の色	○	○	○	○
種子の形状	○	○	—	—
種子の色	○	○	○	○
発芽率	○*	○	○	○
葉長	○	○	○	○*
葉幅	○	○	—	—
茎長	○	○*	○	○
着蕾数／有効花蕾数	○	○	○	○
節数	○	○*	—	—
発育枝数	○	—	—	—
結果枝数	○	○	○	○
総分枝数	○	○	—	—
株当たり収穫さく数	○	○	○	○
株当たり未収穫さく数	○	○	○	○
株当たり総さく数	○	○	—	—
地上部重	○	○	○	○
地下部重	○	○	○	○*
さくの長さ	○	○	—	—
さくの幅	○	○	—	—
さくの重量 <sup>1)</sup>	○	○	○	○
さくの室数	○	○	○	○
さく室当たりの種子数	—	○	—	—
さく当たりの種子数	○	○	○	○
種子 100 粒重	○	—	—	—

○：調査を行った。 —：調査を行わなかった。

\*：一部の試験区で統計学的有意差が認められた。詳細については第一 6 ② a(p.41-42)を参照。

<sup>1)</sup> GHB614及びLLCotton25については生重量、15985については乾燥重量を調査した。

5 (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帰属する。)

#### b. 生育初期における低温又は高温耐性

5 GHB614及びLLCotton25の幼植物体はいずれも、低温条件下（4～5℃）において対  
照の非組換えワタと同様に枯死した（別添資料2; 社外秘情報につき非開示; 別添資料  
3; 社外秘情報につき非開示）。

15 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って  
いないが、米国の22箇所のほ場において翌春発生する自生個体の観察が行われている。  
なお、これらのほ場試験は米国南部の代表的なワタ栽培地帯で行われており、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（文献19）。

観察の結果、収穫の際にはほ場にこぼれ落ちた種子が秋に発芽しているのが僅かなが  
ら認められたが、翌春には全て枯死していた。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。

15

#### c. 成体の越冬性又は越夏性

20 GHB614及びLLCotton25はいずれも、我が国の隔離ほ場において収穫期後も栽培を  
続けた結果、翌年2月の観察時には枯死していることが確認された（別添資料1; 社外  
秘情報につき非開示）。

また、15985の隔離ほ場試験終了時（九州農業試験場は収穫10月、河内研究農場は  
収穫11月、鋤込み11月）には、部分的に枯死が始まっていることを確認している。

#### d. 花粉の稔性及びサイズ

25

GHB614及びLLCotton25の花粉の稔性及びサイズを非組換えワタと比較した結果、  
いずれも統計学的有意差や相違は認められなかった（別添資料1; 社外秘情報につき非  
開示; 別添資料4; 社外秘情報につき非開示）。

30 15985において花粉の稔性及びサイズの調査は行わなかった。しかし、次項eで述べ  
るとおり、種子の生産量に関して調査した1株当たりのさく数、さくの室数及びさく  
当たりの種子数について、いずれも対照品種との間に統計学的有意差は認められな  
かったことから、15985の花粉の特性は対照品種と比較して顕著に相違があるとは考え  
難い。

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

5 種子の生産量に関して、GHB614及びLLCotton25はいずれも、株当たりの収穫さく数、総さく数及びさく当たりの種子数について対照品種との間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料1; 社外秘情報につき非開示; 別添資料3; 社外秘情報につき非開示)。

10 また、15985については、1株当たりのさく数、さくの室数、さく当たりの種子数について15985と宿主ワタDP50B及び非組換えワタDP50との間で差異を調査しているが、いずれも統計学的有意差は認められなかった(別添資料5; 社外秘情報につき非開示)。

15 脱粒性に関して、GHB614については、隔離ほ場試験においてGHB614及び対照品種の脱粒について観察した結果、両系統とも脱粒は認められなかった(別添資料1; 社外秘情報につき非開示)。

LLCotton25については脱粒性の調査は行わなかったが、LLCotton25のさくの形態及び開じょ特性は非組換えワタと相違ないことが確認されている(別添資料3; 社外秘情報につき非開示)。

20 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。

25 休眠性及び発芽率に関して、GHB614については、隔離ほ場で収穫した種子を用いて、収穫直後及び3ヶ月間室温条件下で保管後にそれぞれ播種し、発芽率を調査した。その結果、いずれも統計学的有意差は認められず、3ヶ月間保管後の種子ではGHB614、非組換えワタ共に96%以上の発芽率を示した(別添資料1; 社外秘情報につき非開示)。

LLCotton25については、収穫後約1ヶ月間室温で保管した種子の発芽率を非組換えワタと比較した結果、いずれも100%を示した(別添資料3; 社外秘情報につき非開示)。

30 15985の収穫種子の発芽率については、1999年に米国のテキサス州(TX)、サウスカロライナ州(SC)及びルイジアナ州(LA)の3ヶ所のほ場試験において収穫された15985、宿主ワタである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°C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、いくつかの温度条件下では、15985と対照の宿主ワタであるDP50Bとの間で統計学的有意差( $p < 0.05$ )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（別添資料6; 社外秘情報につき非開示）。一方、それぞれの温度条件下で、15985、宿主ワタ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（別添資料6; 社外秘情報につき非開示）。また、発芽率については、aの形態及び生育の特性で示したように、15985と対照の宿主ワタDP50B及び非組換えワタDP50との間で差異は認められなかった（別添資料5; 社外秘情報につき非開示）。

#### f. 交雑率

10

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、GHB614及び15985について交雑性試験は行わなかった。なお、LLCotton25については、参考までに、隔離ほ場試験においてLLCotton25と1mの隔離距離で栽培された非組換えワタ由来の種子それぞれ20粒及び180粒を発芽させて除草剤グルホシネートを散布した結果、LLCotton25種子由来の実生は全て耐性を示したのに対し、非組換えワタ種子由来の実生は全て枯死し、交雑が生じた可能性は認められなかった（別添資料3; 社外秘情報につき非開示）。

15

#### g. 有害物質の産生性

20

GHB614、LLCotton25及び15985について、それぞれ後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った。その結果、いずれも後作試験及び鋤込み試験における検定植物の発芽及び生育に関する調査項目、並びに土壤微生物数について、対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料1; 社外秘情報につき非開示; 別添資料3; 社外秘情報につき非開示; 別添資料5; 社外秘情報につき非開示）。

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 食用及び飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

#### (2) 使用等の方法

10 \_\_\_\_\_

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

15 \_\_\_\_\_

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

20 緊急措置計画書を参照。

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

25 \_\_\_\_\_

#### (6) 国外における使用等に関する情報

30 GHB614、LLCotton25及び15985の諸外国における申請・承認状況を表9 (p.48) に示した。

また、我が国におけるGHB614、LLCotton25、15985及び本スタック系統の申請・承認状況は、表5 (p.30) に示した。

表9 GHB614、LLCotton25及び15984の諸外国における承認状況

国	規制機関	承認年月		
		GHB614	LLCotton25	15985
米国	米国農務省 (USDA)	2009年5月	2002年3月	2002年11月
	米国食品医薬品局 (FDA)	2008年4月	2003年4月	2002年7月
カナダ	カナダ厚生省 (Health Canada)	2008年4月	2004年8月	2003年6月
	カナダ食品検査局 (CFIA)	2008年4月	2004年9月	2003年6月
オーストラリア、ニュージーランド	オーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ)	2009年9月	2006年10月	2002年9
	オーストラリア遺伝子技術規制局 (OGTR)	—	2006年8月	2002年10月

(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帰属する。)



## 第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統は、GHB614、LLCotton25及び15985を掛け合わせて作出したものであり、それぞれの特性を併せ持つ。

- 5 GHB614由来の2mEPSPS蛋白質及びLLCotton25由来の改変PAT蛋白質はいずれも高い基質特異性を有する。また、Bt蛋白質である15985由来の改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質が酵素活性を示すことはないと考えられる。よって、いずれも宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。また、これらの発現蛋白質はそれぞれ異なる作用機作で独立して作用していることから、機能的な相互作用を示す可能性
- 10 は低いと考えられる。実際に生物検定を行い、本スタック系統における除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性、並びにチョウ目害虫抵抗性の程度について、各性質の由来となる親系統と比較した。その結果、除草剤グリホサート散布試験では、16倍区の散布3日後の結果において、本スタック系統とGHB614の葉害スコアの平均値に統計学的有意差が認められたものの、その差は僅少であり、その他の試験区では差異又は統計学的有意差は認められなかった (表6, p.39)。また、除草剤グルホシネート散布
- 15 試験では、8倍区の散布3日後の結果において、本スタック系統とLLCotton25の葉害スコアの平均値に統計学的有意差が認められたものの、いずれも葉害は低く、その他の試験区では差異又は統計学的有意差は認められなかった (表6, p.39)。さらに、チョウ目害虫への給餌試験では、中期さくの給餌3日後の結果において本スタック系統区と
- 20 15985区の致死率に統計学的有意差が認められたものの、給餌6日後の結果ではいずれも90%以上の致死率を示し系統間に統計学的有意差は認められず、その他の試験区においても系統間に統計学的有意差は認められなかった (表7, p.40)。よって、本スタック系統において、各親系統由来の形質はいずれも変化しておらず、これらの発現蛋白質は機能的な相互作用を示していないと考えられた。
- 25 したがって、親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質はないと考えられ、本スタック系統の生物多様性影響の評価は、GHB614、LLCotton25及び15985を個別に調査した結果に基づき行った。

- 我が国において本スタック系統の商業栽培は行わないため、生物多様性影響が生ず
- 30 る可能性は、運搬中にこぼれ落ちた種子が生育し、自生する場合に限られる。

### 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

ワタは我が国において長期にわたり輸入され、加工用として使用されてきた経験があるが、自然環境下におけるワタの自生は報告されていない。

- 5 GHB614、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調査を行った。その結果、GHB614では栽培試験用種子の発芽率について、LLCotton25では茎長及び節数の一部の試験区においてそれぞれ非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた。15985では、2ヶ所  
10 の試験地のうちの1ヶ所で、葉長について組換え母本ワタDP50Bとの間に、また、地下部重量について組換え母本ワタDP50B及び非組換えワタとの間に、それぞれ統計学的有意差が認められた。しかし、いずれの系統もそれ以外の諸形質においては非組換えワタや組換え母本ワタとの間に統計学的有意差又は相違は認められておらず、これらの差異のみで競合における優位性が高まる可能性は低いと考えられた。
- 15 以上から、本スタック系統においても、これらの諸形質に関して競合における優位性が高まることはないと考えられる。

- 本スタック系統は除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性を有するが、自然環境下においてこれらの除草剤が散布されるような状況は想定し難いことから、これら  
20 の形質により競合における優位性が高まることはないと考えられた。また、チョウ目害虫抵抗性については、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であっても、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。よって、本スタック系統においても、これらの付与された性質により競合における優  
25 位性が高まることはないと考えられる。

以上から、本スタック系統において、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。

- 30 (2) 影響の具体的内容の評価
-

### (3) 影響の生じやすさの評価

#### 5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本スタック系統において、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。

#### 10 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

15 本スタック系統の種子には、非組換えワタと同様に、非反芻動物に対して毒性を引き起こすゴッシポール及び飽和脂肪酸の脱飽和を阻害して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、野生の哺乳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。

20 本スタック系統が有する2mEPSPS蛋白質、改変PAT蛋白質、改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質はいずれも既知のアレルゲンとの相同性は認められていない。

25 2mEPSPS 蛋白質と機能的に同一である EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、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は過剰に生成されないことが報告されている（文献 58）。また、EPSPS 蛋白質は PEP 及び S3P 以外に S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS 蛋白質とシキミ酸の反応性は低く（文献 27）、高い基質特異性を有している。以上から、2mEPSPS 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

30 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ている（文献 65；70）。よって、改変PAT蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

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、改変Cry1Ac蛋白質及び改

変Cry2Ab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から、これらの蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

5 改変GUS蛋白質の基質となるグルクロニドが植物体内に存在するかどうかは明らかではないが、グルクロニドは水に易溶性の二次代謝物として液胞やアポプラストへの排泄により一次代謝から取り除かれる（文献41）。また、NPT II 蛋白質は限られたアミノグリコシド系抗生物質のリン酸化反応にのみ関与することが報告されている（文献14；15；50）。よって、これらの蛋白質はいずれも宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

10 また、GHB614、LLCotton25及び15985について、後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を行った結果、いずれの系統においても非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められず、新たに有害物質の産生性を獲得していないと考えられた（別添資料1；社外秘情報につき非開示；別添資料3；社外秘情報につき非開示；別添資料5；社外秘情報につき非開示）。

15 以上のことから、本スタック系統が新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

20 また、本スタック系統は改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質を発現するため、チョウ目昆虫が本スタック系統の植物体又は花粉を摂食した場合、生存に影響を及ぼす可能性が考えられた。我が国では本スタック系統の商業栽培は行わないため、このような影響が生ずるのは加工用として輸入された種子が輸送中にこぼれ落ちて生育した場合に限られる。しかしながら、これまでに輸送中にこぼれ落ちたワタ種子が我が国の自然環境下で生育或いは自生化したとする報告はなされていない。また、第二、1で述べたとおり、本スタック系統は自然環境下での生育に有利な形質は獲得していないことから、これまで輸入されてきた既存のワタと同様に、こぼれ落ちた種子が生育或いは自生化し、我が国に分布するチョウ目昆虫が摂食する可能性は極めて低いと  
25 考えられる。

以上から、本スタック系統において、有害物質の産生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。

30

## (2) 影響の具体的内容の評価

(3) 影響の生じやすさの評価

---

5 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本スタック系統において、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。

10 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、ワタ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かった。

(2) 影響の具体的内容の評価

---

20

(3) 影響の生じやすさの評価

---

25 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上から、本スタック系統において、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。

30 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

我が国において本スタック系統の商業栽培は行わないため、生物多様性影響が生ずる可能性は、運搬中にこぼれ落ちた種子が生育し、自生する場合に限られる。我が国は長期にわたりワタを輸入してきた実績があるが、これまでに運搬の途中でこぼれ落ちた種子が自然環境下において自生したとする報告はない。

本スタック系統は、GHB614、LLCotton25及び15985を掛け合わせて作出したものであり、それぞれの特性を併せ持つ。

10 GHB614由来の2mEPSPS蛋白質及びLLCotton25由来の改変PAT蛋白質はいずれも高い基質特異性を有する。また、Bt蛋白質である15985由来の改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質は酵素活性を示さないと考えられる。よって、いずれの蛋白質も宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。また、それぞれ異なる作用機作で独立して作用することから、本スタック系統においてこれらの発現蛋白質が機能的な相互作用を示す可能性は低いと考えられた。また、生物検定の結果から、本スタック系統における除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性、並びにチョウ目害虫抵抗性の程度は、各形質の由来となる親系統から変化しておらず、本スタック系統においてこれらの発現蛋白質は機能的な相互作用を示していないと考えられた。

したがって、本スタック系統の生物多様性影響の評価は、GHB614、LLCotton25及び15985を個別に調査した結果に基づき行った。

競合における優位性に関して、本スタック系統の親系統であるGHB614、LLCotton25及び15985について諸形質の調査を行った結果、いずれも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。

25 また、本スタック系統は除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性並びにチョウ目害虫抵抗性を有するが、これらの形質により、我が国の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難い。

以上から、本スタック系統並びに本スタック系統から派生する後代系統において、競合における優位性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

30

有害物質の産生性に関して、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。

2mEPSPS蛋白質、改変PAT蛋白質、改変Cry1Ac蛋白質及び改変Cry2Ab蛋白質はいずれ

れも、既知アレルゲンとの相同性は認められていない。また、2mEPSPS蛋白質、改変PAT蛋白質、改変Cry1Ac蛋白質、改変Cry2Ab蛋白質、改変GUS蛋白質及びNPT II蛋白質はいずれもその性質から宿主の代謝系に影響を及ぼして新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。実際に、GHB614、LLCotton25及び15985における後作  
5 試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験の結果、いずれの系統についても、新たに有害物質の産生性はないと考えられた。

よって、本スタック系統が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、本スタック系統並びに本スタック系統から派生する後代系統において、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

10

我が国には、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、本スタック系統並びに本スタック系統から派生する後代系統において、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された。

15

以上を総合的に評価し、本スタック系統並びに本スタック系統から派生する後代系統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

5

別添資料の内容

10

別添資料 1 GHB614 の隔離ほ場試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料 2 GHB614 の網室試験報告書

社外秘情報につき非開示

15 別添資料 3 LLCotton25 の隔離ほ場試験報告書

社外秘情報につき非開示

別添資料 4 Reproductive biology data. Glufosinate-tolerant Cotton Event LL25.

社外秘情報につき非開示

20

別添資料5 社外秘情報につき非開示

別添資料6 社外秘情報につき非開示

25



緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成22年9月7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 ギャビン マーチャント  
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リホサート及びグルホシネート耐性  
並びにチョウ目害虫抵抗性ワタ（2mepsps, 改変bar, 改変cry1Ac, 改変cry2Ab, *Gossypium*  
*hirsutum* L.）（GHB614×LLCotton25×15985, OECD UI: BCS-GH002-5×ACS-GH001-3  
×MON-15985-7）（以下、「本スタック系統」とする。）並びにGHB614, LLCotton25  
15 及び15985のうち2系統の組合せからなるスタック系統ワタの第一種使用等において、生  
物多様性影響が生ずるおそれがあると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。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は、本スタック系統に関し  
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

20

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。

平成22年9月7日現在

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

25 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は本スタック系統穀粒の我が国への輸入業者、我が国において本スタック系統穀粒及び本スタック系統の親系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統の穀粒を配給した業者、輸入したこれらの穀粒の量及び時期を可能な限り特定する。

- 5 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

10 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き、適切に、弊社は上記2で明らかにした本スタック系統穀粒及び本スタック系統の親系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統の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系統穀粒及び本スタック系統の親系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統の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

20 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き、適切に、弊社は上記2及び3において示した個人または団体に対し、本スタック系統及び本スタック系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統を不活性化する措置または本スタック系統及び本スタック系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統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本スタック系統及び本スタック系統のうち2  
25 系統の組合せからなるスタック系統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

30 科学的根拠に基づき、本スタック系統及び本スタック系統の親系統のうち2系統の組合せからなるスタック系統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。