除草剤ジカンバ、グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ (改変*dmo, bar,* 改変 *cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701 × MON88913, OECD UI: MON-887Ø1-3 × MON-88913-8) 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 3
第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報 3
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況 3
① 和名、英名及び学名 3
② 宿主の品種名又は系統名 3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域 3
(2) 使用等の歴史及び現状 4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史 4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途 4
(3) 生理的及び生態学的特性 5
イ 基本的特性 5
ロ 生息又は生育可能な環境の条件 5
ハ 捕食性又は寄生性 6
ニ 繁殖又は増殖の様式 6
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命 6
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 6
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じる特性を有する場合はその程度 6
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命 6
ホ 病原性 7
ヘ 有害物質の産生性 7
ト その他の情報 7
2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 7
(1) 供与核酸に関する情報 8
イ 構成及び構成要素の由来 8
ロ 構成要素の機能 8
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 8
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 (食品としてのアレルギー性を除く。) 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.....15
(2) ベクターに関する情報.....16
イ 名称及び由来.....16
ロ 特性.....17
① ベクターの塩基数及び塩基配列.....17
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能.....17
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.....17
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成.....17
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法.....20
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過.....20
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法.....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.....20
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
(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.....23
① 移入された核酸の複製物が存在する場所.....23
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.....23
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.....23
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.....23
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.....24
(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.....24
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....24
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.....24
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.....25
a 形態及び生育の特性 26
b 生育初期における低温耐性 26
c 成体の越冬性 26
d 花粉の稔性及びサイズ 26
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 26
f 交雑率 26
g 有害物質の産生性 26
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 27
(1) 使用等の内容 27
(2) 使用等の方法 27
(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
(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
(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 29
(3) 影響の生じやすさの評価 29
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 29
2 有害物質の産生性 29
(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 29
(3) 影響の生じやすさの評価 29
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 29
3 交雑性 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 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
第三 生物多様性影響の総合的評価 31

参考文献 32
緊 急 措 置 計 画 書 39
資料一覧 41

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成25年11月28日

農林水産大臣　　林 芳正 殿
環境大臣　　石原 伸晃 殿

氏名　日本モンサント株式会社
申請者　代表取締役社長　山根 精一郎　　印
住所　東京都中央区銀座四丁目10番10号

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

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤ジカンバ、グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ (改変*dmo, bar*, 改変*cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701 × MON88913, OECD UI: MON-887Ø1-3 × MON-88913-8)
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	ー

生物多様性影響評価書

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

①　和名、英名及び学名

和名：ワタ
英名：cotton 又は upland cotton
学名：*Gossypium hirsutum* L.

②　宿主の品種名又は系統名

親系統である MON88701 及び MON88913 の作出に用いた品種名は、それぞれ Coker130 及び Coker312 である。

③　国内及び国外の自然環境における自生地域

ワタはアオイ科 *Gossypium* 属に属する。*Gossypium* 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、Fryxell は野生の 2 倍体種を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 群にさらに分けている (Fryxell, 1984)。また、野生の 2 倍体種に加え、新大陸に自生する野生の 4 倍体種には、*G. tomentosum* (ハワイ)、*G. mustelinium* (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 (Fryxell, 1984; Lee, 1984)。*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 (Lee, 1984)。

なお、わが国において *G. hirsutum* 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

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

Gossypium 属のうち栽培種は 4 種に分けられ、旧大陸の「アジア綿」と総称される 2 倍体種 (2n=26) の *G. herbaceum* と *G. arboreum*、及び新大陸の複 2 倍体種 (2n=52) で「陸地綿、アメリカ綿、メキシコ綿」として知られる *G. hirsutum*、「ピマ綿、超長繊維 (ELS) 綿、海島綿、エジプト綿、クレオール綿、インド綿」として知られる *G. barbadense* があり、個々に栽培品種化されてきた (原田, 1981; Lee, 1984; Brubaker et al., 1999; OGTR, 2008)。

日本で古くから栽培されているワタはアジア綿の *G. arboreum* である。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至ったが、その後、外綿の輸入に押されて次第に衰微した (原田, 1981)。現在では、ワタの日本国内における商業栽培はほとんど行われておらず、主に観賞用などの目的で栽培されているのみである。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

G. herbaceum はアフリカ及びアジアの乾燥地帯で、また、同じく 2 倍体種の *G. arboreum* は主にインドで栽培されている。

G. hirsutum 及び *G. barbadense* は主要な栽培ワタ種であり、世界的なワタの主要栽培地域であるアメリカ、ヨーロッパ、中国、アフリカ及びオーストラリアで栽培されている (Lee, 1984; Jenkins, 2003)。

米国農務省の統計情報に基づくと、2011/12 年の全世界におけるワタの栽培面積は 3,572 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 1,220 万 ha、中国が 540 万 ha、米国が 383 万 ha、パキスタンが 300 万 ha となっている (USDA-FAS, 2013)。

2012 年のわが国における搾油用種子 (綿実) の輸入量は 11 万 5,740 トンであり、そのうち約 94%がオーストラリア、約 4.9%が米国、約 0.4%がギリシャから輸入されている (財務省, 2013)。播種用種子は中国とポーランドから輸入されており、輸入量は 1 トン未満である (財務省, 2013)。

摘採した実綿には種子が付いており、これを繰綿機にかけて分離した綿毛 (lint) を綿花又は原綿と呼んでいる。綿花は綿糸・綿織物などの製綿用、又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 (綿実) で、その表面に付く平均 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 (綿実) 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種子油(綿実油)が得られる。種子 (綿実) 1t から約 130kg の種子油 (綿実油) が得られ、食用油のほかマーガリンや石鹸の原料などとして用いられる。搾油後の種子粕 (綿実粕) は精製して主に飼料や肥料として用いられる(原田, 1981)。

(3) 生理的及び生態学的特性

ィ　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 1.0~2.0m に伸び、発育枝と結果枝を生ずる (OECD, 2008)。葉は主茎又は枝の軸にらせん状に交互につき、各結果枝は 6~8 個の花芽を付ける (OECD, 2008)。

なお、栽培条件下では一年生農作物として栽培され、草丈に関しては 1~1.5m 程度に抑制される (OECD, 2008)。

ロ　生息又は生育可能な環境の条件

ワタの生育に最適な気温は 30~35℃である (OECD, 2008)。ワタは通常年降水量 1,000~1,500 mm ぐらいのところで作られるが、灌漑ができれば、降雨は少ないほうがよい (原田, 1981)。着蕾期及び開花期に多雨、日照不足、干ばつなどが起こると落蕾や落さくが増加する (平野, 1987)。ワタの栽培は主にオーストラリアやアルゼンチン北部などの北緯 37 度から南緯 32 度の間で行われているが、中央アジアや中国など北緯 43~45 度に至る地域でも栽培されている (OECD, 2008)。ワタは様々な土壌で栽培されているが、生育に最適なのは水はけ、水もちが良く、有機物を多く含む土壌である (OECD, 2008)。

ハ　捕食性又は寄生性

―

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

ワタのさくは 3~5 室で構成されている(OECD, 2008)。ワタの完熟したさくは、さく皮が裂けて開じょするが、種子は綿毛に覆われているために脱粒性は低い(Llewellyn and Fitt, 1996)。また、種子の休眠期間は 2~3 ヶ月である(OECD, 2008)。

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

ワタは塊茎や地下茎などによる栄養繁殖を行わず、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。

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じる特性を有する場合はその程度

ワタの受粉様式に関しては、基本的には自家受粉である (Niles and Feaster, 1984)。虫媒による他家受粉も可能であることが知られており、その際の他家受精率は 5~30%であったと報告されている (Kerkhoven and Mutsaers, 2003)。
なお、わが国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

Gossypium 属の花粉の生産量は 1 花当たりおよそ 4 万 5,000 粒である (McGregor, 1976)。花粉は直径 101 μm、刺状突起の長さは 12.1 μm、刺状突起の密度は 1 μm^2 当たり 8.3×10^{-3} 本である (Kakani et al., 1999)。ワタは、基本的には自家受粉であるが、虫媒 (例 : ハチ) による他家受粉も可能であることが知られている。ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから風により飛散する可能性は少ない (OECD, 2008)。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 0.03%以下まで減少していた (Llewellyn and Fitt, 1996)。また、*G. hirsutum* の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

結果､ハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約 45m~60m 離れた花畑で約 1.6%の花からワタの花粉が検出された (McGregor, 1976)。ワタの花粉の寿命は、オーストラリアでの試験において 32 時間で 95%から 10%に低下したことが報告されている (Richards et al., 2005)。

ホ　病原性

―

ヘ　有害物質の産生性

ワタには、ゴシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、種子を含むあらゆる植物組織の分泌腺に存在する (OGTR, 2008)。ゴシポールは哺乳動物の腹腔内臓器や肺に炎症を起こし、実験動物においては呼吸困難、麻痺を起こす有害物質として知られているが (生化学辞典, 1990)、搾油過程の加熱により無毒化される (Harris, 1981; NCPA, 1993)。

また、ワタにはジヒドロステルクリン酸、ステルクリン酸、マルバリン酸などのシクロプロペン脂肪酸 (CPFA) が含まれており、種子の総脂質中のおよそ 0.5~1.0%を占める (OECD, 2008)。本物質は鶏において卵黄の変色及びふ化率の低下などの有害な影響を及ぼすとされているが、搾油工程の脱臭過程において著しく減少する (OECD, 2004; OECD, 2008)。

ト　その他の情報

わ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

除草剤ジカンバ、グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ (改変 *dmo*, *bar*, 改変 *cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88701 × MON88913, OECD UI: MON-887Ø1-3 × MON-88913-8) (以下、「本スタック系統ワタ」という。) は、以下の 2 つの遺伝子組換えワタを従来の交雑育種法を用いて育成したスタック系統である。

a) 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変 *dmo, bar, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3) (以下、「MON88701」という。)

b) 除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI: MON-88913-8) (以下、「MON88913」という。)

(1) 供与核酸に関する情報

ィ 構成及び構成要素の由来

MON88701 及び MON88913 の作出に用いられた供与核酸の構成と構成要素の由来は、表 1~表 2 (p9~13) に示したとおりである。

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

MON88701 及び MON88913 の作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は、それぞれ表 1~表 2 (p9~13) に示した。

表 1　MON88701 の作出に用いられた PV-GHHT6997 の各構成要素の由来及び機能[1]

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA		
B[注1]-Right Border Region	1-331	*Agrobacterium tumefaciens* 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	332-433	DNA クローニングの際に利用された配列。
P[注2]-*PClSV*	434-866	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PClSV) の全ゲノムの転写によって生じる完全長転写物 (Full-Length Transcript, FLt) の転写を誘導するプロモーターで、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。
Intervening Sequence	867-872	DNA クローニングの際に利用された配列。
L[注3]-*TEV*	873-1,004	Tobacco Etch virus (TEV) 由来の 5'末端非翻訳領域 (Niepel and Gallie, 1999)。遺伝子発現の制御に関与する。
Intervening Sequence	1,005-1,005	DNA クローニングの際に利用された配列。
TS[注4]-*CTP2*	1,006-1,233	*Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 遺伝子 (*ShkG)* の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 MON87701 DMO 蛋白質を葉緑体へと輸送する。
CS[注5]-改変*dmo*	1,234-2,256	除草剤ジカンバ耐性を付与する *Stenotrophomonas maltophilia* 由来のジカンバモノオキシゲナーゼ (改変 MON88701 DMO 蛋白質) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。
Intervening Sequence	2,257-2,310	DNA クローニングの際に利用された配列。
T[注6]-*E6*	2,311-2,625	*Gossypium barbadense* (ピマワタ) の初期繊維形成に関わる繊維蛋白質をコードする *E6* 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域 (John, 1996)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。
Intervening Sequence	2,626-2,637	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-*e35S*	2,638-3,249	2 重エンハンサーを持つ (Kay et al., 1987)、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) のプロモーター (Odell et al., 1985)。植物細胞で恒常的に転写を誘導する。

[1]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 1　MON88701の作出に用いられたPV-GHHT6997の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA		
Intervening Sequence	3,250-3,252	DNA クローニングの際に利用された配列。
L-*Hsp70*	3,253-3,348	*Petunia hybrida* (ペチュニア) の熱ショック蛋白質 70 (HSP70) をコードする *hsp70* 遺伝子に由来する 5' 末端非翻訳領域 (Winter et al., 1988; Rensing and Maier, 1994)。遺伝子発現の制御に関与する。
Intervening Sequence	3,349-3,354	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-*bar*	3,355-3,906	*Streptomyces hygroscopicus*に由来するホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ (PAT蛋白質) をコードする遺伝子 (Thompson et al., 1987) を含む配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。
Intervening Sequence	3,907-3,911	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-*nos*	3,912-4,164	*A. tumefaciens* T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子 (*nos*) の 3'末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	4,165-4,183	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Left Border Region	4,184-4,625	*A. tumefaciens* 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
プラスミド外側骨格配列 (MON88701 には存在しない)		
Intervening Sequence	4,626-4,711	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR[注7]-*ori V*	4,712-5,108	広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域。*Agrobacterium* 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
Intervening Sequence	5,109-6,616	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS-*rop*	6,617-6,808	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー(Repressor of primer (rop))のコード配列で*E. coli* においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	6,809-7,235	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR-*ori-pBR322*	7,236-7,824	pBR322 由来の複製開始領域。*E. coli* 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。

表 1　MON88701 の作出に用いられた PV-GHHT6997 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
プラスミド外側骨格配列(MON88701 には存在しない)		
Intervening Sequence	7,825-8,354	DNA クローニングの際に利用された配列。
aadA	8,355-9,243	トランスポゾン Tn7 由来の 3″ (9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター及びコード配列並びに 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。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。
Intervening Sequence	9,244-9,379	DNA クローニングの際に利用された配列。

注[1]B - Border (境界配列)

注[2]P - Promoter (プロモーター)

注[3]L - Leader (リーダー配列)

注[4]TS - Targeting Sequence (ターゲティング配列)

注[5]CS - Coding Sequence (コード配列)

注[6]T - Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

注[7]OR - Origin of Replication (複製開始領域)

表 2　MON88913の作出に用いられたPV-GHGT35の各構成要素の由来及び機能[2]

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
P -*FMV/Tsf1**により制御される改変*cp4 epsps*遺伝子発現カセット		
P-*FMV/Tsf1**	1,040	シロイヌナズナ*Tsf1*プロモーターに Figwort Mosaic Virus (FMV) 35Sプロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター (Richins et al., 1987; Axelos et al., 1989)。目的遺伝子の生殖器官及び栄養器官での恒常的発現に関与する。なお、FMVが属する*Caulimovirus*属のウイルスが*Gossypium*属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた。
L-*Tsf1**	46	翻訳伸長因子EF-1 alphaをコードするシロイヌナズナ*Tsf1*遺伝子のリーダー配列 (exon 1) (Axelos et al., 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
I-*Tsf1**	622	翻訳伸長因子EF-1 alphaをコードするシロイヌナズナ*Tsf1*遺伝子のイントロン配列 (Axelos et al., 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
TS-*ctp2*	228	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へCP4 EPSPS蛋白質を輸送するシロイヌナズナEPSPS由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987)。
CR-改変*cp4 epsps*	1,368	*Agrobacterium* 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 (Padgette et al., 1996; Barry et al., 1997)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関してはN末端から2番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。
T-*E9*	643	エンドウのribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase の小サブユニットをコードする*rbc*S遺伝子ファミリーの1つである*E9*遺伝子の3'末端非翻訳領域。mRNAの転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
P-*35S/ACT8*により制御される改変型*cp4 epsps*遺伝子発現カセット		
P-*35S/ACT8*	1,175	シロイヌナズナ*ACT8*プロモーターにカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) *35S*プロモーターのエンハンサー配列を結合させたキメラプロモーター (Kay et al., 1987; An et al., 1996)。目的遺伝子の栄養器官での恒常的発現に関与する。なお、CaMVが属する*Caulimovirus*属のウイルスが*Gossypium*属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた。
L-*ACT8*	141	シロイヌナズナの*ACT8*遺伝子のリーダー配列。目的遺伝子の発現を高める (An et al., 1996)。
I-*ACT8*	472	シロイヌナズナの*ACT8*遺伝子のイントロンと、その近傍のエクソン配列 (An et al., 1996)。目的遺伝子の発現を高める。

[2]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 2　MON88913の作出に用いられたPV-GHGT35の各構成要素の由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	由来及び機能
TS-*ctp2*	228	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へCP4EPSPS蛋白質を輸送するシロイヌナズナEPSPS由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列 (Klee et al., 1987)。
CR-改変*cp4 epsps*	1,368	*Agrobacterium* 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 (Padgette et al., 1996; Barry et al., 1997)。植物中での発現量を高めるため、CP4 EPSPS蛋白質の機能活性を変更することのないように塩基配列に改変を加えたもので、アミノ酸配列に関してはN末端から2番目のセリンがロイシンに改変されたのみである。
T-*E9*	643	エンドウのribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase の小サブユニットをコードする*rbc*S遺伝子ファミリーの1つである*E9*遺伝子の3'末端非翻訳領域。mRNAの転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Coruzzi et al., 1984)。
T-DNAの外骨格構成 (MON88913には存在しない)		
B-Left Border (左側境界配列)	442	TiプラスミドpTiA6に由来する左境界配列を含むDNA断片。左側境界配列は、T-DNAが*A. tumefaciens*から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である (Barker et al., 1983)。
OR-*ori V*	638	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、*A. tumefaciens*においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。
CR-*rop*	473	*E. coli*中でのプラスミドのコピー数の維持のためにプライマー蛋白質を抑制するコーディング配列 (Giza and Huang, 1989)。
OR-*ori-pBR322*	629	pBR322から単離された複製開始領域であり、*E.coli*においてベクターに自律増殖能を付与する (Sutcliffe, 1979)。
CR-*aadA*	789	トランスポゾンTn7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 (Fling et al., 1985)。
B-Right Border (右側境界配列)	331	TiプラスミドpTiT37に由来する、ノパリン型T-DNAの右境界配列を含むDNA断片。右側境界配列は、T-DNAが*A. tumefaciens*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 (Depicker et al., 1982)。

***** *Tsf1* は、近年 *EF-1α* として広く知られている。

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 (食品としてのアレルギー性を除く。) 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

―除草剤耐性蛋白質―

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

改変 MON88701 DMO 蛋白質は、除草剤ジカンバ耐性を付与する。DMO 蛋白質はジカンバから除草活性のない DCSA (3, 6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒド (HCHO) への脱メチル反応を触媒する酵素で (Chakraborty et al., 2005)、この働きにより植物にジカンバ耐性を付与する。実際に、改変 *dmo* 遺伝子の導入によりダイズ、トマト、シロイヌナズナ及びタバコに対し除草剤ジカンバ耐性が付与されたことが報告されている (Behrens et al., 2007)。

なお、MON88701 由来の改変 MON88701 DMO 蛋白質は、野生型 DMO 蛋白質と比較して、アミノ酸配列の N 末端配列から 1 番目のメチオニンの直後にロイシンが挿入されており、また N 末端側に CTP2 由来の 9 つのアミノ酸が結合している。

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネート耐性を付与する。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素の働きでアセチル化されると、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートとなる。PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、除草剤グリホサート耐性を付与する。植物は除草剤グリホサートを処理すると 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (酵素番号: E.C.2.5.1.19、以下、「EPSPS 蛋白質」という。) 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。改変 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。

なお、MON88913 由来の改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、アミノ酸配列の N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに置換されている。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 MON88701 DMO 蛋白質】

一般的に酵素の基質特異性は、酵素触媒反応に必要な構造の有無によって定まる。DMO蛋白質のジカンバへの特異性は触媒部位で起こる特定の相互作用によるものである (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。DMO蛋白質によるジカンバの代謝の結晶構造解析の結果によると、ジカンバのカルボキシル基と塩素原子がDMO蛋白質の触媒部位に位置するアミノ酸と作用する (Dumitru et al., 2009)。カルボキシル基はDMO蛋白質の触媒部位において、アミノ酸と6つの水素結合を形成している。この水素結合は、酵素と基質の結合に重要な役割を果たしている。一方、塩素原子は基質を正しい位置に安定させる役割を持つ。これらの相互作用はDMO蛋白質結晶解析においてDMO蛋白質の触媒部位にジカンバが存在するときに確認されている。したがって、ジカンバのベンゼン環だけでなく、これらの化学基も、触媒作用に必要な基質の正しい配置に非常に重要な役割を果たすことが示されている (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

以上のことから、構造的にジカンバに類似した化合物 (メトキシ基を含むフェニルカルボン酸) はDMO蛋白質の基質となる可能性が考えられた。そこで改変MON88701 DMO蛋白質の基質特異性の確認のため、各種除草剤とDMO蛋白質との基質反応性試験を行ったところ、DMO蛋白質は基質のジカンバに対して高い特異性をもち、他の構造が類似している除草剤を代謝して新たな代謝産物を産生することはないことが確認された (Malven, 2011)。同様に、ワタ内在性化合物とDMO蛋白質との基質反応性試験を行ったところ、改変MON88701 DMO蛋白質がワタ内在性化合物を代謝し、新たな代謝産物を産生することはないことが確認された (Burzio and McCann, 2010)。よって、改変MON88701 DMO蛋白質が除草剤ジカンバ以外の化合物を代謝し、宿主の代謝系に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと判断された。

【PAT 蛋白質】

PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質が他の L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害され

ないことが競合アッセイにおいて示された (Wehrmann et al., 1996)。さらに、グルホシネートの類似体であるL-グルタミン酸の存在下においても、PAT蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。これらのことから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CP4 EPSPS蛋白質】

改変CP4 EPSPS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蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS蛋白質の活性が増大しても、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。また、EPSPS蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩 (以下、「S3P」という。) と特異的に反応することが知られており (Gruys et al., 1992)、これら以外に唯一EPSPS蛋白質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。しかし、EPSPS蛋白質のシキミ酸及びS3Pとの反応について、反応の起こりやすさを示す特異性定数 (Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS蛋白質のS3Pとの反応特異性の約200万分の1に過ぎず (Gruys et al., 1992)、シキミ酸がEPSPS蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変CP4 EPSPS蛋白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

ィ　名称及び由来

親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターは以下のとおりである。また、いずれも *E. coli* 由来のベクターpBR322等を基に構築されている。

MON88701:　PV-GHHT6997

MON88913:　PV-GHGT35

ロ　特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

親系統の作出に用いられたプラスミド・ベクターの塩基数は以下のとおりである。

MON88701:　PV-GHHT6997; 9,379 bp

MON88913:　PV-GHGT35; 13,741 bp

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

MON88701 及び MON88913 の作出時に用いた *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカーとして利用された抗生物質耐性遺伝子は以下のとおりである。

MON88701:　スペクチノマイシン又はストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子

MON88913:　スペクチノマイシン又はストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子

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

PV-GHHT6997 及び PV-GHGT35 の感染性はいずれも知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

ィ　宿主内に移入された核酸全体の構成

MON88701 及び MON88913 に移入された供与核酸の構成要素の位置を、それぞれ

図 1~図 2 (p18~p19) に示した。

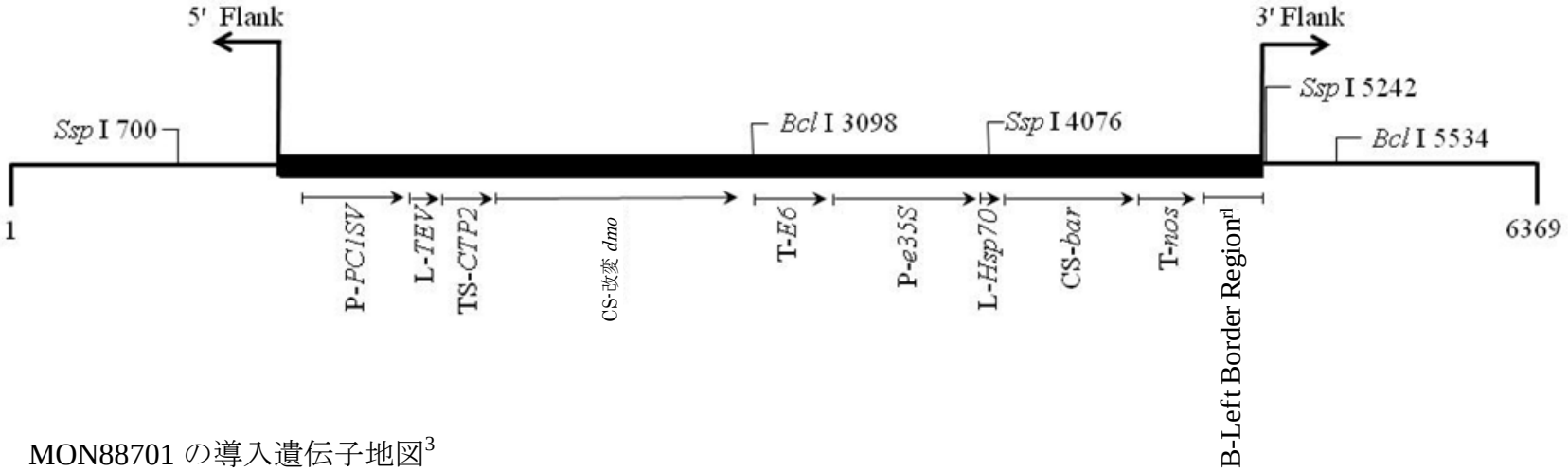
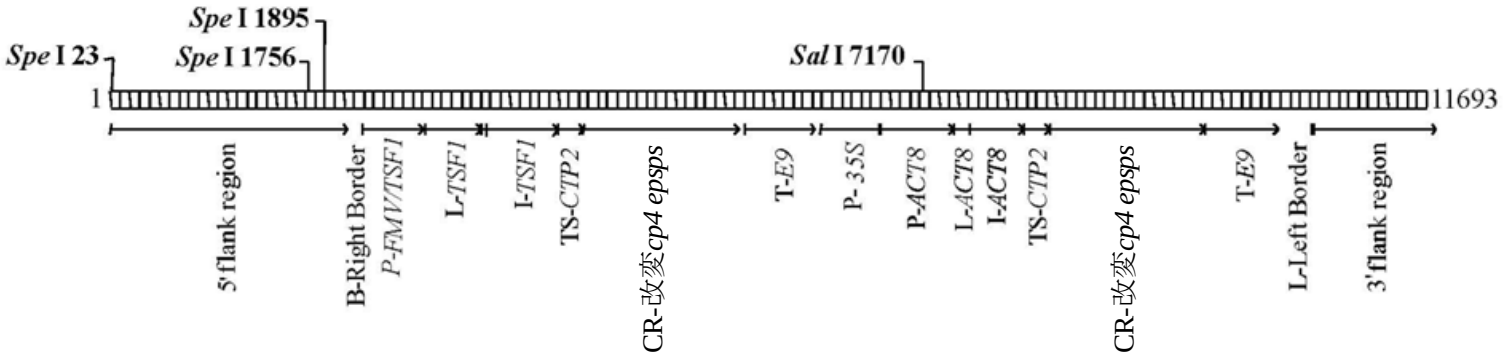


図 1　MON88701 の導入遺伝子地図[3]

5　図中の矢印は導入遺伝子の5'及び3'末端とそれに続く近傍のワタ内在性配列を示している。
図中のrlは、B-Left Border RegionがMON88701においてPV-GHHT6997と比較して短くなっていることを意味する。また、MON88701にB-Right Border Regionは導入されていない。
図中の数字はワタ核ゲノム中における位置を示しているため、表 1 (p9~p11)に示すプラスミド中の位置の数字とは一致しない。

[3]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　図 2　MON88913 の導入遺伝子地図[4]

図中の矢印は導入遺伝子の5’及び3’末端とそれに続く近傍のワタ内在性配列を示している。

* *Tsf1* は、近年 *EF-1α* として広く知られている。

図中の数字はワタ核ゲノム中における位置を示しているため、表 2 (p12~13) に示すサイズとは数字が一致しない。

[4]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

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

核酸の移入は、それぞれ以下の方法で行った。

MON88701：　アグロバクテリウム法
MON88913：　アグロバクテリウム法

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

形質転換された細胞の選抜は、それぞれ以下を添加した培地を用いて行った。
MON88701:　グルホシネート
MON88913:　グリホサート

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

MON88701 及び MON88913 については、形質転換細胞の選抜培養培地に抗生物質カルベニシリン及びセフォタキシムを添加することにより形質転換に用いたアグロバクテリウムを除菌し、その後、カルベニシリン及びセフォタキシムを含まない培地で培養し、菌が増殖しないことの確認により、菌体の残存のないことを確認した。

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

本スタック系統ワタは、MON88701 及び MON88913 を交雑育種法により育成したスタック系統である。図 3 (p21) に本スタック系統ワタの育成図を示す。なお、以下に MON88701、MON88913 及び本スタック系統ワタのわが国における申請・認可状況を記載した (表 3, p22) 。

【社外秘につき非開示】

図 3　本スタック系統ワタの育成例

【社外秘につき非開示】

表 3　MON88701、MON88913 及び本スタック系統ワタのわが国における申請・認可状況

平成 26 年 1 月現在

	食品[5]	飼料[6]	環境[7]
MON88701	2013年11月 申請	2013年11月 申請	2013年5月 第一種使用規程申請 2013年11月 パブリックコメント
MON88913	2005年4月 安全性確認	2006年2月 安全性確認	2006年2月 第一種使用規程承認
本スタック系統ワタ	[redacted][8] 申請予定	[redacted][8] 届出予定	2013年11月 第一種使用規程申請

[5] 食品衛生法に基づく。
[6] 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。
[7] 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に基づく。
[8] 社外秘につき非開示

(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

MON88701 及び MON88913 の導入遺伝子は核ゲノム上に存在することが確認されている (Burns, 2004; Arackal and Tian, 2011)。

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

【MON88701】

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON88701 の核ゲノム中 1 ヵ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることを確認した。また、T-DNA 領域以外の外側骨格配列は導入されていないことを確認した。さらに導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって確認された (Arackal et al., 2011)。

【MON88913】

サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、MON88913 の核ゲノム中 1 ヵ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることを確認した。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は導入されておらず、T-DNA 領域内の 2 つの改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットも完全な状態で導入されていた。さらに導入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって確認された (Burns, 2004)。

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

MON88701 及び MON88913 はすべて 1 コピーなので該当しない。

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

親系統の発現の安定性については以下のように親系統の評価で確認されている。

MON88701：ウエスタンブロット分析による改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT (*bar*) 蛋白質の発現確認 (Arackal et al., 2011)。

MON88913: ELISA 法による蛋白質の発現量の確認、及び除草剤グリホサートに対する耐性能により確認 (Burns, 2004)。

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

MON88701 及び MON88913 に移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

MON88701 を検出及び識別するための方法としては、導入遺伝子及びその周辺のワタ核ゲノムの DNA 配列に特異的なプライマーを用いた定性的 PCR 法を開発しており、本法により MON88701 を特異的に検出可能である (Burns, 2010)。

MON88913 を検出及び識別するための方法としては、導入遺伝子及びその周辺のワタ核ゲノムの DNA 配列に特異的なプライマーを用いた定性的 PCR 法を開発しており、本法により MON88913 を特異的に検出可能である (Burns, 2004)。

(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

本スタック系統ワタには各親系統に由来する以下の特性が付与されている。

MON88701: 導入遺伝子に由来する改変 MON88701 DMO 蛋白質及び PAT 蛋白質による除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性

MON88913: 導入遺伝子に由来する改変 CP4 EPSPS 蛋白質による除草剤グリホサート耐性

<u>除草剤耐性蛋白質間での機能的相互作用について</u>

第1-2-(1)-ロ-② (p15~16) に記載したように、改変MON88701 DMO蛋白質、

PAT蛋白質及び改変CP4 EPSPS蛋白質は高い基質特異性を有し、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。したがって、これらの蛋白質が相互に作用して予期しない代謝物が生じることは考え難い。

なお、本スタック系統ワタで発現する改変MON88701 DMO蛋白質及びPAT蛋白質は、いずれも親系統であるMON88701由来のものであり、両蛋白質が存在することによる影響はMON88701の申請時に評価済みである。

以上のことから、本スタック系統ワタにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。

したがって、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 MON88701 及び MON88913 を個別に調査した結果 (日本モンサント株式会社, 2005; 日本モンサント株式会社, 2013) に基づき評価した。

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

各親系統の生物多様性影響評価は終了しており、以下の生理学的又は生態学的特性について、各親系統とそれぞれの対照の非組換えワタとの間に相違がないことが確認されている。なお、生理学的又は生態学的特性に関する情報は日本版バイオセーフティクリアリングハウスホームページ[9] から参照できる。

[9]各親系統の生理学的又は生態学的特性に関する情報は以下のURLから参照できる。
[MON88701]
http://www.s.affrc.go.jp/docs/commitee/diversity/130806/pdf/3-2.pdf
[MON88913]
https://ch.biodic.go.jp/bch/OpenDocDownload.do?info_id=683&ref_no=1

a　形態及び生育の特性
b　生育初期における低温耐性
c　成体の越冬性
d　花粉の稔性及びサイズ
e　種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
f　交雑率
g　有害物質の産生性

3　遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 使用等の方法

―

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

―

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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

―

(6) 国外における使用等に関する情報

MON88701、MON88913 及び本スタック系統ワタの諸外国における申請・認可状況は以下の表 4 (p28) に示したとおりである。

表 4　MON88701、MON88913 及び本スタック系統ワタの諸外国における申請・認可状況

平成 26 年 1 月現在

	安全性審査の種類	MON88701	MON88913	本スタック系統ワタ
FDA	食品・飼料	2013年4月 安全性確認	2005年3月 安全性確認	—*
USDA	環境	2012年7月 申請	2004年12月 安全性確認	—*
Health Canada	食品	2012年6月 申請	2005年11月 安全性確認	—*
CFIA	環境・飼料	2012年6月 申請	2005年11月 安全性確認	[redacted][10]
FSANZ	食品	2014年1月 安全性認可	2006年2月 安全性確認	—*
KFDA / MFDS	食品	2012年10月 申請	2006年4月 安全性確認	[redacted][10]
RDA	環境	2012年10月 申請	2006年11月 安全性確認	[redacted][10]
MOA	環境・食品・飼料	[redacted][10]	2007年12月 安全性確認	—*

FDA: 米国食品医薬品庁
USDA: 米国農務省
Health Canada: カナダ保健省
CFIA: カナダ食品検査庁
FSANZ: オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関
KFDA: 韓国食品医薬品庁
MFDS: 韓国食品医薬品安全処
RDA: 韓国農村振興庁
MOA: 中国農業部
*FDA、USDA、Health Canada、FSANZ 及び MOA においてスタック系統は規制されていないため、申請は行っていない。

[10] 社外秘につき非開示

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 MON88701 及び MON88913 の自殖系統から、交雑育種法により作出した。

第一-2-(6)-① (p24~p25) で述べたとおり、MON88701 及び MON88913 で発現する除草剤耐性蛋白質 (改変 MON88701 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質)はそれぞれ異なる作用機作をもち、独立して作用していると考えられる。さらに、改変 MON88701 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質は高い基質特異性を有している。よって、本スタック系統ワタにおいて、それぞれの親系統由来の発現蛋白質が植物代謝経路に新たな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

したがって、本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価は、MON88701 及び MON88913 の検討結果に基づいて評価できると判断した。

以上のことから、本スタック系統ワタの生物多様性影響の評価は、各親系統の諸形質を個別に調査した結果に基づいて実施した。以下の「1 競合における優位性」、「2 有害物質の産生性」、「3 交雑性」の各項目について、資料 1~2 のとおり、各親系統において生物多様性影響が生ずるおそれはないと結論されている。このため、本スタック系統ワタは、競合における優位性、有害物質の産生性及び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。

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
(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

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
(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

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

(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

第三　生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統ワタは、除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ MON88701 及び除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 から、交雑育種法により作出した。

本スタック系統ワタで発現する除草剤耐性蛋白質 (改変 MON88701 DMO 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質)は、高い基質特異性を有し、宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。また、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。

したがって、これらの蛋白質が相互作用を示すことはないと考えられ、本スタック系統ワタについて各親系統が有する形質を併せ持つ以外に評価すべき形質の変化はないと考えられた。このことから、本スタック系統ワタの生物多様性影響は、各親系統の生物多様性影響評価に基づいて評価できると判断した。

各親系統において、競合における優位性、有害物質の産生性及び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結論されていることから、総合的評価として、本スタック系統ワタを第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

An, Y.-Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. The Plant Journal 10: 107-121.

Arackal, S.M., A.E. Deffenbaugh, C.W. Garnaat, K.E. Niemeyer, L.F. Ralston and Q. Tian. 2011. Stability of the DNA insert and expression of MON 88701 DMO and PAT (*bar*) proteins in MON 88701. Monsanto Technical Report MSL0023322. St. Louis, Missouri. (社内報告書).

Arackal, S.M. and Q. Tian. 2011. Segregation analysis of the coding sequences present in herbicide-tolerant cotton MON 88701 across multiple generations. Monsanto Technical Report RPN-2011-0089. St. Louis, Missouri. (社内報告書).

Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1α: Molecular cloning, characterization and expression. Molecular and General Genetics 219: 106-112.

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. Plant Molecular Biology 2: 335-350.

Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgette and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 5,633,435, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. Science 316: 1185-1188.

Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T- DNA. Nucleic Acids Research 11: 369-385.

Brubaker, C.L., F.M. Bourland and J.F. Wendel. 1999. The origin and domestication of cotton. Pages 3-31 in Cotton: Origin, History, Technology, and Production. C.W. Smith and J.T. Cothren (eds.). John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

Burns, J.A. 2004. Petition for the determination of nonregulated status for Roundup Ready® Flex cotton MON 88913. Monsanto Company, St. Louis, Missouri.

Burns, L. 2010. Cotton GH_S26695 EndPoint TaqMan PCR with *ACP* Internal Control for single seed. Monsanto Technical Report BQ-QC-10842-02. St. Louis, Missouri. (社内報告書).

Burzio, L. and M. McCann. 2010. Specificity of dicamba mono-oxygenase for potential endogenous substrates. Monsanto Technical Report RPN-10-365. St. Louis, Missouri. (社内報告書).

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics 437: 20-28.

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. The EMBO Journal 3: 1671-1679.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasinski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. Journal of Molecular Biology 392: 481-497.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. Journal of Molecular Biology 392: 498-510.

Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn*7* gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3"(9)-*O*-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research 13: 7095-7106.

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 4803-4807.

Fryxell, P.A. 1984. Taxonomy and germplasm resources. Pages 27-57 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.

Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. Biochemistry 31: 5534-5544.

Harris, W.D. 1981. Cottonseed. Pages 375-391 in Encyclopedia of Chemical Processing and Design. Volume 12. J.J. McKetta and W.A. Cunningham (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, New York.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. The Journal of Biological Chemistry 280: 24759-24767.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. The Plant Cell 7: 907-919.

Jenkins, J.N. 2003. Cotton. Pages 61-70 in Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role of Modern Biotechnology. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

John, M.E. 1996. Structural characterization of genes corresponding to cotton fiber mRNA, E6: Reduced E6 protein in transgenic plants by antisense gene. Plant Molecular Biology 30: 297-306.

Kakani, A., S. Saha, V.T. Sapra, A. Zipf and D.M. Stelly. 1999. Genetic mechanism and chromosomal location of pollen-specific gene(s) in *Gossypium*. Crop Science 39: 668-673.

Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35*S* promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. Science 236: 1299-1302.

Kerkhoven, G.J. and H.J.W. Mutsaers. 2003. *Gossypium* L. Pages 139-150 in Plant Resources of South-East Asia No 17: Fibre Plants. M. Brink and R.P. Escobin (eds.). Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Molecular and General Genetics 210: 437-442.

Lee, J.A. 1984. Cotton as a world crop. Pages 1-25 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Llewellyn, D. and G. Fitt. 1996. Pollen dispersal from two field trials of transgenic cotton in the Namoi Valley, Australia. Molecular Breeding 2: 157-166.

Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PClSV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. Biochemical and Biophysical Research Communications 244: 440-444.

Malven, M. 2011. Specificity of MON 88701 dicamba mono-oxygenase (DMO) when ten different herbicides are applied to MON 88701 and conventional cotton. Monsanto Technical Report RPN-2011-0078. St. Louis, Missouri. (社内報告書).

McGregor, S.E. 1976. Insect pollination of cultivated crop plants. Agricultural Handbook No. 496. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington, D.C.

NCPA. 1993. Cottonseed oil. L.A. Jones and C.C. King (eds.). National Cottonseed Products Association, Inc. and The Cotton Foundation, Memphis, Tennessee.

Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5 ' leader required for cap-independent translation. Journal of Virology 73: 9080-9088.

Niles, G.A. and C.V. Feaster. 1984. Breeding. Pages 201-231 in Cotton. R.J. Kohel and C.F. Lewis (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature 313: 810-812.

OECD. 2004. Consensus document on compositional considerations for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2004)16. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2008. Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). ENV/JM/MONO(2008)33. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No.45. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OGTR. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* L. and *Gossypium barbadense* L. (cotton). Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, Australia.

Padgette, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. Journal of Molecular Evolution 39: 80-86.

Richards, J.S., J.N. Stanley and P.C. Gregg. 2005. Viability of cotton and canola pollen on the proboscis of *Helicoverpa armigera*: Implications for spread of transgenes and pollination ecology. Ecological Entomology 30: 327-333.

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). Nucleic Acids Reseach 15: 8451-8466.

Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. Molecular and General Genetics 181: 8-12.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.

Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO Journal 6: 2519-2523.

USDA-FAS. 2013. Cotton area, yield, and production. U.S. Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, D.C. http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdreport.aspx?hidReportRetrievalName=BVS&hidReportRetrievalID=851&hidReportRetrievalTemplateID=1 [Accessed October 28, 2013].

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

Winter, J., R. Wright, N. Duck, C. Gasser, R. Fraley and D. Shah. 1988. The inhibition of petunia hsp70 mRNA processing during $CdCl_2$ stress. Molecular and General Genetics 211: 315-319.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 361-370.

生化学辞典 1990 生化学辞典 第2版 今堀和友、山川民夫 (編) 東京化学同人 東京 p. 497

財務省 2012 財務省貿易統計 http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm [Accessed February 9, 2012]

日本モンサント株式会社 2005 除草剤グリホサート耐性ワタ(*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI : MON-88913-8)の隔離ほ場における生物多様性影響評価報告書 (社内報告書)

日本モンサント株式会社 2013 除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ(改変*dmo*, *bar*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3)の隔離ほ場における生物多様性影響評価報告書 (社内報告書)

原田重雄 1981 II 繊維料 ワタ 工芸作物学 栗原浩 (編) 農山漁村文化協会 東京 pp. 26-42

平野寿助 1987 15 工芸作物 繊維料作物 ワタ 農学大事典 第2次増訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 養賢堂 東京 pp. 709-711

緊 急 措 置 計 画 書

平成25年11月28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　東京都中央区銀座四丁目10番10号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤ジカンバ、グルホシネート及びグリホサート耐性ワタ　(改変*dmo, bar,* 改変*cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.) (MON88701 × MON88913, OECD UI: MON-887Ø1-3 × MON-88913-8) (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おそれがあると、科学的に判断された場合、以下の措置を執ることとする。

1　第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

平成25年11月現在

社内委員	
*	日本モンサント株式会社　代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目10番10号 （電話番号　03-6226-6080）
	日本モンサント株式会社　農薬規制・環境部　部長
	日本モンサント株式会社　バイオ規制・環境部　部長
	日本モンサント株式会社　広報部　部長
	日本モンサント株式会社　広報部

*：　管理責任者

2　第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性がある関係各者から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

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本スタック系統ワタの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

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、弊社は、モンサント・カンパニーの協力のもと、本スタック系統ワタが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本スタック系統ワタに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5　農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

資料一覧

資料 1：生物多様性影響評価検討会での検討の結果「除草剤ジカンバ及びグルホシネート耐性ワタ (改変*dmo*, *bar*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88701, OECD UI : MON-887Ø1-3)」
(総合検討会における検討日：2013年8月6日)

資料 2：生物多様性影響評価検討会での検討の結果「除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI: MON-88913-8)」
(総合検討会における検討日：2005年6月9日)