

チョウ目害虫抵抗性ワタ (改変 *cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.)
 (COT67B, OECD UI: SYN-IR67B-1) の生物多様性影響評価書の概要

第一種使用規程承認申請書.....	1
生物多様性影響評価書の概要.....	1
第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	1
1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
(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
(2) 使用等の歴史及び現状.....	1
(3) 生理学的及び生態学的特性.....	3
2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	6
(1) 供与核酸に関する情報.....	6
(2) ベクターに関する情報.....	10
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	11
(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.....	12
(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.....	13
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	13
3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報.....	15
(1) 使用等の内容.....	16
(2) 生物多様性影響が生ずるおそれのある場合における生物多様性影響を防止す るための措置.....	16
(3) 国外における使用等に関する情報.....	16
第2 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	17
1. 競合における優位.....	17
2. 有害物質の産生性.....	18
3. 交雑性.....	19
4. その他の性質.....	19
第3 生物多様性影響の総合的評価.....	20
引用文献.....	22
緊急措置計画書.....	23

第一種使用規程承認申請書

平成 20 年 4 月 10 日

農林水産大臣 若林 正俊 殿
環境大臣 鴨下 一郎 殿

申請者 氏名 シンジェンタシード株式会社
代表取締役社長 大伴 秀郎
住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

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	チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 <i>cry1Ab</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.）（COT67B, OECD UI: SYN-IR67B-1）
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第1 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

イ、和名、英名及び学名

和名：ワタ

英名：cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

ロ、宿主の品種又は系統名

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

ハ、国内及び国外の自然環境における自生地域

現在、ワタ属植物種は2倍体種と4倍体種から成り、およそ50種が知られているが、栽培種は2倍体種 (2n=26) の *G. herbaceum* と *G. arboreum* 並びに4倍体種 (2n=52) の *G. hirsutum* と *G. barbadense* の4種のみである。今日、栽培されているワタの約91%かそれ以上は *G. hirsutum* 種と考えられている (文献 1)。

ワタ属植物種を自然環境における分布範囲で分類すると、2倍体種はオーストラリア群 (主にオーストラリア北西部に分布)、アフリカ・アラビア群 (主にアフリカからアラビア半島に分布) 及びアメリカ群 (主にメキシコ西部からペルー及びガラパゴス諸島に分布) の3グループに分類される。また、4倍体種は、*G. hirsutum* が中央アメリカ沿岸、*G. barbadense* がペルー及びエクアドル沿岸、*G. tomentosum* がハワイ諸島、*G. mustelinum* がブラジル及び *G. darwinii* がガラパゴス諸島に主に分布している (文献 2、文献 3、文献 4)。我が国におけるワタ属植物種の自生は報告されていない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ、国内及び国外における第一種使用等の歴史

メキシコの紀元前5800年ごろの洞窟から、4倍体の *G. hirusutum* のさく (果実) が発掘

されたといわれており、ワタの栽培利用の歴史は極めて古い。インドは紀元前数百年ごろからワタの生産国として有名であった。ここで作出された *G arboreum* は、北インドから東は東南アジアに広がり、西はアラビアを経て西アフリカに及んだ。中国ではワタは11世紀以来主要畑作物の一つになっている。新大陸では紀元前から4倍体の *G hirsutum* 及び *G barbadense* が栽培されていた。この当時のワタは永年性の灌木であったが、永年性の *G barbadense* は各地に広がって1年生の種類を生じ、南カロライナの沿岸地帯と島嶼部では今日の世界最長繊維種の「海島綿」となり、さらにこれがエジプトに入って現地の改良種と交雑の結果、長繊維種の「エジプト綿」を生じている。中南米で栽培された *G hirsutum* は1700年ごろアメリカ合衆国に入り、内陸部で「陸地綿」と呼ばれる1年生の早生種が栽培されてアメリカ合衆国の主要作物となったが、南北戦争のため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5）。

日本に初めてワタ作が伝えられたのは799年（延暦18年）で、三河国に漂着したインド人が、ワタを伝えたことが記録に残っているが、このワタはすぐに消滅したようである。その後、文祿年間（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年ごろには10万ヘクタール、2万4,000トンの生産をみるにいたったものの、輸入におされて次第に衰微した。第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったが、現在ではわずかに園芸的に観賞用として栽培されるのみである（文献5）。

ロ、主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2006年におけるワタの世界総栽培面積は約3,500万ヘクタールで、インドが約890万ヘクタール（25%）、米国が約560万ヘクタール（16%）、中国が約540万ヘクタール（15%）、パキスタンが約310万ヘクタール（9%）であった（文献6）。ワタの生産量は2,658万トンで、世界生産の約29%を中国が占めており、次いでインド、米国、パキスタンの順である。ワタの輸出量については、アメリカ、インド、ウズベキスタン、オーストラリアの順である。ワタの輸入量は、中国、トルコ、バングラデシュ、パキスタンの順である（文献7）。日本における2007年の採油用のワタの輸入量は約14万4,000トンであり、主に米国（約10万トン）やオーストラリア（約4万1,000トン）から輸入されている（文献8）。

ワタの生産は国によって原始的農耕が行われているところもあるが、主要な生産国では高度に機械化されている。開発途上国では人手による播種及び除草、手摘みによる収穫が行われているのに対して、先進国では、機械による播種、除草剤及び除草機による除草、摘み取り機による収穫が行われている（文献9）。

ワタの綿毛には約94%のセルロースが含まれており、その大部分が紡織用（綿糸、綿織

物等)あるいは製綿用(ふとん綿、脱脂綿等)に利用される。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%の蛋白質を含んでおり、油脂から綿実油が生産される(文献10、文献11)。綿実油は、食用油の他マーガリンや石鹼の原料等として用いられており、搾油後の綿実粕は精製して飼料や肥料として用いられる(文献5)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ、基本的特性

ワタは灌木状で高さ1~2.5 mである。葉柄の先の葉身は、普通3~5裂に深裂した掌状をしている。主茎からは結果枝と発育枝が生じ、発育枝からはさらに結果枝が生じ、結果枝には花が形成される。花芽は3枚のほう葉に包まれている。開花は下位の枝から始まり、1個体の花が咲き終わるのに1~2ヶ月要する。果実であるさくは、直径数cmであり、内部が3~5室に分かれ、各室に6~9個の種子ができる。さくの色は緑~暗緑色であり、その後茶色く成熟すると縦に割れて開く(文献10、文献11)。

ロ、生息又は生育可能な環境の条件

ワタは熱帯原産であり、高温・多照で、開じょ期に乾燥するところが望ましい(文献10)。発芽の最低温度は12℃であり、通常、年降雨量1,000~1,500 mm程度の場所で栽培されるが、灌漑ができれば降雨は少ないほうがよい(文献5)。ほぼ北緯40度から南緯35度の間の熱帯から温帯にかけて栽培される(文献10、文献11)。

ワタは酸性に弱い、アルカリに対する適応性が高い。塩分に対しては作物の中で耐性が高く、塩分の多いアルカリ性土壌でも栽培できる(文献10、文献11)。

ハ、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

ワタのさくは成熟するにつれて水分が減り、さく皮が裂けて開じょする(文献11)。種子の表面は、種子の表皮細胞が外部に突出、伸長してできた綿毛に覆われていることから(文献5)、脱粒性及び自然環境下で種子が散布される可能性は低いと考えられる。休眠性は浅く、土壌中で温度や湿度等の条件が揃えば発芽する(文献12)。ワタの種子は湿度の影響を非常に受けやすく、高湿度条件下で保存されたワタの種子の寿命は短い(文献13)。

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

ワタは種子によって繁殖し、栄養繁殖による植物体の再生は自然条件下ではおこらない（文献 12）。

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を行うが、マルハナバチやミツバチなどの花粉媒介昆虫によって他家受粉が生ずる場合もある（文献 14）。近縁種との交雑の可能性は、染色体数、媒介昆虫の有無、開花期の同時性、植物間の距離等に依存する（文献 15）が、我が国においては交雑可能な近縁野生種は報告されていない。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

ワタは一花当たり 45,000 を超える花粉粒を生産する（文献 16）。ワタの花粉は他の花粉と比べて重く、粘性が高いため、自然条件下で風に運ばれることはほとんどない。花粉の飛散距離に関してはこれまでにいくつかの報告があるものの、いずれの報告においても 16 メートル以上離れた植物体間での交雑は認められていないことから（文献 12、文献 15）、花粉の飛散距離は短いと考えられる。なお、マルハナバチやミツバチ等の昆虫によって花粉が媒介されることはある。ワタの花粉の寿命は約 12 時間である（文献 17）。

ニ、有害物質の産生性

ワタにおいて、他感作用物質のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

ホ、その他の情報

ワタにはゴシポールとシクロプロペン脂肪酸が含まれている（文献 18）。

テルペノイドであり、腺組織（ピグメントグランド）に存在するゴシポールには遊離型と結合型があるが、遊離型は非反芻動物に対する毒性及び雄の抗受精特性を有する（文献 18）。綿実粕は、綿実中の遊離ゴシポールが搾油工程で蛋白質と結合かつ不溶化して著しく減少し、無害な結合型に変化するために飼料として使用できる。綿実油中の遊離ゴシポールは精製工程で結合型となり、各工程で取り除かれる（文献 19）。

綿実油にはシクロプロペン環を有する脂肪酸（ステルクル酸やマルバリン酸）が存在することが知られており、綿実原油中での含量は1%前後である（文献 19）。シクロプロペン脂肪酸は、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害するため、鶏卵の脱色や、ふ化率の低下を引き起こ

す（文献 18）。シクロプロペン脂肪酸は綿実油の精製工程を経るにしたがって著しく減少し、特に活性白土による脱色及び脱臭工程で取り除かれる。また、水素添加反応によってもその特性を失う（文献 19）。

ワタは種子が多量の綿毛に覆われているため、鳥類のような種子を捕食する動物は好まず、哺乳類もゴシポールが含まれていることや種子の形態により、捕食することを避けると思われる。さらに、野生の哺乳動物が種子を捕食するという例も知られていない。

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

イ、構成及び構成要素の由来

チョウ目害虫抵抗性ワタ（改変*cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.）（COT67B, OECD UI: SYN-IR67B-1）（以下、「本組換え体」と記す。）の作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来は、表1（pNOV4641）及び表2（pNOV1914）に示すとおりである。

表 1 本組換え体作出に用いた供与核酸 pNOV4641 の構成及び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
害虫抵抗性遺伝子カセット		
Act2 プロモーター	1,408	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のアクチン遺伝子 (actin-2 遺伝子) の第 1 エクソン及びイントロンを含むプロモーター領域 (文献 20)。目的遺伝子 (改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子) を恒常的に発現させる。
改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子	3,546	改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子がコードする改変 Cry1Ab 蛋白質は、C 末端の一部に付加された 26 個のアミノ酸からなる「Geiser motif (文献 21)」と呼ばれる配列以外は、 <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> strain HD-1 の <i>cry1Ab</i> 遺伝子がコードする Cry1Ab 蛋白質とアミノ酸配列が完全に一致する。
NOS ターミネーター	253	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる (文献 22)。
その他の領域 (=外骨格領域)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti - プラスミドの T-DNA レフトボーダー領域 (文献 23)。
<i>spec</i>	789	大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>) 由来のトランスポゾン Tn7 のストレプトマイシンアデニル酸転移酵素遺伝子 (<i>aadA</i>) (文献 24)。エリスロマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン耐性を付与するため、ベクターの選抜マーカーとして用いた。
<i>virG</i>	726	<i>A. tumefaciens</i> 由来のプラスミド pAD1289 の、T-DNA の転移に関与する領域。 <i>virG</i> の形質が恒常的に発現されるように、54 番目のアミノ酸のアスパラギンがアスパラギン酸に置換されている (文献 25)。

<i>repA</i>	1,074	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミド pVS1 のレプリコン (DNA の複製を制御する最小機能複製単位) 領域。 <i>A. tumefaciens</i> においてベクターの維持に必要な遺伝子 (文献 26)。
VS1 ori	405	<i>Pseudomonas</i> 属細菌由来のプラスミド pVS1 の複製起点共通配列。 <i>A. tumefaciens</i> における複製起点となる (文献 27)。
ColE1 ori	807	<i>E. coli</i> 由来のプラスミドの複製起点 (文献 28)。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti - プラスミドの T-DNA ライトボーダー領域 (文献 29)。

表 2 本組換え体作出に用いた供与核酸 pNOV1914 の構成及び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
選抜マーカー遺伝子カセット		
Ubq3 プロモーター	1,721	<i>A. thaliana</i> 由来のポリユビキチン遺伝子 (<i>ubi3</i>) の第 1 イントロンを含むプロモーター領域 (文献 30)。選抜マーカー遺伝子 (<i>aph4</i> 遺伝子) を恒常的に発現させる。
<i>aph4</i> 遺伝子	1,026	<i>E. coli</i> 由来のリン酸基転移酵素 (ハイグロマイシン B リン酸基転移酵素) 遺伝子。APH4 蛋白質をコードする。ハイグロマイシンといくつかの類縁アミノグリコシドをリン酸化することから (文献 31)、ハイグロマイシン耐性を付与する。本組換え体作出の際の形質転換細胞の選抜マーカー。なお、自殖後代において、 <i>aph4</i> 遺伝子が分離して改変 <i>cry1Ab</i> 遺伝子のみが挿入されている個体を選抜したため、本遺伝子は本組み換え体には存在しない。
NOS ターミネーター	253	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター配列。ポリアデニル化により、mRNA の転写を終結させる (文献 22)。
その他の領域 (=外骨格領域)		
LB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti - プラスミドの T-DNA レフトボーダー領域 (文献 23)。
<i>trfA</i>	1,149	プラスミドの複製に必要な複製開始蛋白質をコードする遺伝子 (文献 32)。
<i>npt3</i>	795	放線菌 <i>Streptococcus faecalis</i> 由来のカナマイシン耐性を付与するアミノグリコシド 3'-リン酸基転移酵素 TypeIII 遺伝子 (文献 33)。

oRK2	711	プラスミド RK2 の複製起点である <i>oriV</i> を含む領域 (文献 34)
<i>traJ</i>	372	プラスミドの複製のための <i>relaxosome</i> 蛋白質をコードする遺伝子 (文献 35)。
<i>oriT</i>	40	<i>E. coli</i> 由来の細菌におけるプラスミドの接合伝達に必要なプラスミド接合伝達開始起点(文献 35、文献 36)。
<i>virG</i>	726	<i>A. tumefaciens</i> 由来のプラスミド pAD1289 の、T-DNA の転移に関与する領域。 <i>virG</i> の形質が恒常的に発現されるように、54 番目のアミノ酸のアスパラギンがアスパラギン酸に置換されている (文献 25)。
<i>tetR</i>	651	<i>Klebsiella aerogenes</i> 由来のテトラサイクリン耐性リプレッサー遺伝子(文献 37)。テトラサイクリン耐性遺伝子(<i>tetA</i>)を発現制御する。
RB	25	<i>A. tumefaciens</i> 由来のノパリン Ti - プラスミドの T-DNA ライトボーダー領域 (文献 29)。

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

本組換え体作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能を表1及び表2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（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

改変 Cry1Ab 蛋白質

本組換え体において改変 *cry1Ab* 遺伝子によって発現する改変 Cry1Ab 蛋白質が属する Cry1Ab 蛋白質ファミリーは *Bacillus thuringiensis* の芽胞形成期に産生されるチョウ目昆虫に殺虫活性を示す蛋白質として見出された。感受性昆虫種が Cry 蛋白質を摂取して消化すると、特異な蛋白質消化によって活性ポリペプチド（コア蛋白質）となり、昆虫の中腸表面の特異的な受容体に結合し、イオンチャネルが形成されて消化器官が損傷を受け、そして死に至ることが知られている（文献 37）。この作用機作は *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* 由来の Cry1Ab 蛋白質でも同様である。

改変 Cry1Ab 蛋白質は、1,181 アミノ酸からなる。改変 Cry1Ab 蛋白質には、C 末端領域

に「Geiser motif」と呼ばれる 26 アミノ酸が付け加えられている。Geiser motif は *Bacillus thuringiensis* 培養時における改変 Cry1Ab 蛋白質の生産効率を向上させる目的で付与された配列であるが（文献 21）、植物における機能はない。

Cry1Ab 蛋白質以外の Cry1 蛋白質はすべて Geiser motif あるいは Geiser motif と非常に相同性の高い配列をもともと有しており、生物農薬として既に使用されている Cry1Aa 蛋白質、Cry1Ac 蛋白質、Cry1Ca 蛋白質及び Cry1Da 蛋白質などにも含まれている。改変していない Cry1Ab 蛋白質に Geiser motif が含まれていないのは、*cry1Ab* 遺伝子から Geiser motif が欠失したためではないかと考えられている（文献 21）。なお、改変 Cry1Ab 蛋白質に付加した Geiser motif は Cry1Ac 蛋白質由来である。

改変 Cry1Ab 蛋白質における殺虫活性を示すコア蛋白質のアミノ酸配列は保持されており、Cry1Ab 蛋白質と一致することから、改変 Cry1Ab 蛋白質と野生型 Cry1Ab 蛋白質の殺虫活性は同等であると考えられる。Cry1Ab 蛋白質の殺虫活性については、カナダ政府のデータベース（文献 39）に詳細な調査結果が掲載されており、ワタ栽培における重要害虫であるチョウ目昆虫のコットンボールワーム（アメリカタバコガ）（*Helicoverpa Zea*）、タバコバッドワーム（ニセアメリカタバコガ）（*Heliothis virescens*）及びピンクボールワーム（ワタアカミムシ）（*Pectinophora gossypiella*）等に殺虫活性を示す。また、同様の結果が、本組換え体を用いた試験によっても確認されている。なお、Cry1Ab 蛋白質やこの蛋白質を発現する組換え植物に関し、ミツバチ等の訪花昆虫を含む非標的生物に対する毒性影響評価が行われている。そのような評価によると、Cry1Ab 蛋白質のミツバチに対する毒性は極めて小さく、幼虫及び成虫に対して影響がないことが確認されている（文献 15、文献 40）。また、他の非標的生物についても Cry1Ab 蛋白質を発現する組換え植物が、非標的生物に対して有害な影響を及ぼすことはないとされている（文献 15、文献 40）。

また、改変 Cry1Ab 蛋白質のアミノ酸配列が既知アレルゲンや毒素と相同性をもたないことを、公的に利用可能な蛋白質データベース（SWISS-PROT、FARRP 等）を用いた相同性検索によって確認した。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

改変 *cry1Ab* 遺伝子によって発現される改変 Cry1Ab 蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくく、よって宿主の代謝系と独立して機能すると考えられる。したがって、改変 Cry1Ab 蛋白質が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性は極めて低いと考えられる。

なお、*aph4* 遺伝子については、2つの形質（ハイグロマイシン抵抗性及びチョウ目害虫

抵抗性)を分離させ、APH4 蛋白質をコードする *aph4* 遺伝子を持たない個体を選抜し、自殖系統及び商業品種との交配母本として用いている。したがって、本組換え体における APH4 蛋白質の宿主の代謝への影響はない。

以上のことから、導入された遺伝子が宿主の持つ代謝系を変化させる可能性はないものと考えられる。

(2) ベクターに関する情報

イ、名称及び由来

本組換え体の作出に用いたベクターは、ベクター pNOV4641 と pNOV1914 である。pNOV4641 は *E. coli* 由来の pBluescript II SK(+)を、pNOV1914 は *E. coli* 由来の pBR322 を基に構築された。

ロ、特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

ベクター pNOV4641 の塩基数は 10,995 bp であり、その塩基配列は明らかにされている。

ベクター pNOV1914 の塩基数は 11,727 bp であり、その塩基配列は明らかにされている。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合はその機能

ベクター pNOV4641 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、スペクチノマイシン耐性を発現する *spec* 遺伝子が含まれているが、本組換え体中にこの遺伝子は導入されていない。ベクター pNOV1914 には、微生物中でベクターを増殖する際の選抜マーカーとして、カナマイシン耐性を発現する *npt3* 遺伝子が含まれているが、本組換え体中にこの遺伝子は導入されていない。ベクター pNOV1914 に含まれ、ハイグロマイシン耐性を発現する *aph4* 遺伝子は、組換え体の選抜マーカーとして用いた。

自殖によって得た世代で 2 つの形質 (ハイグロマイシン抵抗性及びチョウ目害虫抵抗性) を分離させた後、TaqMan PCR を行い改変 *cry1Ab* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の有無を確認することによって、改変 *cry1Ab* 遺伝子を有し *aph4* 遺伝子を有さない個体を系統育成用の親株として選抜した。したがって、本組換え体には、*aph4* 遺伝子は含まれていない。

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

ベクター中に感染性を示すような配列はない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ、宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換え体の作出に用いたベクターpNOV4641及びベクターpNOV1914のT-DNA領域であるRBとLB間に挿入されている2つの遺伝子発現カセット（害虫抵抗性遺伝子カセット及び選抜マーカー遺伝子カセット）が宿主に移入される。

ロ、宿主内に移入された核酸の移入方法

アグロバクテリウム法によって、ベクターpNOV4641及びpNOV1419のT-DNA領域をワタの葉柄組織に導入した。

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

遺伝子導入後、ハイグロマイシンを含む培地上で培養することによって、APH4 蛋白質発現細胞を選抜し、植物体に再分化させた。さらに、改変 *cryIAb* 遺伝子を含む個体をTaqMan PCR で確認することによって、2つの形質転換ベクターpNOV4641及びpNOV1914由来の遺伝子が組み込まれた植物体のみを選抜した。

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

形質転換細胞の選抜培養培地に抗生物質セフトキシシンを添加して、形質転換に用いたアグロバクテリウムを除菌した。その後、セフトキシシンを含まない培地で培養し、菌体の残存の無いことを確認した。

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及び系統樹

遺伝子導入後に選抜した細胞から植物体を再分化、馴化した後、温室で栽培した。その後、2つの形質（ハイグロマイシン抵抗性及びチョウ目害虫抵抗性）を分離させた。TaqMan PCR によって改変 *cryIAb* 遺伝子及び *aph4* 遺伝子の有無を確認し、改変 *cryIAb* 遺伝子を有し *aph4* 遺伝子を有さない個体を選抜した。

なお、本組換え体については、2007年5月に農林水産省及び環境省によって、「遺伝子

組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、第一種使用等（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）が承認された。また、食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に、順次行う予定である。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ、移入された核酸の複製物が存在する場所（染色体上、細胞小器官内、原形質内の別）

本組換え体の挿入遺伝子はメンデルの法則に従い、複数世代にわたって伝達されることから、染色体上に存在すると考えられる。

ロ、移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

本組換え体の複数世代から抽出したゲノムDNAを制限酵素処理により切断し、ベクターpNOV4641のT-DNA領域及び外骨格領域をプローブに用いたサザンブロット分析を行った。その結果、改変*cry1Ab*遺伝子カセットを含むベクターpNOV4641のT-DNA領域をプローブに用いた場合、複数世代で1コピーのT-DNAが挿入されていることを示唆する同一のバンドが検出された。そのため、複数世代に渡り1コピーの改変*cry1Ab*遺伝子カセットが安定して伝達されていることが示され、各世代における挿入遺伝子の同一性が確認された。なお、ベクターpNOV4641の外骨格領域をプローブを用いた場合には、いずれの世代においてもバンドは検出されなかったことから、ベクターpNOV4641の外骨格領域は本組換え体には存在しないことが確認された。

また、ベクターpNOV1914のUbq3プロモーター-*aph4*遺伝子領域及び外骨格領域をプローブに用いた場合、いずれの世代においてもバンドは検出されなかった。そのため、ベクターpNOV1914のUbq3-*aph4*領域及び外骨格領域は本組換え体には存在しないことが確認された。

以上の結果から、本組換え体には1コピーのベクターpNOV4641のT-DNA領域がゲノムの1ヶ所に挿入されており、後代へ安定して伝達されていることが確認された。

ハ、(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

2004年に米国の4ヶ所のほ場において本組換え体を栽培し、生育ステージに応じて各組織別にサンプルを採取し、改変Cry1Ab蛋白質の発現量をELISA法により測定した結果、

本組換え体における改変 Cry1Ab 蛋白質は、個体間及び世代間で安定的に発現していると考えられた。

なお、本組換え体の選抜の過程において *aph4* 遺伝子を有していない個体を選抜し、自殖系統及び戻し交配系統の親株として用いているため、APH4 蛋白質の発現量は測定していない。

ニ、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

移入された核酸は伝達を可能とする配列を含まない。よって、野生動植物等に伝達されるおそれはないと推定される。

(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

本組換え体の目的遺伝子の存在は、ゲノム DNA を制限酵素で切断後、改変 *cry1Ab* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析の結果より確認できる。また、挿入遺伝子の塩基配列及びその近傍ゲノムの塩基配列に基づいた本組換え体の特異的検出法を開発している。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

イ、移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の具体的な内容

本組換え体に付与された特性は改変 *cry1Ab* 遺伝子によって発現する改変 Cry1Ab 蛋白質によるチョウ目害虫抵抗性である。改変 Cry1Ab 蛋白質を発現する本組換え体は、米国のワタ栽培で発生するコットンボールワーム（アメリカタバコガ）(*Helicoverpa zea*)、タバコバッドワーム（ニセアメリカタバコガ）(*Heliothis virescens*) 及びピンクボールワーム(ワタアカミムシ) (*Pectinophora gossypiella*) 等へのチョウ目害虫抵抗性を示す（文献 38）。

ロ、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

本組換え体とその対照となる非組換え体を使用し、シンジェンタ ジャパン株式会社 研究部 中央研究所 神座サイトにて、平成 19 年に隔離ほ場試験を実施した。

① 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、発芽経過、発芽率、開花日、花の形状及び花弁色、葉長及び葉幅、さくの長さ及び幅、開じょ期（第 1 さくの開じょ日）、繊維色、収穫期（株の勢

いが衰え、落葉が確認された日)、草丈、節数、着蕾数、総分枝数、1株当たりの収穫さく数、1株当たりの総さく数、1さく当たりの室数、1さく当たりの種子数、種子の色及び形状、1さく当たりの新鮮重並びに収穫期の地上部重及び地下部重について調査を行った。なお、発芽率、葉長及び葉幅、さくの長さ及び幅、草丈、節数、着蕾数、総分枝数、1株当たりの収穫さく数、1株当たりの総さく数、1さく当たりの室数、1さく当たりの種子数、1さく当たりの新鮮重並びに収穫期の地上部重及び地下部重については統計処理を行った。その結果、さくの幅、開花期及び開じょ期を除く全ての調査項目において、本組換え体と対照の非組換え体との間で有意差あるいは相違は見られなかった。有意差の認められたさくの幅は本組換え体が34.8mmで、対照の非組換え体では33.5mmであった。また、開花期は本組換え体が9月15日、非組換え体が9月17日であり、開じょ期は本組換え体が12月4日で、非組換え体では11月28日であった。

② 生育初期における低温又は高温耐性

1 葉期の本組換え体と対照の非組換え体の幼苗を、冬季を想定した低温条件下（明期12時間で10℃、暗期12時間で2℃）で栽培し、その低温ストレスによる障害程度を比較した。その結果、本組換え体と非組換え体とも完全に枯死し、その枯死程度に両者間で相違は見られなかった。

③ 成体の越冬性

隔離ほ場試験で栽培した本組換え体と非組換え体の植物体は、冬季の低温及び降霜で落葉・枯死した。以上のことから、本組換え体と対照の非組換え体の成体の越冬性に相違はないと判断した。

④ 花粉の稔性及びサイズ

本組換え体と対照の非組換え体から花粉を採取し、稔性率、形状及びサイズを顕微鏡下で比較観察した。その結果、アセトカーミン溶液染色による花粉稔性率に、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差は認められなかった。また、花粉の形状はともに円形で、その直径に両者間で有意差は認められなかった。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量について、1株当たりの総さく数及びさく当たりの種子数の調査を行ったが、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差は認められなかった。

脱粒性について、収穫時に開じょしたさくから自然に脱粒した種子の有無及び脱粒数を調査したが、本組換え体、対照の非組換え体とも脱粒した種子は観察されず、脱粒性に相

違は見られなかった。

発芽率については、本組換え体と非組換え体の種子の発芽率はいずれも 95%以上で有意差は認められなかった。

ワタの種子は一般的には休眠性が浅いことが知られており（文献 12）、休眠性については試験は行っていない。

⑥ 交雑率

我が国には、本組換え体が属する 4 倍体栽培ワタ (*Gossypium hirsutum*) と交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、交雑率の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

本組換え体の有害物質産生性に関して、隔離ほ場において以下のような評価試験を実施した。

鋤込み試験：

各植物体の地上部（葉及び茎）を収穫し、乾燥、粉末化した後に、土壌と混和し、検定植物としてハツカダイコンを播種した。播種7日後に発芽率を調査し、播種21日後に植物体を収穫して乾燥重を測定した。その結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった。

後作試験：

植物体栽培後の各土壌に検定植物としてハツカダイコンを播種し、温室で栽培を行なった。播種7日後に発芽率の調査を行い、播種21日後に植物体を収穫して乾燥重を測定した。その結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で、ハツカダイコンの発芽率及び乾燥重に有意差は認められなかった。

土壌微生物相試験：

本組換え体及び対照の非組換え体の収穫時の栽培土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌数、細菌数及び放線菌数を計測した。その結果、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差は認められなかった。

3. 遺伝子組換え生物等の使用に関する情報

(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) 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。

(3) 国外における使用等に関する情報

米国では、米国農務省（USDA）の認可を得て2003年よりほ場試験を開始している。また、USDAへの無規制裁培（商業栽培）の承認のための申請を2007年4月に、米国食品医薬品庁（FDA）への食品及び飼料安全性の確認のための申請を2007年7月に、それぞれ行っている。

我が国においては、2007年5月に農林水産省及び環境省によって、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に従い、第一種使用等（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）が承認された。食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料としての安全性の確認申請を農林水産省に、順次行う予定である。

第2 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

(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実績があるが、我が国の自然環境下で自生することは報告されていない。

隔離ほ場試験において、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、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、休眠性及び発芽率を検討した。その結果、さくの幅と開じょ期を除く全ての項目において、本組換え体と対照の非組換え体間で有意差あるいは相違は認められなかった。有意差の認められたさくの幅は本組換え体が34.8mmで、対照の非組換え体では33.5mmであった。また、開花期は本組換え体が9月15日、非組換え体が9月17日であり、開じょ期は本組換え体が12月4日で、非組換え体では11月28日であった。

さくの幅を除き、さくの諸特性（さくの長さ、さく数、室数、種子数、新鮮重等）に本組換え体と非組換え体間で有意差や相違は見られなかったことから、さくの幅の差によって、本組換え体におい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。また、ワタでは、最初の花蕾が現れるのは播種後35～45日程度で、その後3～4週間程度で開花する（文献17）。開じょ期については、ワタの開花から開じょまでの日数は一般に45日から65日程度（文献9）で、およそ20日の変動がある。したがって、開花期及び開じょ期の差によっても、本組換え体において競合における優位性が高まるとは考えにくい。以上のことから、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質は、対照の非組換え体や従来ワタと同様と判断された。

本組換え体には、改変Cry1Ab蛋白質の発現によるチョウ目害虫抵抗性の性質が付与されているが、チョウ目害虫による食害は、ワタが我が国の自然環境下において生育することを困難にさせる主な要因ではないことから、この形質の付与が栽培作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にくい。

以上のことから、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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。

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

宿主の属する分類学上の種であるワタについては他感作用物質のような野生動植物等に対して影響を与える有害物質の産生性は知られていない。

有害物質の産生性については、隔離ほ場において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を実施した。その結果、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験において、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差は認められず、意図しない有害物質の産生はないと考えられた。

本組換え体において、改変 *cry1Ab* 遺伝子によって発現する改変 Cry1Ab 蛋白質は、酵素活性をもつとは考えにくいことから、本組換え体において産生される改変 Cry1Ab 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、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 Cry1Ab 蛋白質のアミノ酸配列が既知のアレルゲンや毒素と相同性をもたないことを確認している。

本組換え体にはチョウ目害虫抵抗性を示す改変 Cry1Ab 蛋白質の産生性が付与されているため、我が国に生息するチョウ目昆虫種が生育している本組換え体を直接食餌した場合、生存に影響を及ぼす可能性が想定される。しかしながら、本組換え体の植物体を摂食するチョウ目昆虫は害虫とみなされることから、ここでは対象としない。また、本組換え体の花粉による非標的チョウ目昆虫種への影響が懸念されるが、ワタの花粉は比較的重く、粘性があることから飛散する可能性は少ない。仮に飛散したとしても、その範囲は極めて限定されたものであることから、ワタを摂食しない非標的チョウ目昆虫種が本組換え体の花粉に暴露される可能性は低いと考えられる。

以上のことから、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。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、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。

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

我が国には、本組換え体が属する4倍体栽培ワタ (*Gossypium hirsutum*) と交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、交雑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。

4. その他の性質

上記の他に、生物多様性影響の評価を行うことが適当であると考えられる本組換え体の性質はないと考えられる。

第3 生物多様性影響の総合的評価

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

隔離ほ場試験において、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質として、形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、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、休眠性及び発芽率を検討した。その結果、さくの幅、開花期及び開じょ期を除く全ての項目において、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差が認められなかった。有意差の認められたさくの幅を除くと、さくの諸特性（さくの長さ、さく数、室数、種子数、新鮮重等）に本組換え体と非組換え体の間で有意差や相違は見られなかったことから、さくの幅の差によって、本組換え体における優位性が高まることはないと考えられた。また、ワタでは、最初の花蕾が現れるのは播種後35～45日程度で、その後3～4週間程度で開花する。開じょ期については、ワタの開花から開じょまでの日数は一般に45日から65日程度で、およそ20日の変動がある。したがって、開花期及び開じょ期の差によっても、本組換え体において優位性が高まるとは考えにくい。以上のことから、本組換え体の競合における優位性に関わる諸形質は、対照の非組換え体や従来のワタと同様と判断された。また、本組換え体は改変Cry1Ab蛋白質を植物体中で生産するが、この形質の付与が栽培作物であるワタを自然環境下で自生させ、さらに競合における優位性を高めるとは考えにくい。したがって、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。

有害物質の産生性に関しては、隔離ほ場において後作試験、鋤込み試験及び土壤微生物相試験を実施したが、本組換え体と対照の非組換え体の間で有意差は認められず、意図しない有害物質の産生はないと考えられた。また、本組換え体で発現する改変Cry1Ab蛋白質が酵素活性を持つとは考えにくいことから、改変Cry1Ab蛋白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼし、有害物質を産生するおそれはないと判断された。本組換え体にはチョウ目害虫抵抗性を示す改変Cry1Ab蛋白質の産生性が付与されているため、我が国に生息するチョウ目昆虫種が生育している本組換え体を直接食餌した場合、生存に影響を及ぼす可能性が想定されるものの、本組換え体の植物体を摂食するチョウ目昆虫は害虫とみなされることから、ここでは対象としない。また、本組換え体の花粉による非標的チョウ目昆虫への影響が懸念される。しかし、ワタの花粉は比較的重く、粘性があるために飛散する可能性は少ないことから、ワタを摂食しない非標的チョウ目昆虫種が本組換え体の花粉に暴露される可能性は低いと考えられる。したがって、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。

交雑性に関しては、我が国には本組換え体ワタと交雑可能な近縁野生種は自生していないことから、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

以上のことから、本組換え体を第一種使用規程に従って使用した場合に、生物多様性影響を生ずるおそれはないと総合的に判断した。

引用文献

社外秘につき非開示

緊急措置計画書（食用・飼料に供する場合）

平成 20 年 4 月 10 日

氏名 シンジェンタシード株式会社

代表取締役社長 大伴 秀郎

住所 千葉県香取郡多古町高津原向ノ台 401-2

第一種使用規程の承認を申請しているチョウ目害虫抵抗性ワタ（改変 *cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.）（COT67B, OECD UI: SYN-IR67B-1）（以下、「本組換え体」という。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定のために関係機関への協力等を必要に応じて行う。更に、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。

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

個人名・所属は個人情報につき非開示。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、本組換え体の開発者である米国シンジェンタシード社と連絡をとり、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

本組換え体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た場合には、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使用等をしている者に連絡するとともに、弊社のホームページにおいて情報提供を行い、問い合わせ専用窓口を設置する。

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

具体的な措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実施する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

本組換え体が我が国において生物多様性影響を及ぼすおそれがあると認められた場合は、速やかに、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。

チョウ目害虫抵抗性ワタ
(改変 *cry1Ab*, *Gossypium hirsutum* L.)(COT67B, OECD UI : SYN-IR67B-1)

生物多様性影響評価書

添 付 資 料

- 別紙 1 Cry1Ab 蛋白質を発現する遺伝子組換えワタを用いた殺虫活性の比較
- 別紙 2 ベクターpNOV4641 及びベクターpNOV1914 の塩基配列
- 別紙 3 COT67B : 分離比による挿入遺伝子の安定性評価
- 別紙 4 COT67B : コピー数及び複数世代における挿入遺伝子の安定性
- 別紙 5 COT67B : ELISA による蛋白質の発現量測定
- 別紙 6 COT67B : 系統特異的検出方法
- 別紙 7 COT67B : 隔離ほ場試験結果報告書

社外秘情報につき非開示

シンジェンタシード株式会社