

除草剤グルホシネート耐性ワタ (*bar, Gossypium hirsutum* L.) (LLCotton25, OECD UI: ACS-GH001-3) 申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書..... 1

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況..... 2

(2) 使用等の歴史及び現状..... 2

(3) 生理学的及び生態学的特性..... 3

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報..... 5

(2) ベクターに関する情報..... 9

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 10

(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... 10

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにこれらの感度及び信頼性... 11

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 11

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..... 15

(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..... 15

(3) 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..... 16

(4) 国外における使用等に関する情報..... 16

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性..... 17

2 有害物質の産生性..... 18

3 交雑性..... 19

4 その他..... 20

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 21

緊急措置計画書..... 23

第一種使用規程承認申請書

平成16年6月10日

農林水産大臣 亀井 善之 殿
環境大臣 小池 百合子 殿

申請者 氏名 バイエルクロップサイエンス株式会社
代表取締役社長 ローレンス ユー 印
住所 東京都港区高輪4-10-8

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	除草剤グルホシネート耐性ワタ (<i>bar</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (LLCotton25, OECD UI:ACS-GHØØ1-3)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に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（陸地綿）

英名：Upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

ロ 宿主の品種名

宿主の品種は Coker 312 で SEEDCO Corporation, Texas 社の米国保護品種である。Coker312 は Coker100 と D&PL-15 の交配から開発されたもので系統選抜の継代を通して選択された。

八 国内及び国外の自然環境における分布状況

Gossypium 属は、熱帯地方を中心に 39 種が分布するが、そのうち作物として栽培されている種は *G.hirsutum*、*G.barbadense*、*G.arboreum* L.、*G.herbaceum* 及び *G.lanceolatum* Todaro である。これらのうち、*G.arboreum* 及び *G.herbaceum* は 2 倍体であり、*G.hirsutum*、*G.barbadense* 及び *G.lanceolatum* Todaro は 4 倍体である。*G.hirsutum* は 4 倍体であるため、遺伝的不和合により 2 倍体ワタとは交雑できず、*Gossypium* 属の 4 倍体とのみ交雑和合性を示す。これには栽培種である *G.hirsutum*、*G.barbadense*、*G.lanceolatum* Todaro の他、野生種である *G.tomentosum*（ハワイ）、*G.darwinii*（ガラパゴス）、*G.mustelinum*（ブラジル北東部）、*G.hirsutum*、*G.lanceolatum*（熱帯 / 亜熱帯アメリカ）、及び *G.barbadense*（南アメリカ）が含まれる。

また、海外の報告によりワタ（*G.hirsutum*）は自生しないことが確認されており、我が国においてもワタの自生が確認された例はない。

(2) 使用等の歴史及び現状

イ 国外及び国内における第一種使用等の歴史

ワタ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 年頃の綿布片が発掘されており、その繊維はワタ 2 倍体の *G.arboreum* のものであったといわれる。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、4 倍体の *G.barbadense* の種子と原始的織機や織物の破片が発見されている。これらの発見から、古代インド人とペルーのインディオによって別々に

綿から織物を作る技術が開発されていたことがわかる。また、メキシコでは紀元前 5800 年頃の洞窟から 4 倍体の *G.hirsutum* のさくが発掘され、ワタの栽培利用の歴史はきわめて古いことがわかる。

中南米で栽培された *G.hirsutum* は 1700 年前頃メキシコからアメリカ合衆国に入り、内陸部で 1 年生の早生種が栽培された。その後 *G.hirsutum* はアメリカ合衆国の主要作物となったが、南北戦争のために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。

我が国における在来の栽培種は *G.arboreum* であり、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である。その後、16 世紀に入ってから全国的に栽培が広まった。その後、輸入綿におされてしだいに衰微し、第二次世界大戦中および戦後に再び盛んになったが、現在ではその商業的な栽培はなく、わずかに観賞用として作られる程度にすぎない。

ロ 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

現在、工芸作物の中で最大の栽培面積を持つ。2002 年度の世界におけるワタの生産量は 1860 万 t である。世界生産の約 23% を中国が占める。次いで米国（20%）、パキスタン（10%）、インド（9%）、ウズベキスタン（5%）、トルコ（4.2%）、オーストラリア（3.7%）、ブラジル（3.6%）の順である。

2002 年度において、採油用の綿実約 16 万 t 我が国に輸入されている。綿実の輸入先はオーストラリア、米国の順に多い。また、綿実油は 2001 年度において 7620 t 輸入され、主な輸入先はオーストラリア（5.8%）、米国（45.2%）である。綿実油粕の輸入は 3379 t であり、主な輸入先はオーストラリア（45%）、中国（34%）、米国（21%）の順であった。

栽培方法に関しては、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。我が国では 5 月上・中旬が播種の適期で、これより遅れると着蕾、開花が遅れて減収する。我が国のように生育期間が短いところでは少ない肥料での密植栽培が多収であるとされ、陸地綿では 600 本/a くらいとするのが標準である。

ワタは工芸作物の中でも最も重要な位置を占めている。ワタの主な用途はその繊維利用であり、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。

（3）生理学的及び生態学的特長

イ 基本的特性

ワタ（*G.hirsutum*）は一年生の短日植物であり、一般的に自家受粉植物である。

ロ 生育又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽の最低温度は 12℃、最適温度は 27℃～36℃ である。また、生育初期の温度は 24℃～30℃、後期ではさらに高温が良いとされる。さらに、無霜期間が 180～200 日以上、雨量は年間 500mm 以上、生育期間の 40%以上の晴天日が必要である。ワタは酸性に弱い、アルカリ性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いものに属しており、塩分の多いアルカリ性土壌で栽培可能である。

ハ 繁殖性又は増殖の様式

種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

さくは 3～5 室に分かれており、1 室に 7～8 個の種子を含んでいる。さくは、発育にともない水分が減少し、さく皮が裂けて開じょし、種子が散布される。ワタの種子は地毛が絡み合っていて分離しにくく、種子の脱粒性は低いものと考えられる。また、種子の休眠性は浅く、高湿度条件下での寿命は短いとされている。

栄養繁殖の様式、自然条件において植物体を再生しうる組織及び発芽特性
ワタが自然界で植物体を再生しうる組織は種子のみである。

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
ワタは一般的に自家受粉植物と考えられる。

ワタの花粉は重く粘性があるため、風で花粉が運ばれることは殆どない。また、訪花昆虫により他家受粉するが、その割合は低く、訪花昆虫による他家受粉率は 6～25% であると報告されている。

G.hirsutum は 4 倍体のワタであるため、遺伝的不和合により 2 倍体のワタとは交雑できず、*Gossypium* 属の 4 倍体とのみ交雑和合性を示す。*G.hirsutum* と交雑可能な近縁野生種としては、4 倍体ワタである *G.tomentosum* (ハワイ)、*G.darwinii* (ガラパゴス)、*G.mustelinum* (ブラジル北東部)、*G.lanceolatum* (熱帯・亜熱帯アメリカ)、及び *G.barbadense* (南アメリカ) があげられる。我が国において、これらの自生は報告されていない。なお、我が国における在来の栽培種である *G.arboreum* は 2 倍体であり、*G.hirsutum* とは交雑はできない。

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 1 花からおよそ 35000 個の花粉を生産する。

ワタの花粉は大型 (120～200 μm) で重く粘性がある。また、とげの多い形状をしている。

ワタ花粉の重く粘性があるという特徴のため、自然界における他家受粉は風媒によって起こる可能性は低く、虫媒によって起こる。ワタにとってはハチが最も重要

な花粉媒介者である。

放飼昆虫を用いた異種交配試験により、12mを超えると明らかな花粉移動は見られないという報告がある。よって、花粉の飛散距離は短いと考えられる。

また、花粉の寿命は12時間程度である。

二 有害物質の産生性

他感物質等の野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質の産生は知られていない。

ホ その他の情報

ワタはゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸を産生することが知られている。

ゴシポールは多くの *Gossypium* 属植物に通常認められるテルペン類であり、腺組織に存在する。食欲減退、体重減少、消化不良のような毒性の問題を引き起こすため、綿実の食品や飼料中のゴシポール濃度を最小限に抑える必要がある。ゴシポールは種子全体に遊離した形と、アミノ酸のリシン又は他の成分に結合した形で存在する。結合型のゴシポールは体内で消化されずそのまま排出されるので、動物には無害だと考えられているが、遊離型のゴシポールは有害性が高い。

また、ステルクリン酸 (C-19) やマルバリニン酸 (C-18) などのシクロプロペン脂肪酸 (綿実油の中に0.1~1.3%) はワタに通常存在する独特の脂肪酸である。ステルクリン酸やマルバリニン酸はそれぞれ18と17の炭素鎖長を持ち、プロペン環に1個の2重結合を含む。シクロプロペン脂肪酸のレベルは食品や飼料において有害効果を生じるため最小にしなければならない。このシクロプロペン脂肪酸はステアリン酸からオレイン酸への不飽和化を阻害し、その結果細胞膜の浸透性が変化する。ステルクリン酸を(25mg/日)で産卵鶏に摂取させると卵がピンク色になってしまう。これらの脂肪酸は水素添加や230~235 °Cでの脱臭時に不活性化または油から除去される。

しかし、綿実は大量の繊維に覆われているために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は避けられると思われる。また、野生の哺乳動物が綿実を捕食するという例も報告されていない。従って、ゴシポール及びシクロプロペン脂肪酸は他感物質等の野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす物質ではないと考えられる。

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

除草剤グルホシネート耐性ワタ (*bar*, *Gossypium hirsutum* L.) (以下、LLCotton25 とする。) の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表1に示した。

表1 LLCotton25 の導入に使用された DNA

構成要素 (略語)	ベクター上 での位置	サイズ (bp)	由来及び機能
<i>bar</i> 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。
改変型 <i>bar</i>	1635-2186	552	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> 由来の bialaphos resistance (<i>bar</i>) 遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する。野生型 <i>bar</i> 遺伝子の N-末端の2つのコドンは ATG と GAC にそれぞれ置換されている。
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。
その他			
RB	198-222	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界反復配列。
LB	2520-2544	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界反復配列。
<i>aadA</i>	2544-4618	2075	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を含む配列。
p VS1ori	4619-8389	3780	<i>Pseudomonas</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点。
ColE1	8390-9555	1165	プラスミド pBR322 由来の複製起点 ColE1 ori を含む配列。

Streptomyces hygroscopicus から得た野生型の *bar* 遺伝子は、植物にはあまり見られない多量の G:C (グアニン:シトシン) を含むため、植物で使用されるコドンに適合するように GTG ATG に、また、翻訳の効率を上げるために AGC GAC に改変した。GTG ATG の改変では実際に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 の改変により、セリンからアスパラギン酸に変化している。

□ 構成要素の機能

供与核酸の構成要素それぞれの機能

LLCotton25 の作出に用いられた供与核酸の構成要素それぞれの機能は、表1 (p.6) に示した。

目的遺伝子等の発現により生産されるタンパク質の機能及びアレルギー性

作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、作物は枯死に至る。

導入された改変型 *bar* 遺伝子がコードするホスフィノトリシン・アセチル基転移酵素 (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への阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても作物が枯死しない (図 1, p.8)。

グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質を過剰の各種アミノ酸の存在下においても、グルホシネートに対するアセチル基転移反応は阻害されることはなかった。また、特に構造が類似しているグルタミン酸やメチオニン スルホキシイミンなどにも転移反応を触媒しないことが確認されている。これらのことから、PAT 蛋白質が高い基質特異性を有することが示唆された。

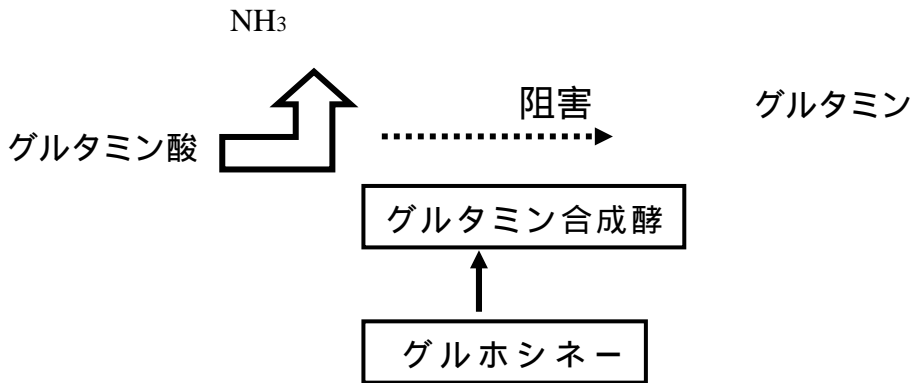
また、改変型 *bar* 遺伝子産物のアミノ酸配列に基づき、包括的な相同性検索 (Swiss Prot, trEMBL, GeneSeq-Prot, PIR, PDB, DAD, GenPept) 及びアレルゲンエピトープ検索を行った。その結果、本蛋白質は既知の毒素及びアレルゲンとの相同性は示さなかった。よって、本蛋白質はアレルギー性を有さないことが示唆された。

遺伝子産物の代謝経路への影響

PAT 蛋白質は極めて高い基質特異性を有しており、植物中において基質となる蛋白質はグルホシネートの他には存在しない。したがって PAT 蛋白質が宿主の代謝経路に影響を与えることはないと考えられる。

a) 通常の植物

除草剤グルホシネートによってグルタミン合成酵素が阻害されるためにアンモニアが蓄積し植物は枯死する。



b) 組換え体植物

PAT蛋白質により除草剤グルホシネートがアセチル化されN-アセチルグルホシネートになることによってグルタミン合成酵素は阻害されないようになり、アンモニアが蓄積されず植物は成長を続けることができる。

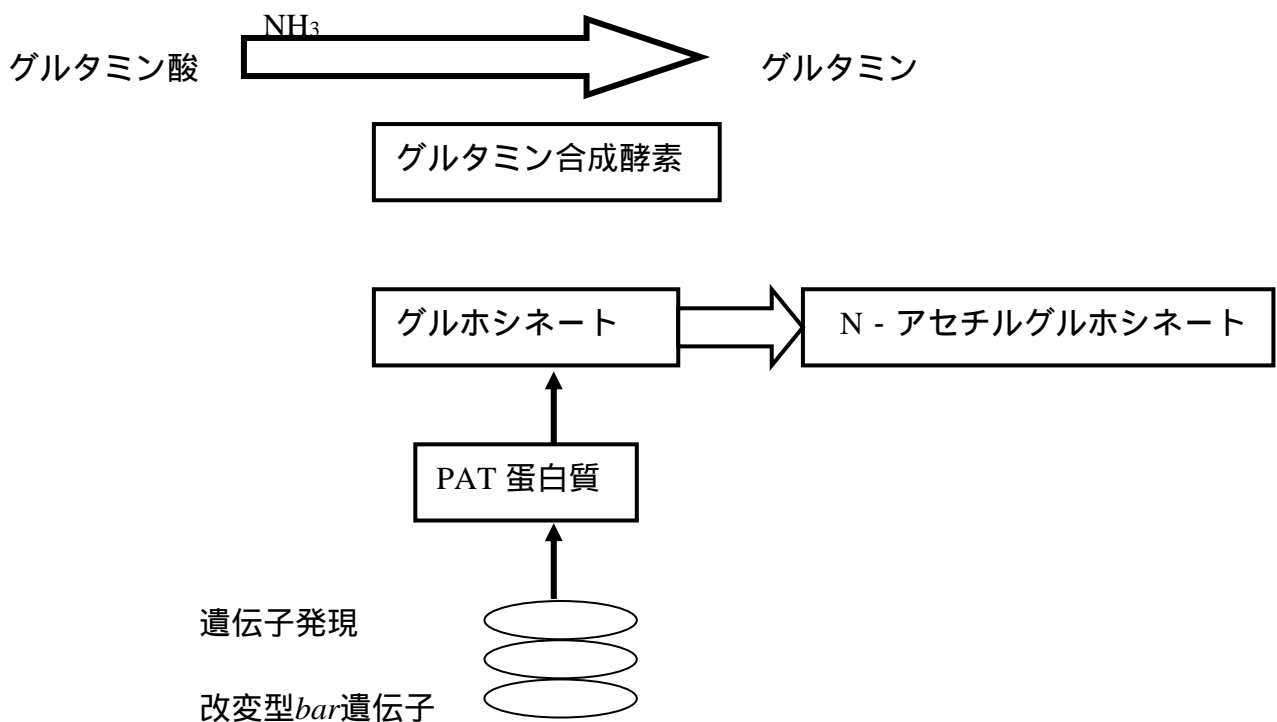


図1 改変型 *bar* 遺伝子産物による除草剤グルホシネート耐性のメカニズム

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

LLCotton25 の作出に用いたプラスミドベクター pGSV71 は、大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pBR322 及び緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 由来のプラスミドベクター pVS1 をもとに構築された。

ロ 特性

ベクターの塩基数及び塩基配列

プラスミド地図を図 2 に示した。LLCotton25 の作出に用いたプラスミドベクター pGSV71 の塩基数は 9555bp である。このうち、ベクターは T-DNA 領域 (図 2 の RB の終わり 198bp から、LB の始まりである 2544bp まで) を除く部分である (ベクター内の各構成要素の位置については表 1 (p.6) を参照)。

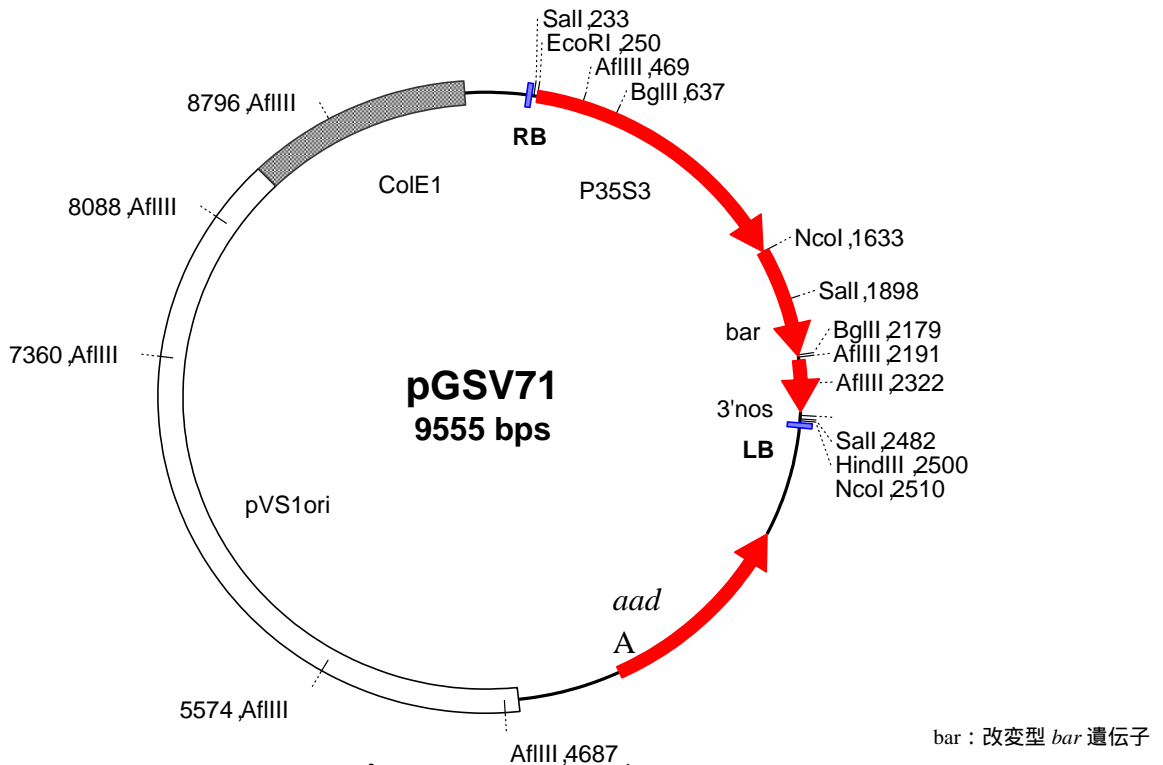


図 2 pGSV71 プラスミド地図及び制限酵素切断部位

特定の機能を有する塩基配列の有無及びその機能

プラスミド pGSV71 はストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する選択マーカー遺伝子 (大腸菌由来 *aadA* 遺伝子) を持つ。*aadA* 遺伝子は、大腸菌を用いて形質転換用プラスミド pGSV71 を構築する際に選択マーカーとして用いられたもので、この遺伝子は植物で機能するプロモーターを持たないため、植物での発現は考えられない。また、*aadA* 遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置しており (図 2, p.9)、植物体内には導入されないと考えられる。

さらに、プラスミド pGSV71 は大腸菌のプラスミド pBR322 由来複製起点 ColE1ori 及び緑膿菌のプラスミドベクター pVS1 の複製起点 pVS1ori を有するが、これらはそれぞれ大腸菌および緑膿菌において自立的複製を行わせる機能を有するが、植物中においては機能しない。これらの複製起点は T-DNA 領域の外側に位置しており(図 2, p.9)、植物体内には導入されないと考えられる。

ベクターの感染性の有無及び宿主域に関する情報
プラスミド pGSV71 は、自律増殖可能な宿主域が、大腸菌と *A.tumefaciens* など数種のグラム陰性菌に限られている。

(3) 遺伝子組換え植物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

LLCotton25 の作出には、ベクターの RB と LB の間に除草剤グルホシネート耐性形質を宿主内に付与するための改変型 *bar* 遺伝子発現カセット (P35S-改変型 *bar*-3'nos) を組み込んだプラスミドベクター pGSV71 を用いている。ベクター内の供与核酸の構成要素の位置及び方向並びに制限酵素切断部位については図 2 (p.9) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド pGSV71 の宿主への遺伝子導入には *A.tumefaciens* を利用したバイナリーベクター法を用いた。Coker312 品種の幼体から切除した組織片(胚軸から幼根までの領域)を Ti プラスミド pGV3000 とバイナリーベクター pGSV71 を含む *A.tumefaciens* の培養液に曝露して感染させ、プラスミド pGSV71 上にある RB 及び LB で挟まれた T-DNA 領域をワタゲノムに組み込ませた。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

核酸が移入された細胞の選抜方法

再生培地に移して組織片を完全な植物体まで再生させ、さらにグルホシネートを含む再生培地を用いてグルホシネート耐性株を選抜した。

アグロバクテリウム菌体の残存の有無

アグロバクテリウム菌体は 500mg/L claforan を加えた再生培地によって除去されている。したがって、アグロバクテリウム菌体は残存していない。

育成の経過及び系統樹

LLCotton25 を自家交配及び弊社保有の品種と交配し、選抜育種を行った。

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

イ 移入された核酸の複製物が存在する場所

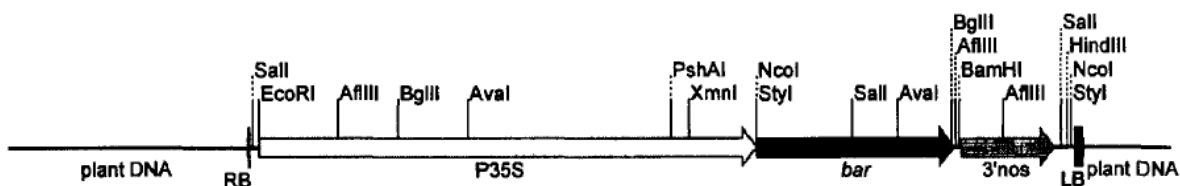
移入された DNA は、一旦植物染色体に組み込まれると、他の植物遺伝子と同様にメンデル遺伝の法則に従う。

LLCotton25 系統の改変型 *bar* 遺伝子をヘテロで有する個体を自家交配、また、非組換え体との戻し交配によって得られた後代個体について、その分離特性を調べた結果、メンデル遺伝の法則に従った単一優性の分離パターンであるそれぞれ 3:1、また、1:1 の分離比を示した。よって、移入された核酸は一染色体上に位置すると考えられた。

ロ コピー数及び複数世代における伝達の安定性

LLCotton25 に挿入された DNA のコピー数を調べるため LLCotton25 のゲノム DNA を制限酵素 *Sal*、*EcoR*、*Afl*、*Bgl* 及び *Nco* で切断後、全 T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行い、ハイブリダイズした各種制限酵素処理断片を解析した。その結果、遺伝子カセットの完全な 1 コピーが植物ゲノムに組み込まれていることが示された。また、PCR 解析によって挿入 DNA の境界領域を詳細に調べた結果、LLCotton25 に T-DNA 領域が図 3 (p.12) に図示したような形で組み込まれたことが考えられた。

また、LLCotton25 の複数世代及び異なる遺伝的背景である複数品種における挿入 DNA の安定性を調べるために、挿入 DNA 中に 2 つの切断部位をもつ制限酵素 *Nco* によって切断し、上記の T-DNA 領域をプローブとして用いてサザンブロット分析を行った。本試験に用いた個体は、LLCotton25 (T4 世代)、LLCotton25 (T5 世代) 及び LLCotton25/A (T1 世代に品種 A を 3 回戻し交配し、さらに 3 回自家交配した品種) である。尚、それぞれの世代について 20 以上の個体を用いた。その結果、全ての試験サンプルにおいて、予測された 2 つのバンドが確認され、複数世代にわたるゲノムレベルでの LLCotton25 の安定性が確認された。



bar : 改変型 *bar* 遺伝子

図 3 T-DNA 領域構成図

ハ 自然条件下における発現の安定性

自然条件下での導入遺伝子発現の安定性を確認するため、LLCotton25 と非組換え体の各 5 個体に除草剤グルホシネートを散布し、その経過を観察した結果、LLCotton25 の全個体で耐性を示し、非組換え体は全て枯死した。また、2000 年及び 2001 年に米国で LLCotton25 の T5 世代と T6 世代における除草剤グルホシネート耐性が調べられ

ており、世代を経ても安定して導入遺伝子が発現していることが確認された。

また、LLCotton25 の種子、リント皮及び綿毛の PAT 蛋白質を ELISA によって測定した。その結果、PAT 蛋白質は種子、リント皮及び綿毛の全てにおいて検出された。これらのことは、改変型 *bar* 遺伝子が 35S プロモーターの働きにより、各組織で構成的に発現することを示唆している。

二 移入された核酸の野生動植物に対する伝達性の有無及び程度

プラスミド pGSV71 は、自律増殖可能な宿主域が、大腸菌と *A.tumefaciens* など数種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

LLCotton25 に挿入された DNA 及び周辺ゲノム配列を利用したそれぞれ 20mer と 21mer のプライマー対を用いた PCR 法によって、本イベントを特異的に識別することができる。また、通常 50ng のテンプレート DNA を用いることで効率的に検出できる。LLCotton25 の種子や植物体が極少量あれば検出及び識別は可能であり、反復試験において高い再現性のある結果が得られている。尚、本 PCR 法は実際の LLCotton25 の種子の純度検定においても有効に使用されている。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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内容

LLCotton25 は、挿入された改変型 *bar* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質が産生され、除草剤グルホシネートに耐性を示す。隔離ほ場試験で行われた除草剤に対する感受性の試験において、非組換え体が 100% の感受性を示したのに対し、LLCotton25 は 100% が除草剤に耐性を示し、本蛋白質の特性が示された。

ロ 遺伝子組換え作物と宿主の種との相違

2003 年度に独立行政法人 農業技術研究機構 九州沖縄農業研究センターにおいて隔離ほ場試験を行い、LLCotton25 (T5 世代) と非組換え体との相違を検討した。

なお、参考として米国で 2000 年に行った LLCotton25 (T5 世代) と非組換え体の比較試験、2001 年に行った LLCotton25 (T6 世代) 遺伝的背景の異なる 5 種類の商業品種に LLCotton25 の形質を付与した品種 (BC3/F3 又は BC3/F4) 及びそれぞれの非組換え対照品種との比較試験、さらに 2001 年にフランス国で行った繁殖性試験 (T5 世代) の結果についても添付し、必要に応じて引用することとした。

形態及び生育の特性

形態及び生育の特性として、LLCotton25 と非組換え体の間で、1.発芽特性 (発芽揃い・発芽率) 2.植物体特性 (草型・草丈・総分枝数・節数) 3.葉形態 (葉形・葉の大きさ) 4.花器形態 (花色・花の形状及び花弁色) 5.開花特性 (開花日・

着蕾数) 6.さく形態(さく(果実)の形状・さくの大きさ・さく当たりの室数及び種子数) 7.開じょ特性(開じょ期・繊維色(綿毛色)・種子の色及び形状・収穫期)及び8.収穫期の最終形態(1株当たりの収穫さく数・未収穫さく数及び総さく数・1さく当たりの新鮮重量・収穫期における地上部及び地下部の重量)について比較した。

その結果、草丈及び節数を除くいずれの形質についてもLLCotton25と非組換え体との間で有意差は確認されなかった。

草丈については、播種後60日目においてのみ有意差が認められ、LLCotton25が非組換え体に比べて平均で約6cm低い値を示したが、その他の時期(播種後30日、90日、120日)において有意差は認められなかった。

節数については、播種後60日目ではLLCotton25が非組換え体に比べて平均で0.6多く、120日目では非組換え体の方がLLCotton25に比べて平均で1.7多く、一定した傾向は認められず、また、播種後30日目及び90日目では有意差は認められなかった。

また、1株当たり未収穫さく数、1株当たり総さく数、収穫時における地上部重及び地下部重については、平均値においてLLCotton25の方が非組換え体に比べて高い数値を示す傾向にあったが、個体間及び反復間でバラツキの大きい結果となり、LLCotton25と非組換え体との間に有意差は検出できなかった。このバラツキの原因としては、隔離試験ほ場の立地条件等から、試験個体ごとの栽培条件が必ずしも均一でなかった可能性が考えられた。

なお、参考ではあるが、米国において2000年及び2001年にはほ場栽培試験が実施されている。これらの試験結果から、2000年の試験において第一開花日及び2001年の試験において株立ち率に有意差が確認されたが、それ以外の形質においてはいずれも有意差は確認されなかった。

生育初期における低温耐性

LLCotton25の幼植物(本葉2葉期)20個体を4・12時間日長の人工気象器内に搬入し、経時的に低温に対する反応を調査した結果、搬入6日後には全個体が枯死し、低温耐性は認められなかった。

成体の越冬性

隔離ほ場の露地ほ場で栽培したLLCotton25の成体は、12月下旬までの低温及び降霜で完全に枯死し、成体の越冬性は認められなかった。

花粉の稔性及びサイズ

我が国では本項目の試験は行っていない。なお、2001年にフランスで行われた栽培試験では、温室で栽培されたLLCotton25及び非組換え体から得られた花粉の生存率及び花粉発芽率の調査、花粉及び発芽した花粉の形態の顕微鏡観察が行なわれている。

花粉の生存率及び発芽率において有意差は認められなかった。また、花粉の直径はどちらも平均200µmで相違はなく、発芽した花粉の形状にも相違は認められなかった。

種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

2003年度に我が国の隔離ほ場試験において、種子の生産量に関する形質として、さくの大さ、さく当たりの室数、さく当たりの種子数、種子の形状、1さく新鮮重量、1株当たり未収穫さく数、1株当たり収穫さく数及び1株当たり総さく数の調査を行ったが、いずれの形質においてもLLCotton25と非組換え体との間で有意差は確認されなかった。なお、1株当たり未収穫さく数及び総さく数については、「形態及び生育特性」にも記した通り、個体間及び反復間でのバラツキが大きい試験結果となり、LLCotton25と非組換え体との間で有意差は検出できなかった。

なお、米国での栽培試験において、1株当たり未収穫さく数及び総さく数に関連する形質としては、さく保持率（総さく数/総結果枝数）、1株当たり総種子数及び実綿収量が調査されているが、いずれの形質についてもLLCotton25と非組換え体との間に有意差は認められなかった。

脱粒性に関してはワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくく、種子の脱粒性は低いものと考えられる。隔離ほ場において、LLCotton25と非組換え体の開じょ特性を比較した結果、開じょ期、その進行の程度にLLCotton25と非組換え体に相違はなかった。また、開じょしたLLCotton25のさくの綿毛の写真から、非組換え体と同様に地毛が絡みあっていて分離しにくいことが認められた。従って、LLCotton25の脱粒性は非組換え体と同等であると考えられる。

休眠性に関して、現在のワタ栽培品種は深い休眠性を有していないと報告されている。また、一般的にワタの播種において休眠打破は必ずしも必要ではないが、時々発芽率を上昇させるために低温処理が行われることがある。LLCotton25の休眠性及び発芽率については、自然交雑率を調べるために隔離ほ場で栽培したLLCotton25及び非組換え体から種子を9月中旬に採取し、10月20日に隔離ほ場内に設置した小型ビニルハウス内に播種した結果、どちらも全て発芽した。また、生育初期の低温耐性を調査するために同様に隔離ほ場で栽培したLLCotton25から9月中旬に採取した種子を11月4日に隔離ほ場内に設置した小型ビニルハウス内でポットに播種したところ、全て容易に発芽した。これらのことから、LLCotton25は非組換え体と同様に種子の休眠性は浅く、発芽率においてもLLCotton25と非組換え体は同等であると考えられる。

交雑率

開花期後半に達した9月中旬に、LLCotton25と1m離れて栽培されている非組換え体（30個体）から任意に180粒の種子を選び、さらにLLCotton25（12個体）から任意に20粒の種子を採取し、そのまま室温にて保存した。それらの種子をビニルハウス内に播種し、本葉2葉期に除草剤グルホシネートを散布し、その生存率を調査した。その結果、LLCotton25由来の採取個体では薬害が見られなかったのに対し、非組換え体由来の採取個体は全てが枯死したことから、本試験の範囲では交雑が生じた可能性は認められなかった。尚、開花期において、LLCotton25及び非組換え体

に花粉を媒介する可能性のある昆虫であるイチモンジセセリ (*Parnara guttata*)、シロオビノメイガ (*Hymenia recurvalis*) が訪花していることが確認された。

有害物質の産生性

LLCotton25 の有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を調べるため、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては鋤込み法による試験、根から分泌され土壌微生物に影響を与えるものについては土壌微生物相試験により LLCotton25 と非組換え体とを比較した。

後作試験： LLCotton25 と非組換え体の栽培ほ場の土壌を作物収穫後に採取し、篩にかけて植物体の残さを除き育苗ポットに充填した。そこにハツカダイコンの種子を播種して栽培し、発芽数・発芽率・草高・根長及び地上部重を比較した結果、系統間に有意な差は認められなかった。

植物体の鋤込み試験： LLCotton25 及び非組換え体の植物体乾燥粉末を 0.5% 混和した野菜セル苗用培土それぞれに、ハツカダイコンの種子を播種して栽培し、発芽数・発芽率・草高・根長及び地上部重を比較した結果、系統間に有意な差は認められなかった。

土壌微生物相試験： 植付け前、生育期及び収穫期に LLCotton25 栽培区及び非組換え体栽培区よりそれぞれ表層土を採取し、5℃ で保存して適宜実験に供した。また、側根の微生物相の調査には、収穫期の作物体を用いた。調査項目は、ルシフェリン - ルシフェラーゼ反応法による ATP バイオマス、希釈平板法による生菌数 (肉汁培地及び希釈肉汁培地による計数地より)、放線菌数 (希釈肉汁培地による計数值より)、糸状菌胞子数 (ローズベンガル培地による計数值より)、蛍光性シュードモナス数 (加藤の P-1 培地による計数值より) とした。調査結果は各区の 3 反復の平均値で有意差を検定した。その結果、いずれにおいても LLCotton25 と非組換え体との間で有意差は認められなかった。

以上の結果から、有害物質の産生性に関して、LLCotton25 と非組換え体は同等であると考えられる。

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) 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) 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

2003 年度に独立行政法人 農業技術研究機構 九州沖縄農業研究センターにおいて隔離ほ場試験を行った。

(4) 国外における使用等に関する情報

国外における使用等に関する情報を表 2 に示した。また、規制解除申請の際に米国農務省 (USDA) に提出した資料に基づき作成された資料を添付する。尚、LLCotton25 の栽培方法、使用方法及び貯蔵方法については、従来の方の場合と相違はない。

表 2 . 国外における使用等に関する状況

国名	承認機関	承認時期	承認内容
米国	米国農務省	2002 年 3 月	無規制裁培
	米国食品医薬品局	2003 年 4 月	食品及び飼料安全

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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、自生が確認された例はなく、雑草及び帰化植物としての報告もない。尚、我が国において現在では在来の栽培種である *G.arboreum* の商業的栽培はなく、僅かに観賞用として作られる程度に過ぎない。また、*G.hirsutum* の商業的な栽培も行われていない。

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

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及び成体の越冬性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について、LLCotton25 と非組換え体を比較した。

形態及び生育、及び種子の生産量の特性として、2003 年度に我が国で行った隔離ほ場試験では 25 項目【発芽揃い・発芽率・草型・草丈・総分枝数・節数・葉形・葉の大きさ・花色・花の形状及び花弁色・開花日・着蕾数・さく（果実）の形状・さくの大きさ・さく当たりの室数・さく当たりの室数種子数・開じょ期・繊維色（綿毛色）・種子の色及び形状・収穫期・1 株当たりの収穫さく数・未収穫さく数・総さく数・1 さく当たりの新鮮重量・収穫期における地上部及び地下部の重量】について比較した。

その結果、LLCotton25 と非組換え体との間で有意差が確認されたのは、播種後 60 日目の草丈及び播種後 60 日目と 120 日目の節数であったが、草丈及び節数で認められた有意差は、いずれも生育期の一時期に認められたものであり、この差異のみで競合における優位性が高まることは考えられなかった。

また、1 株当たり未収穫さく数、1 株当たり総さく数、収穫時における地上部重及び地下部重については、平均値において LLCotton25 の方が非組換え体に比べて高い数値を示す傾向があったが、個体間及び反復間でバラツキが大きい結果となり、LLCotton25 と非組換え体の間で有意差を検定することはできなかった。

なお、2000 年及び 2001 年に米国においてもほ場栽培試験が実施されており、株立ち率、草勢、草型、草高、草高：総節数比、仮軸長、第一開花日、第一開じょ日、50% 開じょ日、開じょ率、綿毛含量、実綿収量、綿毛収量、さく保持率（総さく数/総結果枝数）、さく当たり種子数、種子の指標（平均百粒重）、第一結果枝の節数、第一結果枝のさく数、総節数、1 株当たりの総種子数について調査した結果、2000 年の試験における第一開花日及び 2001 年の試験における株立ち率にのみ有意差が確認されたが、この差異のみで競合における優位性が高まることは考えられず、他の全ての項目において有意差は認められなかった。

また、隔離ほ場において、成体の越冬性、種子の脱粒性、種子の休眠性及び発芽率、生育初期の低温耐性を調査した。その結果、LLCotton25 には成体での越冬性は認められず、また、調査した収穫種子は全て発芽したことから、種子の休眠性も浅いと考

えられた。さらに、生育初期の低温耐性が非組換え体と同様に低いことから、こぼれ落ちた種子が発芽しても、越冬して自生化することは考えられなかった。

また、LLCotton25 は、導入された改変型 *bar* 遺伝子の発現により除草剤グルホシネートに耐性を示す。しかし、除草剤グルホシネートが頻繁に散布されることのない我が国の自然環境下では、この形質を有することが競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

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が生ずるおそれはないと判断した。

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

ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

有害物質の産生性に関して、根から分泌され他の植物に影響を与えるものについては後作試験、植物体が内部に有し、枯死した後に他の植物に影響を与えるものについては鋤込み法による試験、根から分泌され土壤微生物に影響を与えるものについては希釈平板法等の土壤微生物相試験により LLCotton25 と非組換え体を比較したが、いずれにおいても両者の間には有意差は認められなかった。

LLCotton25 は改変型 *bar* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質を産生する。しかし、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しているため、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。したがって、PAT 蛋白質が宿主の代謝系においてアセチル基を転移し、有害物質を産生することはないと考えられ

る。

また、改変型 *bar* 遺伝子産物のアミノ酸配列について、包括的な相同性検索（Swiss Prot, trEMBL, GeneSeq-Prot, PIR, PDB, DAD, GenPept）及びアレルゲンエピトープ検索を行った結果、本蛋白質は既知の毒素及びアレルゲンとの有意な相同性は示さなかった。したがって、PAT 蛋白質が有害物質として、野生動植物等に影響を及ぼすことはないと考えられた。

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が生ずるおそれはないと判断した。

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

これまでに、我が国において *G.hirsutum* の自生は報告されておらず、更に、我が国において *G.hirsutum* と交雑可能な近縁種の自生も報告されていない。LLCotton25 の栽培の予定はなく、唯一、綿実の輸入港での荷揚げ、搾油工場等への輸送過程、飼料利用中にこぼれ落ちたとしても発芽に適した土の部分に落ちた場合のみ生育する可能性があるが、仮に生育したとしても休眠性は浅くや越冬性は認められないので自生化することは考えにくい。尚、我が国における在来の栽培種である *G.arboreum* は 2 倍体のワタであるため、*G.hirsutum* と交雑することは考えにくい。

以上のことから、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）影響の具体的な内容の評価

(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が生ずるおそれはないと判断した。

4 その他

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 LLCotton25の性質はないと判断した。

第三 生物多様性影響の総合的評価

ワタは我が国において長期にわたる使用等の実績があるが、自生が確認された例はなく、雑草及び帰化植物としての報告もない。尚、我が国において現在では在来の栽培種である *G.arboreum* の商業的栽培はなく、僅かに観賞用として作られる程度に過ぎない。また、*G.hirsutum* の商業的な栽培も行われていない。

競合における優位性に関する形質として、形態及び生育の特性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、種子の生産量、種子の脱粒性及び種子の休眠性及び発芽率について、2003年度に我が国において隔離ほ場試験を行い、LLCotton25 と非組換え体を比較した。その結果、形態及び生育の特性の草丈及び節数において有意差が確認されたが、これは経時観察により一時期においてのみ認められたものであることから、競合における優位性を高めるものとは考えられなかった。また、1株当たり未収穫さく数、1株当たり総さく数、収穫時における地上部重及び地下部重については、平均値において LLCotton25 の方が非組換え体に比べて高い数値を示す傾向があったが、個体間及び反復間でバラツキが大きい結果となり、LLCotton25 と非組換え体の間で有意差を検出することはできなかった。なお、米国において行われたさく保持率、1株当たり総種子数及び実綿収量に関する試験においては、LLCotton25 と非組換え体の間に有意差は認められなかった。

また、LLCotton25 は生育初期の低温耐性、成体の越冬性を有しておらず、種子の脱粒性、休眠性及び発芽率のいずれについても非組換え体と同等であったことから、こぼれ落ちた種子が発芽しても、越冬して自生化することは考えられなかった。

LLCotton25 は除草剤グルホシネートに耐性を示すが、この形質は除草剤グルホシネートが頻繁に散布されている環境下においてのみ生存に優位に作用し、通常 of 自然環境下ではこの形質が優位に作用することはないと考えられた。

以上から、競合における優位性に起因して、生物多様性影響を生ずるおそれはないと考えられた。

有害物質の産生性に関して、後作試験、植物体の鋤込み法による試験及び土壌微生物相への影響試験を行った結果、LLCotton25 と非組換え体との間に差異は認められなかった。

また、LLCotton25 は改変型 *bar* 遺伝子の発現により PAT 蛋白質を産生するが、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有しているため、宿主の代謝系においてアセチル基を転移し、新たに有害物質を産生するとは考えられない。

更に、改変型 *bar* 遺伝子産物は既知の毒素及びアレルゲンとの有意な相同性は示さなかった。したがって、PAT 蛋白質が有害物質を産生し、自然環境下において野生動植物等に影響を及ぼすとは考えられない。

以上から、有害物質の産生性に起因して、生物多様性影響が生ずるおそれはないと考えられた。

我が国において LLCotton25 の栽培の予定はなく、ワタ(*G.hirsutum*)と交雑可能な近縁野生種は報告されていない。従って、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考えられた。

以上から、総合的評価として、LLCotton25 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がないと判断した。

緊急措置計画書（食用、飼料用に供する場合）

平成 16年6月10日

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 ローレンス ユー
住所 東京都港区高輪4-10-8

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グルホシネート耐性ワタ(*bar, Gossypium hirsutum* L.)、(LLCotton25, OECD UI: ACS-GH001-3)(以下、LLCotton25という)の第一種使用において、もし、生物多様性影響が生じるおそれがあるとリスク評価において確認されたならば、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。尚、生物多様性影響が生じるおそれがあるとリスク評価において確認された場合とは、LLCotton25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

弊社は社内に、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部を速やかに設置する。危機対策本部は、開発本部長を本部長とし、バイオサイエンスグループリーダーを事務局として、広報担当者を含む各部門から構成される。

2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社はLLCotton25穀粒の我が国への輸入業者、我が国においてLLCotton25穀粒を配給した業者、輸入したLLCotton25穀粒の量および時期を可能な限り特定する。

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

確認された明らかな生物多様性影響が生じるおそれに基づいて適切に、弊社は上記2で明らかにしたLLCotton25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LLCotton25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じ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

確認された明確な生物多様性影響が生じるおそれに基づき適切に、弊社は上記2及び3で明らかにした個人や団体に、LLCotton25を不活性化させる措置か、さもなければLLCotton25の環境への放出を防止するための措置、及びすでに環境に放出されたLLCotton25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

科学的に正当性のある評価に基づき、LLCotton25が我が国の生物多様性に影響を与える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。