

**除草剤グリホサート耐性ワタ(*cp4 epsps*、*Gossypium hirsutum* L.)
(MON88913, OECD UI:MON-88913-8)申請書等の概要**

第一種使用規定承認申請書 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 2

1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報 2

(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 4

(1) 供与核酸に関する情報 4

(2) ベクターに関する情報 8

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 8

(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 11

(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 14

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違 14

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 17

(1) 使用等の内容 17

(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 17

(3) 国外における使用等に関する情報 17

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価 18

1 競合における優位性 18

2 有害物質の産生性 19

3 交雑性 20

4 その他の性質 21

第三 生物多様性影響の総合的評価 22

緊急措置計画書 24

第一種使用規程承認申請書

平成 17 年 2 月 18 日

農 林 水 産 大 臣 島 村 宜 伸 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 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
銀座山王ビル 8 階

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	除草剤グリホサート耐性ワタ (<i>cp4 epsps</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.) (MON88913, OECD UI: 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	-

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

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

ワタ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 群に更に分けている(Fryxell, 1984)。また、野生 2 倍体に加え、新大陸に自生する野生 4 倍体種には、*G. tomentosum*(ハワイ)、*G. mustelinum*(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。*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。

尚、わが国において *G. hirsutum* を含め本組換えワタと交雑が可能な *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

ワタ属は 39 種から成るが、このうち栽培種は、旧大陸の「アジア綿」と総称される 2 倍体種(n=13)の *G. herbaceum* と *G. arboreum* 及び、新大陸の「陸地綿」と呼ばれる 4 倍体種(n=26)の *G. hirsutum* と *G. barbadense* である。現在、「アジア綿」は、インド、アフリカ及びアジアの限定された地域で栽培されているのみで、世界で生産されるワタの約 98% は 2 つの「陸地綿」で、その 90% は *G. hirsutum* 種となっている。

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いたったが、その後、外綿の輸入に押されてしだいに衰微した。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。尚、日本で古くから栽培されているのはアジア綿の *G. arboreum* と考えられている。

米国農務省の統計情報に基づくと、2002 年の全世界におけるワタの栽培面積は 2,943 万 ha であり、上位国を挙げるとインドが 760 万 ha、米国が 503 万 ha、中国が 418 万 ha、パキスタンが 280 万 ha となっている。

また、2002 年におけるわが国における綿実の輸入量は約 15 万トンであり、その内の 96% がオーストラリアから輸入された。更に輸入された綿実の内、約 4 万トンが搾油用として用いられ、残りは牛の飼料用として用いられた。尚、わが国では、大阪府の製油会社が唯一、種子を海外から輸入して搾油を行っている。

摘採した実綿には種子がついており、これを繰綿機にかけて分離した綿毛(lint)を綿花あるいは原綿と呼んでいる。綿花は綿糸・綿織物などの製綿用、あるい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綿実で、その表面につく平均 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の副産物として生産され、人造繊維の原料とされ、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綿実油が得られる。綿実 1t から約 130kg の綿実油が得られ、食用油のほかマーガリンや石鹼の原料などとして用いられる。搾油後の綿実粕は精製して主に飼料や肥料として用いられる。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 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 90cm~120cm に伸び、15~20 節を有し、各節に葉と 2 芽をつけ、発育枝と結果枝を生ずる。尚、多年生となるのは基本的に熱帯地方のみで、日本では一年生である。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタは平均気温 25 を最適とし、20~28 に適する。降雨量は年 1,000~1,500mm が適しており、生育期には相当の降雨を必要とする。しかし開花期以降の多雨は落花・落さくを増加させる。また少雨では繰綿歩合が低下する。北米のワタ作地帯は北緯 37~39° であり、北半球では一般に北緯 43° が北限で、ヨーロッパでは 42°、中央アジアでは 44.3° まで分布している。日本では奥羽南端(37.5°)までとされる。土壌は排水良好な砂質壤土に適し、アルカリ土壌に強く酸性を嫌う。また相当塩濃度の高い干拓地にも生育する。

八 繁殖又は増殖の様式

ワタの受粉様式に関しては、他家受粉も可能であることが知られているが、基本的には自家受粉である。ワタの花粉重は比較的重く、粘着性があるため風媒により交雑することは考えにくい。その代わりに、花粉はマルハナバチ(*Bombus* sp.) やミツバチ(*Apis mellifera*)によって媒介されることがある。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ある実験例では、意図的にハチの巣箱を回りに配置したワタ畑から約 45m~60m 離れた花畑でワタの花粉が付着していたのは 1.6%程度であった。また、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。更に遺伝子組換えワタのマーカー遺伝子を用いた交雑率に関する別の実験例に関する別の実験例に関する別の実験例では、30×136mのワタ畑から 1m離れた場所での交雑率は 5%であったのに対して、7m離れた地点では 1%以下に減少していた。しかし 1%以下の交雑率はワタ畑から最も離れた 25mの地点でも散発的に認められた。尚、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。

二 有害物質の産生性

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の生産性は知られていない。

ホ その他の情報

ワタには、ゴッシポールと呼ばれるテルペノイド物質が含まれており、この生理活性物質は種子を含むあらゆる植物組織の分泌器官に存在する。ゴッシポールは哺乳動物の内臓器官や肺に炎症を起こし、実験動物においては呼吸困難、麻痺を起こす毒性物質として知られている。しかし、ゴッシポールは植物から放出され他の生物に阻害的あるいは促進的(共栄的)な何らかの作用を及ぼす他感物質には分類されない。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。尚、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

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性ワタ (*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum*)(MON88913)(以下本組換えワタとする)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は p7 と p8 の表 1 に示した通りである。

尚、本組換えワタに導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列に関しては単離された *Agrobacterium* sp. CP4 株由来のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されており、この改変は N 末端配列側に *NdeI* の制限酵素サイトを付与するために行われた。従って、本組換えワタに挿入された *cp4 epsps* 遺伝子は「改変型 *cp4 epsps* 遺伝子」とし、発現する CP4 EPSPS 蛋白質を「改変型 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。

□ 構成要素の機能

本組換えワタの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は p7 と p8 の表 1 に示した通りである。

目的遺伝子である改変型 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ改変型 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の一つである 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS 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。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変型 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。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するため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、植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸(DAHP)合成酵素によって調節を受けて制御されるが、DAHP からコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、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いる。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グ

グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品及び飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)から、EPSP と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 EPSPS 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が、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

以上のことから、植物 EPSPS 蛋白質と機能的に同一である改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現によって、植物の代謝経路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る。

除草剤グリホサート耐性ワタは、すでに除草剤グリホサート耐性ワタ(*cp4 epsps*, *Gossypium hirsutum* L.) (1445, OECD UI : MON- Ø1445-2) (以降からは、1445 系統とする)が、米国及びオーストラリアで商品化され、ワタ農家に幅広く受け入れられている。しかし、この 1445 系統は、グリホサートを散布できる期間が第 4 葉(節)期までに限られており、必ずしもワタの栽培期間を通じて雑草防除が出来ていた訳ではなかった。そこで、モンサント社は第 2 世代のグリホサート耐性ワタとして本組換えワタを開発した。1445 系統には、*Figwort Mosaic Virus* (FMV) プロモーターによって制御された改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが 1 コピー挿入されていたのに対して、本組換えワタには、それぞれ異なるプロモーターによって制御された 2 つの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットが挿入されている。これら 2 つの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットにより、本組換えワタはグリホサートに対する耐性が全組織中で高まるが、特に生殖器官において高まり、ワタの栽培期間中に新たに発生して収穫時に問題となる雑草防除を目的とした収穫期により近い時期でのグリホサート散布が可能になる。収穫期の雑草が防除できることにより、ワタ農家が機械で大規模収穫する際に混入する雑草による綿毛の汚色を防ぐことができ、より品質の高い綿毛が収穫出来る。実際に本組換えワタと 1445 系統に対して除草剤グリホサートを散布した後に、生殖器官に関する形態(柱頭に付着した花粉数、開薬した割合、花粉稔性、雄しべの長さ、子房を含んだ柱頭の長さ、薬の高さ、花粉の堆積量)を比較した結果、子房を含んだ柱頭の長さを除く全ての項目において統計学的有意差が認められ、生殖器官の除草剤グリホサートに対する耐性度は、明らかに本組換えワタの方が高いことが示された。また、米国 9ヶ所のほ場で、第 3、第 6、第 10 そして第 14 葉期の本組換えワタと 1445 系統にグリホサートを連続して散布した結果、明らかに本組換えワタの収量の方が 1445 系統よりも優れていた。この理由としては、本組換えワタの生

殖器官でのグリホサート耐性能が 1445 系統と比較して高まっており、その結果生育後期(第 4 葉期以降)におけるグリホサート耐性度が高まった為と考えられた。

表 1 発現ベクターPV-GHGT35 の各構成要素

構成要素	由来及び機能
P-FMV/TSF1 により制御される改変型 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-FMV/TSF1	シロイヌナズナ TSF1 プロモーターに <i>Figwort Mosaic Virus</i> (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。目的遺伝子の生殖器官及び栄養器官での恒常的発現に關与する。尚、FMV が属する <i>Caulimovirus</i> 属のウイルスが <i>Gossypium</i> 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	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)。目的遺伝子の発現を高める。
I-TSF1	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。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	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。
CR- <i>cp4 epsps</i> (改変型 <i>cp4 epsps</i>)	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。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	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'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。
P-35S/ACT8 により制御される改変型 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P-35S/ACT8	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。目的遺伝子の栄養器官での恒常的発現に關与する。尚、CaMV が属する <i>Caulimovirus</i> 属のウイルスが <i>Gossypium</i> 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	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。
I-ACT8	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。目的遺伝子の発現を高める。
TS- <i>ctp2</i>	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。
CR- <i>cp4 epsps</i> (改変型 <i>cp4 epsps</i>)	<i>Agrobacterium</i> CP4 菌株由来の 5-エノールピルピルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子。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	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'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。

構成要素	機能及び由来
T-DNA の外骨格構成	
B-Left Border (左側境界配列)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。
OR-ORI V	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、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
CR-rop	<i>E. coli</i> 中でのプラスミドのコピー数の維持の為にプライマータンパク質を抑制するコーディング配列。
OR-ORI-PBR322	pBR322 から単離された複製開始領域であり、 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
CR-aad	大腸菌のトランスポゾン Tn7 に由来するアミノグリコシド アデニルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、スペクチノマイシン或いはストレプトマイシン耐性を付与する。
B-Right Border (右側境界配列)	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(25bp)を含む DNA 断片。右側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium 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。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

本組換えワタの作出に用いられたプラスミド・ベクターPV-GHGT35 は、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pBR322 等から構築された合成プラスミドベクターである。

ロ 特性

本組換えワタの作出に用いられた PV-GHGT35 の塩基数は 13,741bp である。プラスミド・ベクターpBR322 は、大腸菌での構築ベクターの選抜マーカーとしてテトラサイクリン、アンピシリン耐性、DNA 複製開始点 ori 配列を持つ 2 本鎖環状 DNA である。

(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

本組換えワタの作出に用いられたプラスミド・ベクターPV-GHGT35 は、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pBR322 等から構築された合成プラスミド・ベクターであり、その T-DNA 領域は P-FMV/TSF1 キメラプロモーターによって

制御される改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット ([P-FMV/TSF1]-[L-TSF1]-[I-TSF1]-[TS-ctp2]-[CR-*cp4 epsps*]-[T-E9]) と P35S/ACT8 キメラプロモーターによって制御されるもう一つの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット ([P-35S/ACT8]-[L-ACT8]-[I-ACT8]-[TS-ctp2]-[CR-*cp4 epsps*]-[T-E9]) から構成される。

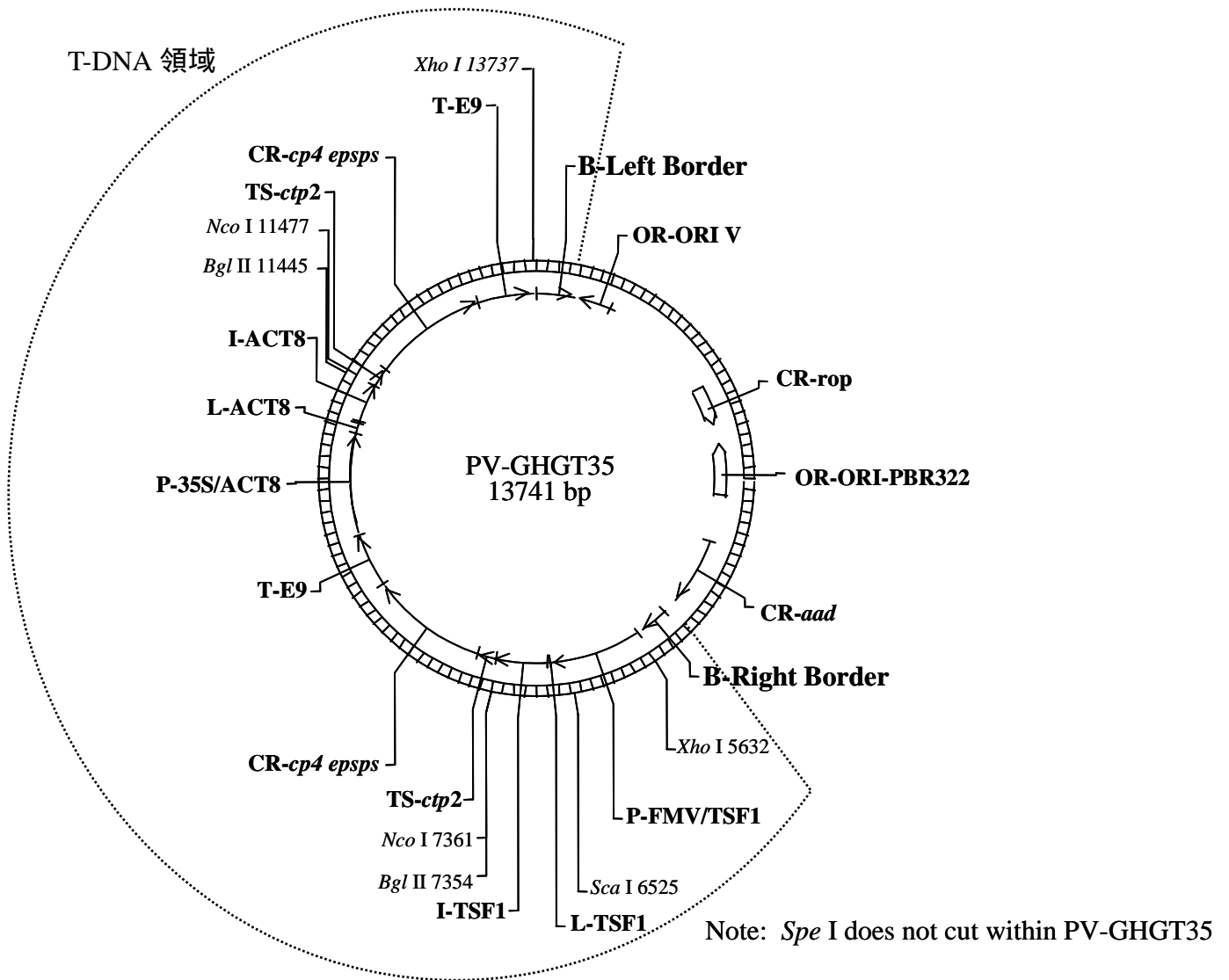


図 1 PV-GHGT35 のプラスミドマップ

□ 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド・ベクターPV-GHGT35 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により 4 倍体栽培ワタ品種 Coker 312 へ導入した。

八 遺伝子組換え生物等の育成の経過

本組換えワタの開発は 1998 年から始まった。アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-GHGT35 中の T-DNA 領域を Coker 312 の組織切片に導入した後、グリホサートを含む培地上で形質転換カルスを選抜して再生個体を得た。この時にアグロバクテリウムの残存が無いことも確認している。得られた再生個体について挿入遺伝子や改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の解析により更に選抜を進め、人工気象室、温室試験を経て、野外圃場での実際のグリホサート耐性及び農業形質などから総合的に判断して本組換えワタの商業化品種が選抜された。

わが国における認可状況は以下の通りである。

- 2004 年 11 月 5 日 農林水産省に飼料利用としての安全性確認の申請を行った。現在審査中である。
- 2005 年 4 月 7 日 厚生労働省より食品利用としての安全性確認がなされた。

(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

染色体上

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

サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、本組換えワタのゲノム中 1 ヶ所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれていることが確認された(図 2)。また、T-DNA 領域以外の外側骨格領域は挿入されておらず、T-DNA 領域内の 2 つの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットも完全な状態で挿入されていた。更に挿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示された。

八.(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

異なる 4 箇所のほ場(アラバマ州、カリフォルニア州、ジョージア州、テキサス州)から採取したサンプルを用いて ELISA 分析により改変型 CP4 EPSPS 蛋白質

の発現量を分析した結果、採取した各組織において改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の発現が確認された。本組換えワタの世代間における改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の発現の安定性に関しては、各世代での除草剤グリホサートに対する耐性能により評価している。

二. ウィ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

プラスミド PV-GHGT35 は、自律増殖可能な宿主域が、*E.coli* と *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。

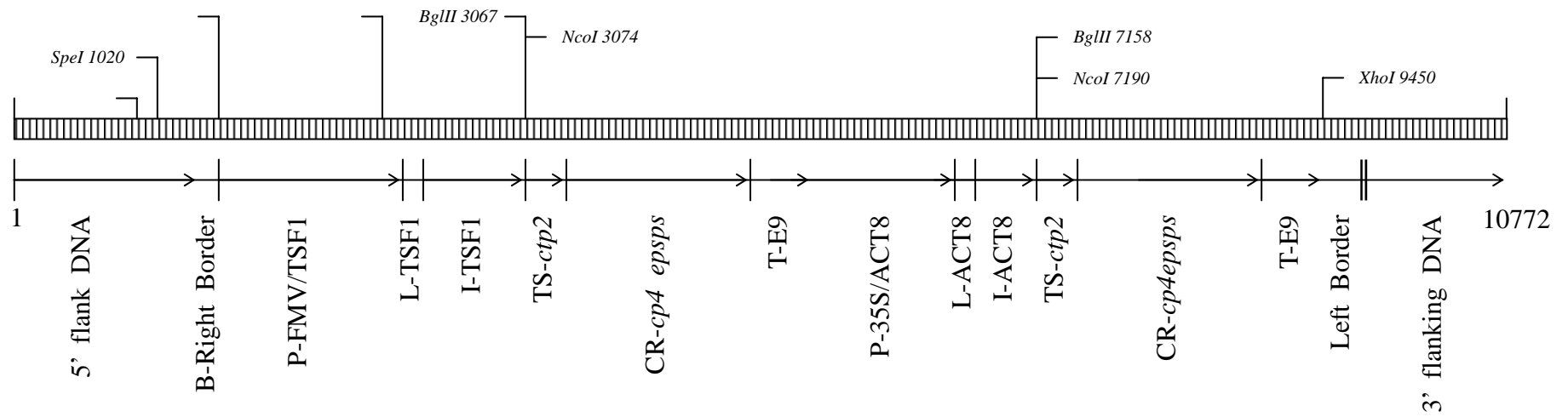


図2 除草剤グリホサート耐性ワタ MON88913 の挿入遺伝子地図

MON88913 系統の挿入遺伝子地図とワタゲノムとの境界領域を示した。

挿入されている各構成要素とサザンブロット分析に用いられた制限酵素部位が、挿入遺伝子地図上に示されている。

(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

本組換えワタを検出及び識別する為の方法としては、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て定性的 PCR 法を開発しており、本法により本組換えワタを特異的に検出可能である。

(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

本組換えワタは、挿入された 改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の発現により改変型 CP4 EPSPS 蛋白質が産生され、除草剤グリホサートに耐性を示す。本隔離ほ場試験で行われた除草剤に対する耐性試験において、対照の Null 型ワタが 100%の感受性を示したのに対して、本組換えワタは 100%が除草剤グリホサートに耐性を示し、改変型 CP4 EPSPS 蛋白質の特性が示された。

ロ. 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

本組換えワタの隔離ほ場試験は、日本モンサント社の河内研究農場の隔離ほ場で、2004年5月から2005年2月まで行われた。尚、本隔離ほ場試験には、本組換えワタの R2 世代の収穫種子(=R3 世代)、また対照の非組換えワタには本組換えワタの育成過程において、R2 世代から改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の分離により得られたグリホサート感受性の Null 型ワタを用いた。対照品種として Null 型ワタを用いた理由としては、ワタは基本的に自殖を繰り返しても遺伝的バックグラウンドを統一することが難しく、収量や草丈などのある程度の形質が揃った時点で品種として登録されるのが一般である為、最も遺伝的バックグラウンドが本組換えワタに近い Null 型ワタを対照品種として用いるのが適当であると判断された為である。尚、Null 型ワタのゲノム中に挿入遺伝子が存在しないことは、サザンブロット分析及び PCR 分析により確認されている。

また、参考として 2002 年に米国の環境条件の異なる 14 箇所の典型的なワタ栽培地域で行ったほ場試験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

18 項目(発芽揃い、発芽率、草型、草丈、開花数、花色、葉形、有効花・さく数、結果枝数、開じょ期、さくの形状、繊維の色、1 個体あたりのさく数、さくの室数、さくあたり種子数、種子の色、さくの重量、収穫期の地上部重及び地下部重)について、本組換えワタ及び対照の Null 型ワタ間の形態特性及び生育の特性における差異を調査した。

その中で、発芽率、草丈、開花数、有効花・さく数、結果枝数、1 個体あたりのさく数、さく重、さくの室数、さくあたりの種子数、収穫期の地上部重及び地下部重について測定を行い、得られた結果について統計処理を行った。その結果、発芽率、草丈において、対照の Null 型ワタとの間で統計学的有意差が認められたが ($p < 0.05$)、それ以外の項目については、差異は認められなかった。

統計学的有意差の認められた本組換えワタの発芽率の平均値は 41.1%、対照の Null 型ワタは 55.8%であった。尚、参考として 2002 年に米国の 3 ケ所のほ場(カリフォルニア州：CA、ジョージア州：GA、アラバマ州：AL)で行った発芽試験では、ジョージア州とアラバマ州で収穫された本組換えワタと対照の Null 型ワタの種子の発芽率についても、平均で 50%以下と低い値であった。

また、同じく統計学的有意差の認められた草丈の平均値は本組換えワタで 167.2cm、対照の Null 型ワタでは 175.2cm であった。尚、参考として 2002 年に米国の 14 箇所のほ場において、播種後 4 週間(1st plant height)、8 週間(2nd plant height)、12 週間(3rd plant height)、そして収穫期に草丈を測定しているが、本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で統計学的有意差は認められていない。

生育初期における低温又は高温耐性

本組換えワタ及び対照の Null 型ワタの幼植物は、いずれも低温条件下静置後 24 日目でほぼ完全に枯死しており、その枯死程度に差異は認められなかった。

成体の越冬性又は越夏性

本組換えワタ及び対照の Null 型ワタは、いずれも調査日の 1 月 7 日までに、完全に落葉し、植物体も褐色に変化しその枯死程度に差異は認められなかった。

花粉の稔性及びサイズ

尚、本隔離ほ場試験においては、花粉の稔性及びサイズの調査は行っていないが、

米国において花粉稔性を異なる 2 つの染色法で確認しており、どちらの方法を用いても本組換えワタと対照の Null 型個体との間で統計学的有意差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

本組換えワタの 1 個体あたりのさく数とさくあたりの種子数を、対照の Null 型ワタと比較した結果、統計学的有意差は認められなかった。

脱粒性に関して、本組換えワタ及び対照の Null 型の種子は共に繊維に絡み合っており分離しにくく、脱粒性は双方とも同程度に低いと考えられた。

休眠性及び発芽率について、本組換えワタ及び対照の Null 型ワタの間で収穫した種子の発芽率は、それぞれ 58.9%と 54.4%で低かったが、両者間で統計的有意差は認められなかった。

尚、参考として 2002 年に米国のカリフォルニア州(CA)、ジョージア州(GA)及びアラバマ州(AL)の 3 ヶ所の圃場で収穫された本組換えワタ、対照の Null 型ワタ及び参考として加えた 6 つの従来品種の種子を用いて発芽試験を行った結果、アラバマ州及びジョージア州で収穫された種子の発芽率についても、平均で 50%以下と低い値であった。更にいずれも発芽、死滅あるいは吸水膨潤状態(Viable Firm Swollen)であり、休眠状態(Viable Hard)の種子は認められなかった。

交雑率

わが国では本組換えワタが属する 4 倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は存在しない。従って交雑率の試験は行わなかった。

有害物質の産生性

本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で土壤微生物相試験、鋤き込み試験、後作試験を行った。

【土壤微生物相試験】

播種前の本組換えワタ及び対照の Null 型ワタの栽培区における土壤中の微生物数(細菌数、放線菌数及び糸状菌数)の間に統計的な有意差は認められなかった。また、収穫時に採種した本組換えワタ及び対照の Null 型ワタの栽培区における土壤中の微生物数(細菌数、放線菌数及び糸状菌数)の間にも統計的な有意差は認められなかった。

【鋤き込み試験】

本組換えワタとその対照の Null 型ワタの間で、検定植物である二十日ダイコンの草丈及び生体重に統計的な有意差は認められなかった。

【後作試験】

本組換えワタと対照の Null 型ワタの間で、検定植物である二十日ダイコンの草丈及び生体重に統計的な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為の使用、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

申請書に添付した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

国外における使用等に関する情報は以下の通りである。

2004 年 12 月 米国農務省(USDA)より無規制裁培の認可を受けた。

2005 年 1 月 米国環境省(EPA)より除草剤グリホサートの本組換えワタへの適用拡大を受けた。

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

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

これまでにわが国に輸入されたワタの種子が、その輸送中にこぼれ落ちた後に、わが国の自然条件下で自生化したという報告はされていない。

競合における優位性に関わる諸形質について、第一、2-(6)の形態及び生育の特性、種子の生産量、休眠性及び発芽率に記載したように比較検討したが、形態及び生育特性に関わる形質のうちの発芽率と草丈を除いた全ての項目で対照の Null 型ワタとの間に差異は認められなかった。

尚、統計学的有意差の認められた発芽率については、本組換えワタの発芽率の平均値は 41.1%、対照の Null 型ワタは 55.8%で、ともに低い値であった。しかし、2002 年に米国のカリフォルニア州(CA)、ジョージア州(GA)及びアラバマ州(AL)の 3ヶ所の圃場において収穫された本組換えワタ、対照の Null 型ワタ及び参考として加えた 6つの従来品種の種子について発芽試験を行った結果、アラバマ州及びジョージア州で収穫された種子の発芽率についても、平均で 50%以下と低い値であった。この原因としては、2002年の平均降水量が 461mm であり、一般的に乾燥した気候であるカリフォルニア州に比べて、2002年の平均降水量がそれぞれ 1,288mm と 1,473mm であったジョージア州とアラバマ州の湿度の高い環境条件下で形成された種子が湿害を受た為であると考えられた。そこで、米国本社に本隔離ほ場に用いられた種子を採取した場所について確認したところ、予想通りジョージア州とアラバマ州であった。従って、本隔離ほ場試験に用いた種子の低い発芽率も湿害による種子稔性の低下が原因であると判断された。

また、草丈において本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で統計学的有意差が認められ、草丈の平均値は本組換えワタで 167.2cm、対照の Null 型ワタでは 175.2cm であった。しかし、2002年に米国の 14箇所のほ場において、播種後 4週間(1st plant height)、8週間(2nd plant height)、12週間(3rd plant height)、そして収穫期に草丈を測定しているが、本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で統計学的有意差は認められていない。

本組換えワタは非選択性除草剤グリホサートに高い耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。また、除草剤グリホサートの散布が想定されるような場所では、その他の除草剤を用いるか、物理的に抜き取ると

いった方法で除去することが可能である。

以上のことから、本組換えワタは発芽率、草丈において統計学的有意差が認められ、除草剤グリホサート耐性を有するが、上記のようにこれらは競合における優位性を高めるほどの変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響しあうとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

従って、本組換えワタにおいて、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物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が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

これまでワタが他感物質のように野生動植物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。

本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で、有害物質の産生性に関わる試験項目に関して、土壌微生物相試験、鋤き込み試験、そして後作試験を行ったが、全ての項目において統計学的有意差は認められなかった。

本組換えワタは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)-ロ- に述べたように、CP4 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 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。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えワタ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

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が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

わが国では本組換えワタが属する4倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生していない。よって、交雑性について、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が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ワタの性質はないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

わが国においては、本組換えワタの種子を販売する予定はなく、ワタの商業栽培自体も行われていない。更に、わが国には本組換えワタと交雑可能な *Gossypium* 属植物の自然分布は報告されていないことから、本組換えワタがわが国の生物多様性に影響を与えるとすれば、搾油用あるいは飼料用として輸入された種子が輸送中にわが国の自然条件下でこぼれ落ちて生育或いは自生化して他の植物を駆逐した場合が想定された。そこで、本組換えワタの隔離ほ場試験では、輸送中にこぼれ落ちた種子がその場で発芽し、自生化する可能性の有無を中心に調査した。

本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で、競合における優位性に関わる諸形質(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、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率)を比較検討した。その結果、形態及び生育に関わる形質のうちの発芽率と草丈で対照の Null 型ワタとの間に統計学的有意差が認められたが、その他の項目では統計学的有意差は検出されなかった。

本組換えワタは非選択性除草剤グリホサートに高い耐性を持つが、グリホサートを散布されることが想定しにくい自然条件下においてグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。また、除草剤グリホサートの散布が想定されるような場所では、その他の除草剤を用いるか、物理的に抜き取るといった方法で除去することが可能である。

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受ける可能性のある野生動植物は特定されなかった。

これまでワタが他感物質のように野生動植物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。

本組換えワタと対照の Null 型ワタとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤き込み試験、後作試験により比較検討したが統計学的有意差は認められなかった。

本組換えワタは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)- α - に述べたように、CP4 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 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。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程

で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えワタ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

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された。

わが国には本組換えワタが属する 4 倍体栽培ワタ *Gossypium hirsutum* と交雑が可能な *Gossypium* に属する近縁野生種は自生していないことから、本組換えワタが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。

よって、総合評価として、本組換えワタを第一種使用規定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。

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成17年 2月 18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
銀座山王ビル8階

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耐性 ワタ(*cp4 epsps, Gossypium hirsutum* L.) (MON88913, OECD UI: MON-88913-8)(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への協力などを必要に応じて行う。さらに、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。尚、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とは、本組換え体に関して、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は以下に示す通りである。

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

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

- 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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

- 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

具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された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、必要に応じて本組換え体が日本に輸入されないようにすること等、必要な措置を実行する。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。