資料２－２

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ワタ（*2mepsps*, 改変 *bar*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB614×LLCotton25, OECD UI: BCS-GHØØ2-5×ACS-GHØØ1-3）申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書……5

第一　生物多様性影響の評価に当たり収集した情報……6
1　宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報……6
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況……6
① 和名、英名及び学名……6
② 宿主の品種名……6
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域……6
(2) 使用等の歴史及び現状……7
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史……7
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途……8
(3) 生理学的及び生態学的特性……8
イ　基本的特性……8
ロ　生息又は生育可能な環境の条件……8
ハ　捕食性又は寄生性……9
ニ　繁殖又は増殖の様式……9
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命……9
② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性……9
③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度……9
④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命……9
ホ　病原性……10
ヘ　有害物質の産生性……10
ト　その他の情報……10
2　遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報……11
(1) 供与核酸に関する情報……11
イ　構成及び構成要素の由来……11
ロ　構成要素の機能……14

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 …… 14
② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨 …… 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 …… 17
イ 名称及び由来 …… 17
ロ 特性 …… 18
① ベクターの塩基数及び塩基配列 …… 18
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 …… 18
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 …… 18
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法 …… 21
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 …… 21
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 …… 21
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過 …… 21
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法 …… 21
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 …… 21
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 …… 21
(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 …… 23

(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……28
a. 形態及び生育の特性……28
b. 生育初期における低温又は高温耐性……30
c. 成体の越冬性又は越夏性……30
d. 花粉の稔性及びサイズ……30
e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率……30
f. 交雑率……31
g. 有害物質の産生性……31
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報……31
(1) 使用等の内容……31
(2) 使用等の方法……31
(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……31
(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……32
(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……32
(6) 国外における使用等に関する情報……32

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価……33
1 競合における優位性……33
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……33
(2) 影響の具体的内容の評価……34
(3) 影響の生じやすさの評価……34
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……34
2 有害物質の産生性……35

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……35
(2) 影響の具体的内容の評価……36
(3) 影響の生じやすさの評価……36
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……36
3　交雑性……36
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定……36
(2) 影響の具体的内容の評価……36
(3) 影響の生じやすさの評価……37
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断……37
4　その他の性質……37

第三　生物多様性影響の総合的評価……38

参考文献……40
別添資料の内容……40

緊急措置計画書……41

第一種使用規程承認申請書

平成 21 年 11 月 26 日

農林水産大臣　　赤松　広隆　殿
環 境 大 臣　　小沢　鋭仁　殿

氏名　　バイエルクロップサイエンス株式会社
申請者　　代表取締役社長　ギャビン　マーチャント
印
住所　　東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

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及びグルホシネート耐性ワタ（*2mepsps*, 改変 *bar*, *Gossypium hirsutum* L.）（GHB614×LLCotton25，OECD UI: BCS-GHØØ2-5×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	―

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（リクチメン）
英名：Upland cotton
学名：*Gossypium hirsutum* L.

②　宿主の品種名

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ワタ（*2mepsps*, 改変*bar*, *Gossyipum hirsutum* L.）（GHB614×LLCotton25, OECD UI: BCS-GHØØ2-5×ACS-GHØØ1-3）（以下、「本スタック系統」とする。）は、除草剤グリホサート耐性ワタ（*2mepsps*, *Gossyipum hirsutum* L.）（GHB614, OECD UI: BCS-GHØØ2-5）（以下、「GHB614」とする。）と、除草剤グルホシネート耐性ワタ（改変*bar*, *Gossyipum hirsutum* L.）（LLCotton25, OECD UI: ACS-GHØØ1-3）（以下、「LLCotton25」とする。）を掛け合わせて作出された。

GHB614及びLLCotton25の宿主は、いずれも四倍体ワタ（*G. hirsutum* L.）のCoker312（以下、「Coker312」とする。）である。

③　国内及び国外の自然環境における自生地域

G. hirsutum（以下、「ワタ」とする。）は四倍体ワタの栽培種であり（文献47）、我が国の自然環境下において、本種及び本種と交雑可能な*Gossypium*属（以下、「ワタ属」とする。）植物の分布は報告されていない。

ワタ属は、熱帯及び亜熱帯の乾燥地帯から半乾燥地帯にかけて、世界におよそ50種（文献14）が分布し、その生物学的多様性の中心は、主にアフリカ・アラビア半島、オーストラリア及びメキシコの3地域である（文献32）。ワタ属のうち二倍体種はアフリカ、アラビア半島、パキスタン及びおそらくそれ以東に分布するアフリ

カ・アラビア群（*Gossypium*亜属）の約14種（文献39, 44）、オーストラリア群（*Sturtia*亜属）の約17種（文献5）、そして、メキシコ西部、ガラパゴス諸島及びペルーに分布するアメリカ群（*Houzingenia*亜属）の約14種（文献1）であり、四倍体種はメソアメリカ（メキシコ及び中央アメリカ）、南アメリカ、ガラパゴス諸島及びハワイ諸島に分布するアメリカ・太平洋群（*Karpas*亜属）の5種である（文献47）。なお、二倍体種の*G. arboreum*及び*G. herbaceum*は旧大陸（アフリカ・アジア）において、一方、四倍体種のワタ（*G. hirsutum*）及び*G. barbadense*は新大陸（*G. hirsutum*はメソアメリカ、*G. barbadense*は南アメリカ）において、それぞれ栽培化された（文献32）。

（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

ワタ属は数千年間その繊維を得るために栽培されてきた。パキスタンのモヘンジョダロ遺跡から紀元前3000年頃の*G. arboreum*の綿布片が発掘され、一方、新大陸でも紀元前2400年頃の古代ペルー人の住居跡で*G. barbadense*の種子と原始的織機や織物の破片が発見された。これらのことから、古代インド人とペルーのインディオによって綿から織物を作る技術が開発されていたことがうかがわれる。また、メキシコでは紀元前5800年頃の洞窟からワタ（*G. hirsutum*）のさくが発掘され、ワタ（*G. hirsutum*）の栽培利用の歴史はきわめて古いと考えられている（文献55）。

中南米で栽培されたワタ（*G. hirsutum*）は1700年前頃メキシコから米国に入り、内陸部で一年生の早生種が栽培されるようになり、その後、米国の主要作物となったが、南北戦争でその供給が絶たれたのを機に、世界の熱帯･亜熱帯の諸国に広がった（文献55）。今日生産されるワタ属栽培種の95％以上は四倍体種であり、ワタ（*G. hirsutum*）が90％以上、長繊維綿、ピマ綿又はエジプト綿と呼ばれる*G. barbadense*が5％程度を占める（文献32）。

我が国における在来の栽培種は*G. arboreum*とされ、799年（延歴18年）に三河地方に漂着したインド人が伝えた種子を栽培したのが最も古い記録とされ、その後、16世紀に入ってから全国的に栽培が広まった（文献53）。しかし、輸入綿におされて次第に衰微し、第二次世界大戦中及び戦後に再び盛んになったものの、現在ではその商業的な栽培はなく、観賞用としてわずかに栽培されているにすぎない（文献55）。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

2007年の世界における綿実の生産量は約7,355万tであり、主な生産国は中国（2,287万t）、インド（1,320万t）、米国（1,037万t）、パキスタン（595万t）である（文献12）。

2008年には、搾油用の綿実約13万トン、綿実油5,944トンが我が国に輸入されている（文献54）。また、2007年の綿実油粕の輸入量は4,481 tであり、主な輸入先は中国（4,182 t）、米国（299 t）であった（文献51）。

ワタの大規模栽培の畑では機械による収穫が行われるが、その際、葉片などの混入を防ぐために収穫前に薬剤で落葉させる（文献53）。

ワタは工芸作物の中でも最も重要な位置を占めている。ワタの主な用途は繊維利用であり、綿花は糸に紡がれる。また、地毛は短いため繊維として利用されず、セルロースや紙の原料とされる。種子は18～24％の油脂と16～20％の蛋白質を含み、抽出した油は食用油として、また、搾油粕は家畜の飼料として重要であり、肥料としても需要が高い（文献53）。

（3）生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

ワタは多年生植物で低木にもなるが、商業的には一年生作物として栽培される（文献32）。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である（文献34）が、一般的には茎長1 mから1.5 mで栽培されている（文献32）。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

ワタの発芽もしくは実生の生育には15℃以上が要求され、38℃以上になると生育遅延が起こる（文献32）。生育の最適温度は、昼温30～35℃であるが、35℃以上になると結実が抑制され、25℃以下では生産量が著しく減少する（文献36）。また、正常な生育には、180～200日以上の無霜期間並びに栽培期間中に500 mm以上の降雨量もしくは潅水を要する（文献11）。さらに、ワタは酸性に弱いが、アルカリ性に

対する適応性が高く、塩分の多いアルカリ性土壌で栽培可能である（文献53)。

ハ　捕食性又は寄生性

――――

ニ　繁殖性又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

さくは3～5室に分かれており、1室に7～8個の種子が含まれる。発育にともない水分が減少し、さく皮が裂けて開じょする。ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくく（文献55)、種子の脱粒性は低い（文献25)。品種によっては収穫後2～3ヶ月の休眠期を持つ（文献11)。また、水分含有率10％以上の種子は貯蔵中に急速に活力が失われることが知られており（文献35)、自然環境では寿命は比較的短いと考えられる。

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

ワタは種子繁殖であり、自然条件下で植物体を再生しうる組織又は器官から発芽するという報告はなされていない。

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植物であるが、媒介昆虫により他家受粉し、他殖率は通常5～30%とされている（文献25)。なお、我が国においてワタと交雑可能な近縁野生種は知られていない。また、アポミクシスについての報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

ワタは一花に50～125以上の葯を形成し、一つの葯で350～900個の花粉粒が生産

される（文献32）。ワタの花粉粒は大きく重く、やや粘着性があるため、風で花粉が運ばれることはほとんどなく（文献41）、自然交雑の程度は主にマルハナバチ（*Bombus*属）やミツバチ（*Apis*属）等の媒介昆虫の活動に依存している（文献29, 32）。米国での調査では、除草剤耐性ワタの商業栽培ほ場から1640 m（1マイル）地点でも散発的な交雑（0.04%）が認められたことが報告されている（文献43）。しかし、同じく除草剤耐性ワタを用いた交雑試験では、媒介昆虫の活発な活動の条件下では花粉源からの距離が9 m以上で交雑率は1%以下になり、媒介昆虫の活動が乏しい条件下では1 m以上で1%以下であった（文献43）。また、除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10 mを超えると耐性個体の出現程度は0.3%以下となり偶発的なものに限られ、60 m以上では耐性個体の出現は認められなかった（文献49）。

花粉の寿命については、25℃飽和湿度条件において、8時間後では約90%、16時間後では約31%、32時間後では7.6%と低下し、蛾（*Helicoverpa armigera*）の口吻に付着した場合には、8時間後には約19%となり、花粉の生存率はさらに低下することが確認されている（文献37）。

ホ　病原性

へ　有害物質の産生性

ワタが、他感物質等のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質を産生することは知られていない。

ト　その他の情報

ワタの種子には、ヒトや動物が大量に摂取した場合に悪影響を及ぼし得るゴッシポールやシクロプロペン脂肪酸が含まれている（文献32）。そのため、飼料としてのワタ種子の給餌量は制限されているが、反芻動物はこれらの物質を第一胃で消化して無毒化するため、影響を受けにくい（文献24）。

ゴッシポールは腺組織に存在するテルペノイドで、二つの異性体（+/−）があり、主に（−）ゴッシポールが活性を示す（文献40）。また、両異性体には遊離型と結合型があり、種子には遊離型ゴッシポールが含まれる。遊離型ゴッシポールは、非

反芻動物、鳥類並びに多くの昆虫や微生物に対して毒性を示し、哺乳類においては食欲減退、体重減少や呼吸困難等を引き起こす（文献2)。しかし、搾油粕中のゴッシポールは蛋白質と結合して毒性を失い（文献32)、粗油中のゴッシポールは脱ガム、脱酸、脱色の各工程で除去される（文献52)。

シクロプロペン脂肪酸（マルバリン酸、ステルクリン酸）は粗油中に1%ほど含まれており、不飽和化酵素を阻害し、鶏では卵白の変色やふ化率の低下などを引き起こすが、油の精製工程で除去される（文献17, 31)。

ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、野生動物が摂食するという例は報告されていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

本スタック系統は、GHB614とLLCotton25を掛け合わせて作出されたものであり、それぞれの特性を併せ持つ。したがって、以下ではGHB614及びLLCotton25の調製等に関する情報について記載した。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

GHB614及びLLCotton25の作出に用いられた供与核酸の構成要素をそれぞれ表1（p.12）及び表2（p.13）に示した。

表1　GHB614の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	ベクター上の位置	サイズ（bp）	由来及び機能
*2mepsps*遺伝子発現カセット			
Ph4a748At	0026-1036	1011	シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）由来のヒストンH4のプロモーター領域を含む配列（文献7）。植物中で構成的に*2mepsps*遺伝子の転写を開始させる。
intron1 h3At	1037-1553	517	*A. thaliana*由来のヒストンH3.3の第Ⅱ遺伝子の第一イントロンを含む配列（文献8）。
TPotp C	1554-1926	373	ヒマワリ（*Helianthus annuus*）及びトウモロコシ（*Zea mays*）のRuBisCo小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に作製された（文献26）。成熟した2mEPSPS蛋白質を色素体に輸送する。
2mepsps	1927-3264	1338	トウモロコシ（*Z. mays*）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（*epsps*遺伝子）に点突然変異を起こした、2変異5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS蛋白質）をコードする遺伝子（文献27）で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。なお、*epsps*遺伝子の色素体膜輸送ペプチドをコードする配列は、取り除かれている。
3'histonAt	3265-4007	743	*A. thaliana*由来のヒストンH4遺伝子の3'非翻訳領域（文献7）を含む配列で、転写を終結させ3'ポリアデニル化を生じさせる。
その他			
LB	0001-0025	25	*Rizobium radiobacter*（*Agrobacterium tumefaciens*）由来のT-DNA由来の左側境界反復配列（文献48）。
RB	4008-4032	25	*R. radiobacter*（*A. tumefaciens*）由来のT-DNA由来の右側境界反復配列（文献48）。
—	4033-4224	192	右側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片（文献50）。
*npt*I断片	4225-4935	711	ネオマイシン ホスホトランスフェラーゼをコードするトランスポゾンTn903由来の*npt* I 遺伝子（文献33）の断片。なお、本配列は断片であるため機能しない。
ORI ColE1	4936-6108	1173	*Escherichia coli*のプラスミドpBR322（文献3）由来複製起点を含む配列。
ORI pVS1	6109-9879	3771	*Pseudomonas*のプラスミドベクターpVS1（文献23）の複製起点（文献18）を含む配列。
aadA	9880-11648	1769	*E. coli*由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子（文献13）を含む配列。
—	11649-11953	305	左側境界反復配列におけるプラスミドpTiAch5の断片（文献50）。

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

表2　LLCotton25の作出に用いた供与核酸の構成要素

構成要素	ベクター上での位置	サイズ（bp）	由来及び機能
改変 *bar* 遺伝子発現カセット			
P35S3	250-1634	1385	カリフラワーモザイクウイルス 35S 転写物遺伝子由来のプロモーター領域で、転写を開始させる（文献 30）。
改変 *bar*	1635-2186	552	*Streptomyces hygroscopicus* 由来の bialaphos resistance（*bar*）遺伝子で、除草剤グルホシネート耐性を付与する（文献 42）。野生型 *bar* 遺伝子の N-末端の 2 つのコドン（GTG 及び AGC）は ATG と GAC にそれぞれ置換されている。なお、GTG→ATG の置換ではアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC→GAC の置換ではセリンからアスパラギン酸に変化している。
3’nos	2206-2465	260	pTiT37 の T-DNA 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3’非翻訳領域で、転写を終結させ、3’ポリアデニル化を生じさせる（文献 10）。
その他			
RB	198-222	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の右側境界反復配列（文献 15）。
LB	2520-2544	25	pTiB6S3 由来の T-DNA の左側境界反復配列（文献 15）。
aadA	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（文献 28）を含む配列。
pVS1ori	4619-8389	3780	*Pseudomonas* 由来のプラスミド pVS1 の複製起点（文献 23）。
ColE1	8390-9555	1165	プラスミド pBR322 由来の複製起点 ColE1 ori（文献 3）を含む配列。

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

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

GHB614及びLLCotton25の作出に用いた供与核酸の構成要素それぞれの機能は表1（p.12）及び表2（p.13）に示した。

② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

<u>2mEPSPS蛋白質</u>

5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（EPSPS）蛋白質（EC 2.5.1.19）は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路である、シキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、ホスホエノールピルビン酸（PEP）とシキミ酸-3-リン酸（S3P）から5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸（EPSP）を生ずる可逆反応を触媒する。EPSPS蛋白質はPEP及びS3Pと結合し3成分からなる酵素－基質複合体中間体を作るが、除草剤グリホサートは可逆的にPEP結合部位に結合して競合的にその活性を阻害する（文献4）。その結果、植物は蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり、枯死する。

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

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

改変PAT蛋白質

植物は窒素代謝の過程で硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が阻害されてアンモニアが蓄積し、植物は枯死する。

改変*bar*遺伝子のN-末端の2つのコドンは、植物で使用されるコドンに適合するためにGTG→ATGに、また、翻訳の効率を上げるためにAGC→GACに置換されている。GTG→ATGの置換では翻訳されるアミノ酸はメチオニンのまま変化していないが、AGC→GACの置換ではセリンからアスパラギン酸に変化している。

改変*bar*遺伝子産物である改変PAT蛋白質は、グルホシネートをアセチル化してN-アセチルグルホシネートとし、グルホシネートのグルタミン合成酵素に対する阻害作用を不活性化する。これによりアンモニアの蓄積が回避され、除草剤グルホシネートを散布されても植物は枯死しない。

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

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

2mEPSPS蛋白質

2mEPSPS 蛋白質の PEP 及び S3P に対する親和性の濃度（*K*m 値：ミカエリス定数）について、EPSPS 蛋白質と比較した結果、S3P に対する親和性は 2mEPSPS 蛋白質の方が EPSPS 蛋白質よりわずかに低かったが、PEP に対する *K*m 値は同等であった（表 3, p.16）。また、酵素活性を調べた結果、最大反応速度（*Vmax*）は、PEP と S3P のいずれに対しても EPSPS 蛋白質の方が 2mEPSPS 蛋白質より高く、PEP に対して約 4.7 倍、S3P に対して約 4 倍、それぞれ高い数値を示した（表 3, p.16）。また、グリホサートが PEP の競合阻害剤となることから、PEP 濃度を *K*m 値の 5 倍の濃度に設定して PEP に対するグリホサートの 50%阻害濃度（IC_{50} 値）を調べた結果、2mEPSPS 蛋白質の IC_{50} 値は EPSPS 蛋白質に比べ約 190 倍高かった（表 3, p.16）。さらに、PEP に対するグリホサートの阻害定数（*K*i 値）は 2mEPSPS 蛋白質では 2.3 mM、EPSPS 蛋白質では 0.9 μM となり、グリホサートの 2mEPSPS 蛋白質に対する

阻害活性は、EPSPS 蛋白質に対してよりも約 2000 分の 1 であった（表 3）。以上から、PEP 及び S3P に対する *K*m 値がほぼ同等であったことから各結合部位に変化はなく、2mEPSPS 蛋白質は EPSPS 蛋白質と同じ基質特異性を保持しながらそれ以外の部位に変異が生じてグリホサートに対する高い耐性が誘導されたと考えられる。なお、EPSPS 蛋白質は PEP 及び S3P 以外に S3P の類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS 蛋白質とシキミ酸の反応性は低く（文献16）、高い基質特異性を有している。

表3　2mEPSPS蛋白質及びEPSPS蛋白質の反応動力学的定数（*K*m値、IC_{50}値、*K*i値）

酵素	*K*m値/PEP[a]（mM）	*K*m値/S3P[a]（mM）	Vmax/PEP[a]（U/mg）	Vmax/S3P[a]（U/mg）	IC_{50}値/PEP[a]（mM）	*K*i値/PEP（μM）
2mEPSPS	0.07±0.005	0.12±0.01	2.6±0.05	3.0±0.08	18.3±2.7	2300
EPSPS	0.07±0.01	0.09±0.006	12.2±0.42	11.9±0.19	0.098±0.005	0.9

n=2。
a：（平均±標準偏差）。
（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

また、2mEPSPS蛋白質の産生により既存のEPSPS蛋白質に加算してEPSPS活性が増大することによる影響が考えられる。しかし、シキミ酸合成経路において最終段階の合成反応に関与するEPSPS蛋白質は、中間代謝産物や最終生成物により負の制御を受けている可能性が低く、本経路の律速には関与していないものと考えられる（文献6, 19, 20, 21, 22, 46）。また、通常の40倍のEPSPS蛋白質を生成する植物培養細胞においても、最終生成物の芳香族アミノ酸が過剰に生成されていないことが報告されている（文献38）。さらに、2mEPSPS蛋白質のみならずEPSPS蛋白質も産生すると考えられるGHB614の種子における芳香族アミノ酸（チロシン、トリプトファン、フェニルアラニン）の含有量は、除草剤グリホサートの散布の有無にかかわらず、宿主品種の種子と比較して統計学的有意差は認められなかった（表4, p.17）。

表4　GHB614及びCoker312の有毛種子における各種アミノ酸含量

アミノ酸	乾燥重量%			有意差[b]	
	Coker312区[a]（A）	GHB614 グリホサート 未処理区[a]（B）	GHB614 グリホサート 処理区[a]（C）	A-B	A-C
フェニルアラニン	1.241	1.264	1.256	ns	ns
トリプトファン	0.313	0.321	0.317	ns	ns
チロシン	0.593	0.614	0.606	ns	ns

a：全9試験地の27の測定値（各試験地における3測定値×9試験地）から、総平均を算出した。
b：t-検定（有意水準1%）により統計処理を行った。t-検定はA vs. B及びA vs. Cの2パターンで行った。
ns：統計学的有意差なし。

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

改変PAT蛋白質

改変*bar*遺伝子産物の改変PAT蛋白質は、グルホシネートに高い親和性を示す。グルホシネートはL-アミノ酸に分類されるが、改変PAT蛋白質が各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、また、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応を生ずることはない（文献42）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても、改変PAT蛋白質のグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されないことが報告されている（文献45）。これらのことから、改変PAT蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有し、宿主の代謝系へ影響を及ぼすことはないと考えられる。

（2）　ベクターに関する情報

イ　名称及び由来

GHB614：*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 及び *Pseudomonas* 由来プラスミド pVS1 等を基に構築された pGSC1700（文献 9）に由来する pTEM2（図 1, p.19）。

LLCotton25：　*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 及び *Pseudomonas* 由来プラスミド

pVS1（文献 23）を基に構築された pGSV71（図 2, p.20）。

ロ　特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

GHB614：　pTEM2；11,953 bp
LLCotton25：　pGSV71；9,555 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

pTEM2及びpGSV71にはいずれも、ストレプトマイシンやスペクチノマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質に耐性を付与する遺伝子（*aadA*）がT-DNA領域の外側に構築されている。なお、これらの配列が宿主に挿入されていないことは、いずれもサザンブロット分析により確認されている。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

pTEM2及びpGSV71には伝達性を示す因子は含まれておらず、感染性はない。

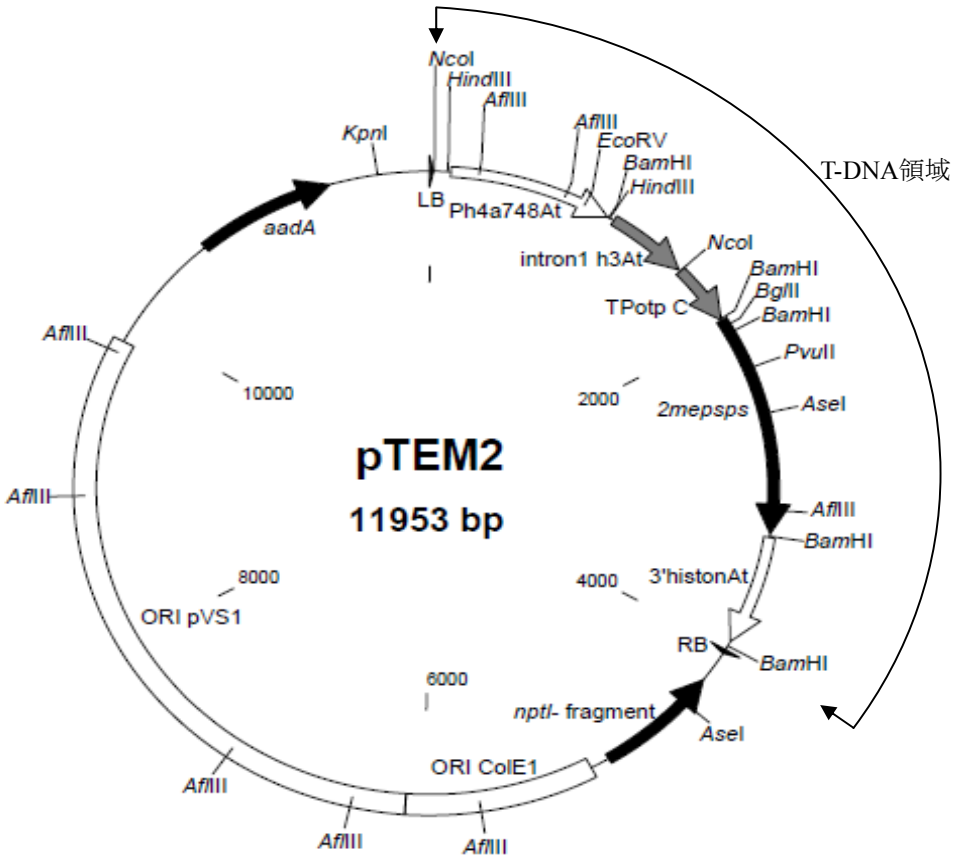

図1　pTEM2のベクターマップ及び制限酵素切断部位

（注：本図に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

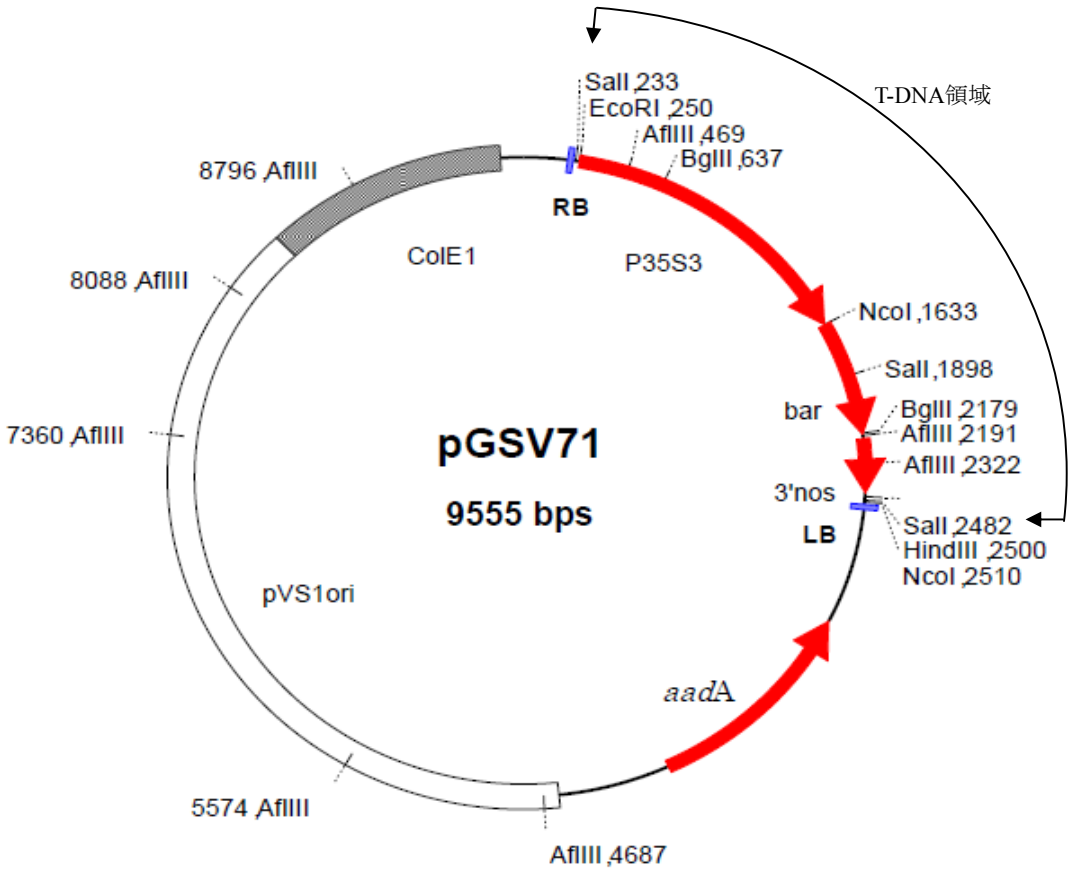

図2　pGSV71のベクターマップ及び制限酵素切断部位

図中のbarは改変*bar*遺伝子を示す。

（注：本図に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

（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

GHB614及びLLCotton25の作出の際には、それぞれpTEM2及びpGSV71上のLBとRBに挟まれた領域が宿主内に移入された。移入された核酸の構成については、図1（p.19）及び図2（p.20）に示した。

ロ　宿主内に移入された核酸の移入方法

宿主への核酸の移入は、GHB614及びLLCotton25のいずれも、アグロバクテリウム法を用いて行われた。

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

形質転換細胞は、GHB614についてはグリホサート、LLCotton25についてはグルホシネートを添加した培地を用いて選抜された。

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

GHB614及びLLCotton25はいずれも、核酸の移入後にclaforan（セフェム系抗生物質の商品名）500mg/Lを含む培地で培養し、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、claforanを含まない培地で培養し、アグロバクテリウム菌体の残存がないことを確認した。

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

GHB614及びLLCotton25はいずれも、再生個体をポットに移植して温室内で栽培

し、組換え当代（T0世代）を得た。また、GHB614については除草剤グリホサート耐性、LLCotton25については除草剤グルホシネート耐性の各目的形質及び農業形質等により優良系統を選抜した。また、本スタック系統は、GHB614とLLCotton25をそれぞれ同じ商業品種で戻し交配した後、両者を掛け合わせることにより作出された。本スタック系統の育成の経過を図3に示した。

なお、本申請の対象は、GHB614の戻し交配後代とLLCotton25の戻し交配後代の掛け合わせにより作出された掛け合わせ当代（F1世代）及びその後代である。

また、我が国におけるGHB614及びLLCotton25の承認状況を表5に示した。

表5　我が国におけるGHB614及びLLCotton25の承認状況

	環境	食品	飼料
GHB614	2009年7月 申請	2009年1月 申請	2009年1月 申請
LLCotton25	2006年2月 第一種使用規程承認	2004年6月 安全性確認	2006年2月 安全性確認
本スタック系統	2009年11月 申請	2009年 申請予定	2010年 届出予定

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

社外秘情報につき非開示

図3　本スタック系統の育成の経過

（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

GHB614及びLLCotton25に移入された核酸はいずれもワタゲノム上に存在することが確認されている。

②　移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

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

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

———

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

各親系統における蛋白質の発現の安定性については以下の方法で確認されている。

GHB614：　ELISA分析及び除草剤グリホサート散布試験。
LLCotton25：　ELISA分析及び除草剤グルホシネート散布試験。

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

GHB614及びLLCotton25に移入された核酸はいずれも伝達性に係わるDNA配列を有しておらず、自然条件下において野生動植物等に伝達されるおそれはないと考えられた。

（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

GHB614及びLLCotton25は、それぞれ移入されたDNAの周辺配列を利用したプライマーを用いたPCR法によって識別することができる。

本スタック系統を検出及び識別するためには、1つのワタ種子又は植物体についてそれぞれの方法で分析し、いずれも陽性の場合、本スタック系統であることが確認される。

（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

本スタック系統は各親系統が有する下記の特性を有する。

GHB614： *2mepsps*遺伝子が付与する除草剤グリホサート耐性。

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

GHB614で発現する2mEPSPS蛋白質は、EPSPSと同様にシキミ酸経路においてホスホエノールピルビン酸（PEP）及びシキミ酸-3-リン酸（S3P）と結合し、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸（EPSP）を生ずる反応を触媒する酵素である。EPSPSはシキミ酸経路における律速酵素ではなく、EPSPS活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸は過剰に生成されないことが報告されている（文献38）。また、2mEPSPS蛋白質の基質であるPEP及びS3Pに対する*Km*値は、EPSPSとほぼ同等である（表3, p.16）ことから、同じ基質特異性を有すると考えられる。さらに、EPSPSはS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、その反応性は低く（文献16）、高い基質特異性を有している。これらのことから、2mEPSPS蛋白質は高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

LLCotton25で発現する改変PAT蛋白質は、グルホシネートにアセチル基を転移して不活性化させる酵素である。グルホシネートはL-アミノ酸に分類されるが、改変PAT蛋白質が各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸にも親和性はほとんどなく、生体内において実質的に転移反応

を生ずることはない（文献42）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下においても改変PAT蛋白質のグルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されないことが報告されている（文献45）。よって、改変PAT蛋白質はグルホシネートに高い基質特異性を有し、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

よって、本スタック系統においても、これらの蛋白質が相互作用を示し、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

実際に、本スタック系統において2mEPSPS蛋白質と改変PAT蛋白質が相互作用を示さないことを確認するため、2008年に米国において除草剤散布による生物検定を行った（表6, p.27）。

除草剤グリホサートによる生物検定

温室にて本葉2～3葉期まで育成した本スタック系統、GHB614及び非組換えワタの苗に、標準使用量｛有効成分 0.75ポンド（340g）／エーカー｝、8倍、16倍及び32倍の濃度の除草剤グリホサートを散布し、散布7日後及び14日後における薬害の程度を調べた。その結果、いずれの調査区においても本スタック系統とGHB614の薬害程度に差異又は統計学的有意差は認められなかった（表6, p.27）。

除草剤グルホシネートによる生物検定

温室にて本葉2～3葉期まで育成した本スタック系統、LLCotton25及び非組換えワタの苗に、標準使用量｛有効成分 0.52ポンド（236g）/エーカー｝、8倍、16倍及び32倍の濃度の除草剤グルホシネートを散布し、散布7日後及び14日後における薬害の程度を調べた。その結果、非組換えワタの場合、標準使用量区において散布7日後に比べ14日後には薬害程度の進行がわずかに認められたが、本スタック系統及びLLCotton25の薬害程度については、いずれの区でも散布7日後から変化は認められなかった（表6, p.27）。8倍｛有効成分 4.16ポンド（1887g）/エーカー｝区において、本スタック系統及びLLCotton25の間に統計学的有意差が認められたが、標準使用量、16倍及び32倍の各区では、いずれも両系統の間に差異は認められておらず、8倍区で認められた差が2mEPSPS蛋白質と改変PAT蛋白質の相互作用によるものであるとは考え難い。

以上から、本スタック系統において2mEPSPS蛋白質と改変PAT蛋白質の間に相互作用はなく、本スタック系統が獲得した2つの性質は、掛け合わせにより変化して

いないと考えられる。

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

表6　除草剤散布による薬害程度[1]の評価（平均値±標準偏差）

除草剤グリホサート				
	標準使用量[2]	8倍	16倍	32倍
散布7日後				
本スタック系統	0±0　(10)[5]	2.33±0.50　(9)	3.44±0.53　(9)	4.30±0.48　(10)
GHB614	0±0　(9)	2.00±0.71　(9)	3.00±0.54　(8)	4.13±0.35　(8)
有意差[4]	―	ns	ns	ns
非組換えワタ	0.63±1.19　(8)	3.00±0　(7)	4.67±0.50　(9)	5.00±0　(10)
散布14日後				
本スタック系統	0±0　(10)	2.33±0.50　(9)	3.44±0.53　(9)	4.30±0.48　(10)
GHB614	0±0　(9)	2.00±0.71　(9)	3.00±0.54　(8)	4.13±0.35　(8)
有意差[4]	―	ns	ns	ns
非組換えワタ	1.88±0.64　(8)	3.00±0　(7)	5.00±0　(9)	5.00±0　(10)

除草剤グルホシネート				
	標準使用量[3]	8倍	16倍	32倍
散布7日後				
本スタック系統	0±0　(10)	1.50±0.53　(10)	2.00±0　(10)	3.00±0　(10)
LLCotton25	0±0　(10)	1.00±0　(10)	2.00±0　(10)	3.00±0　(10)
有意差[4]	―	s	―	―
非組換えワタ	4.00±0　(7)	5.00±0　(4)	5.00±0　(9)	5.00±0　(9)
散布14日後				
本スタック系統	0±0　(10)	1.50±0.53　(10)	2.00±0　(10)	3.00±0　(10)
LLCotton25	0±0　(10)	1.00±0　(10)	2.00±0　(10)	3.00±0　(10)
有意差[4]	―	s	―	―
非組換えワタ	4.14±0.38　(7)	5.00±0　(4)	5.00±0　(9)	5.00±0　(9)

[1]：薬害程度の評価方法（達観評価）
0 = <10%の薬害; 子葉のクチクラに痕跡程度の青銅色化
1 = 10-20%の薬害; 子葉の中程度の青銅色化、本葉の痕跡程度の変化
2 = 21-40%の薬害; 子葉の中程度の青銅色化、本葉の少しの変化と巻上がり
3 = 41-60%の薬害; 子葉の中程度から激しい青銅色化と壊死、本葉の中程度の変化と巻上がり
4 = 61-80%の薬害; 子葉及び本葉における中程度から激しい変化、巻上がりと壊死
5 = 81-100%の薬害; 子葉と本葉の激しい白化、壊死、落葉
[2]：有効成分 0.75 ポンド（340g）/エーカー。
[3]：有効成分 0.52 ポンド（236g）/エーカー。
[4]：マンホイットニーのU検定（有意水準5%）。 ns: 本スタック系統と親系統の間に統計学的有意差は認められなかった。s: 本スタック系統と親系統の間に統計学的有意差が認められた。
―: 本評価方法では分散が算出されず検定できなかった。
[5]：( )は播種した10粒中、発芽・生育し、散布試験に供試された実生数。

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

GHB614及びLLCotton25の生理学的又は生態学的特性について、それぞれ対照の非組換えワタとの比較・調査を行った。

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

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

a. 形態及び生育の特性

形態及び生育の特性に関して調査した項目を表7（p.29）に示した。

GHB614については、隔離ほ場試験に供試した種子（以下、「栽培試験用種子」とする。）の発芽率において、対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められた（別添資料1, p.11 表4）が、両系統の種子は採種地を異にし、非組換えワタでは収穫前の天候不順が発芽率に影響したものと考えられた。

LLCotton25については、播種後60日目の幹長及び播種後60日及び120日目の節数について対照の非組換えワタとの間で統計学的有意差が認められたが、その他の調査日の幹長及び節数ではいずれも統計学的有意差は認められなかった（別添資料3, p.8 表3）。

表7　GHB614及びLLCotton25における形態及び生育の特性の調査項目

項目	GHB614	LLCotton25
発芽揃い	○	○
開花期	○	○
開じょ期	○	○
収穫期	○	○
葉形	○	○
草型	○	○
花の形状及び色	○	○
さくの形状	○	○
綿毛の色	○	○
種子の形状	○	○
種子の色	○	○
発芽率	○＊	○
葉長	○	○
葉幅	○	○
幹長	○	○＊
着蕾数／有効花蕾数	○	○
節数	○	○＊
発育枝数	○	－
結果枝数	○	○
総分枝数	○	○
株当たり収穫さく数	○	○
株当たり未収穫さく数	○	○
株当たり総さく数	○	○
地上部重	○	○
地下部重	○	○
さくの長さ	○	○
さくの幅	○	○
さくの重量	○	○
さくの室数	○	○
さく室当たりの種子数	－	○
さく当たりの種子数	○	○
種子 100 粒重	○	－

○：調査を行った。
―：調査を行わなかった。
＊：一部の試験区で統計学的有意差（有意水準5%）が認められた。詳細については第一 6 ② a (p.28) 及び第二 1 (1) (p.33-34)を参照。

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

b. 生育初期における低温又は高温耐性

GHB614及びLLCotton25の幼植物体はいずれも、低温条件下（4～5℃）において対照の非組換えワタと同様に枯死した（別添資料2, p.9 表13; 別添資料3, p.18 表12）。

c. 成体の越冬性又は越夏性

GHB614及びLLCotton25はいずれも、我が国の隔離ほ場において収穫期後も栽培を続けた結果、翌年2月の観察時には枯死していることが確認された（別添資料1, p.13; 別添資料3, p.18）。

d. 花粉の稔性及びサイズ

GHB614及びLLCotton25の花粉の稔性及びサイズを対照の非組換えワタと比較した結果、いずれも統計学的有意差や相違は認められなかった（別添資料1, p.11 表4, p.12 図7; 別添資料4, p.9 Table 1～2, p.14 Figure 9～11）。

e. 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関して、GHB614、LLCotton25ともに、株当たりの収穫さく数、総さく数及びさく当たりの種子数について対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料1, p.11 表4; 別添資料3, p.14 表9）。

脱粒性に関して、ワタの種子は地毛が絡み合って分離しにくいため（文献55）、開じょしたさくから脱粒する可能性は低いと考えられる。GHB614については、隔離ほ場試験での調査において、対照の非組換えワタと同様に脱粒は認められなかった（別添資料1, p.8 表3）。また、LLCotton25については脱粒性の調査は行わなかったが、LLCotton25のさくの形態及び開じょ特性は対照の非組換えワタと相違ないことが確認されている（別添資料3, p.11～13）。

休眠性及び発芽率に関しては、GHB614及びLLCotton25のいずれも隔離ほ場で収穫した種子を用いて調査した。GHB614については、収穫直後及び室温条件下で3ヶ月間保管後の種子の発芽率を対照の非組換えワタと比較した結果、いずれも統計

学的有意差は認められず、3ヶ月間保管後の種子では両系統ともに96%以上の発芽率を示した（別添資料1, p.19 表9）。また、LLCotton25については、収穫後約1ヶ月間室温で保管した種子の発芽率を対照の非組換えワタと比較した結果、いずれも100%を示した（別添資料3, p.17 表11, p.18 表12）。

f. 交雑率

我が国にはワタと交雑可能な近縁種は自生していないことから、GHB614の交雑性試験は行わなかった。他方、LLCotton25については、参考までに、隔離ほ場試験においてLLCotton25と1mの隔離距離で栽培された非組換えワタとの交雑率について調査した結果、交雑が生じた可能性は認められなかった（別添資料3, p.17 表11）。

g. 有害物質の産生性

GHB614及びLLCotton25について、それぞれ後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。その結果、いずれも後作試験及び鋤込み試験における検定植物として使用したダイコンの発芽及び生育に関する調査項目、並びに土壌微生物の生菌数について、対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかった（別添資料1, p.16～18 表6～8 ; 別添資料3, p.22～28 表17～30）。

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

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

（2） 使用等の方法

――――

（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

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

GHB614及びLLCotton25の諸外国における申請・承認状況を表8に示した。なお、我が国におけるGHB614、LLCotton25及び本スタック系統の申請・承認状況は、表5（p.22）に示した。

表8　GHB614及びLLCotton25の諸外国における承認状況

国	規制機関	承認年月	
		GHB614	LLCotton25
米国	米国農務省（USDA）	2009年5月 安全性確認	2002年3月 安全性確認
	米国食品医薬品局（FDA）	2008年4月 安全性確認	2003年4月 安全性確認
カナダ	カナダ厚生省（Health Canada）	2008年4月 安全性確認	2004年8月 安全性確認
	カナダ食品検査局（CFIA）	2008年4月 安全性確認	2004年9月 安全性確認

（注：本表に記載された情報に関る権利及び内容の責任は申請者にある。）

第二　項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統は、GHB614とLLCotton25を掛け合わせて作出されたものであり、それぞれの特性を併せ持つ。GHB614が有する2mEPSPS蛋白質及びLLCotton25が有する改変PAT蛋白質はいずれも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。また、それぞれ異なる作用機作で独立して作用することから、これらの蛋白質が相互作用を示す可能性は低いと考えられた。実際に、本スタック系統における除草剤グリホサート耐性及び除草剤グルホシネート耐性の程度について、それぞれ親系統であるGHB614及びLLCotton25と比較した。その結果、標準使用量の8倍濃度の除草剤グルホシネートを散布した試験区において、本スタック系統とLLCotton25の間に統計学的有意差が認められたが、その他の除草剤グルホシネート散布区においては両系統の間に差異は認められず、8倍濃度の試験区で認められた差はこれらの蛋白質の相互作用によるものではないと考えられた。また、除草剤グリホサート散布区においては、いずれも本スタック系統と親系統の間に差異又は統計学的有意差は認められなかった（表6, p.27）。よって、本スタック系統の植物体内において、これらの蛋白質は相互作用を示していないと考えられた。

したがって、本スタック系統の生物多様性影響の評価は、GHB614及びLLCotton25を個別に調査した結果を用いて行った。

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

1　競合における優位性

（1）影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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

本スタック系統の親系統であるGHB614及びLLCotton25の競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期の低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率について調査を行った。その結果、形態及び生育の特性に関して、GHB614については栽培試験用種子の発芽率において対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた（別

添資料1, p.11 表4）が、両系統種子の採種地が異なり、非組換えワタの収穫前の天候不順が発芽率に影響したものと考えられた。また、隔離ほ場で収穫した種子の発芽率についてはGHB614と非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められなかったことから、栽培試験用種子の発芽率に認められた差は遺伝子組換えに起因するものではないと考えられた（別添資料1, p.19 表9）。また、LLCotton25については、幹長及び節数の4回の調査日のうちそれぞれ1回目及び2回目の調査日で、対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差が認められた。しかし、他の調査日では系統間に統計学的有意差は認められなかったことから、常に生ずる差ではないと考えられた（別添資料3, p.8 表3）。その他の形質について、GHB614及びLLCotton25のいずれも、対照の非組換えワタとの間に相違又は統計学的有意差は認められなかった。よって、GHB614及びLLCotton25において、これらの形質により競合における優位性が高まる可能性は低いと考えられた。

以上から、本スタック系統においても、これらの諸形質に関して競合における優位性が高まることはないと考えられる。

また、本スタック系統はGHB614由来の除草剤グリホサート耐性及びLLCotton25由来の除草剤グルホシネート耐性を有するが、自然環境下においてこれらの除草剤が散布されるような状況は想定し難いことから、これらの形質により競合における優位性が高まることはないと考えられる。

以上から、本スタック系統において、競合における優位性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（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

以上から、本スタック系統において、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

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

GHB614及びLLCotton25の種子には非組換えワタと同様に、非反芻動物に対して毒性を示すゴシポール及び飽和脂肪酸の脱飽和を阻害して鶏卵の変色やふ化率の低下を引き起こすシクロプロペン脂肪酸が含まれている。しかし、野生動物がワタの種子を摂食するという例は報告されていない。また、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

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

GHB614が有する2mEPSPS蛋白質は、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS活性が増大しても本経路の最終産物である芳香族アミノ酸は過剰に生成されないことが報告されている（文献38）。GHB614では2mEPSPS蛋白質の産生により既存のEPSPS蛋白質に加算してEPSPS活性が増大することが考えられるが、GHB614の種子におけるシキミ酸経路の最終生成物である芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）の含有量は、除草剤グリホサートの散布の有無にかかわらず、宿主品種Coker312の種子と比較して統計学的有意差は認められなかった（表4, p.17）。さらに、基質であるホスホエノールピルビン酸（PEP）及びシキミ酸-3-リン酸（S3P）に対する親和性に関して2mEPSPS蛋白質とEPSPS蛋白質を比較した結果、いずれもほぼ同等の*K*m値を示した（表3, p.16）ことから、2mEPSPS蛋白質はEPSPS蛋白質と同じ基質特異性を有すると考えられる。また、EPSPS蛋白質はPEP及びS3P以外にS3Pの類似体であるシキミ酸とも反応することが知られているが、EPSPS蛋白質とシキミ酸の反応性は低く（文献16）、高い基質特異性を有している。これらのことから、2mEPSPS蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼし、新たに有害物質を産生することはないと考えられる。

LLCotton25が有する改変PAT蛋白質は高い基質特異性を有しており、植物体内において基質であるグルホシネート以外の化合物にアセチル基を転移することはな

いと考えられている（文献42, 45）ことから、宿主の代謝系に影響して新たに有害物質を産生することはないと考えられる。

実際に、GHB614及びLLCotton25において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、両系統ともに、いずれの項目についても対照の非組換えワタとの間に統計学的有意差は認められず、新たに有害物質の産生性を獲得していないと考えられた（別添資料1, p.16～18 表6～8 ; 別添資料3, p.22～28 表17～30）。よって、本スタック系統が新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられる。

以上から、本スタック系統において、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（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

我が国において、ワタ（*G. hirsutum*）と交雑可能な近縁種野生種は自生していないため、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

（2） 影響の具体的内容の評価

---

(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

以上から、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

4　その他の性質

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

第三　生物多様性影響の総合的評価

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

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

GHB614が有する2mEPSPS蛋白質及びLLCotton25が有する改変PAT蛋白質はいずれも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。また、それぞれ異なる作用機作で独立して作用することから、本スタック系統においてこれらの蛋白質が相互作用を示す可能性は低く、実際に、生物検定により本スタック系統と各親系統の除草剤耐性程度を比較した結果、これらの蛋白質は相互作用を示していないと考えられた。

したがって、本スタック系統の生物多様性影響の評価は、GHB614及びLLCotton25を個別に調査した結果を用いて行った。

競合における優位性に関して、GHB614については2008年に、また、LLCotton25については2003年にそれぞれ我が国での隔離ほ場試験等において調査を行った結果、いずれも競合における優位性が高まる可能性を示唆する形質は認められなかった。

また、本スタック系統はGHB614由来の除草剤グリホサート耐性及びLLCotton25由来の除草剤グルホシネート耐性を示すが、自然環境下においてこれらの除草剤が散布されるような状況は想定し難いことから、これらの形質により競合における優位性が高まることはないと考えられた。

以上から、本スタック系統において、競合における優位性に起因する生物多様性影響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、ワタが他感物質のように野生動植物等の生息又は生育に支障を及ぼす物質を産生することは知られていない。

2mEPSPS蛋白質及び改変PAT蛋白質はいずれも既知の毒素及びアレルゲンとの相

同性は認められなかった。また、いずれの蛋白質も基質特異性が高いことから、宿主の代謝系に影響を及ぼし、新たに有害物質を産生する可能性は低いと考えられた。さらに、GHB614及びLLCotton25における後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験の結果、いずれの系統についても、新たに有害物質の産生性を獲得していないと考えられた。

以上から、本スタック系統が新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、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。

我が国には、ワタ（*G. hirsutum*）と交雑する可能性のある野生植物は自生していないことから、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

以上を総合的に評価し、本スタック系統を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

参考文献

社外秘情報につき非開示

別添資料の内容

別添資料 1　GHB614：隔離ほ場試験報告書（2008 年度）

社外秘情報につき非開示

別添資料 2　GHB614：網室試験報告書（2007 年度）

社外秘情報につき非開示

別添資料 3　LLCotton25：隔離ほ場試験報告書（2003 年度）

社外秘情報につき非開示

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

社外秘情報につき非開示

緊 急 措 置 計 画 書（食用・飼料用に供する場合）

平成 21 年 11 月 26 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　　ギャビン　マーチャント
住所　東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ワタ（*2mepsps,* 改変*bar*, *Gossyipum hirsutum* L.）（GHB614×LLCotton25, OECD UI: BCS-GHØØ2-5×ACS-GHØØ1-3）（以下、「本スタック系統」とする。）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合は、弊社は適切に当該影響を防止するため、以下の措置をとることとする。なお、生物多様性影響が生ずるおそれがあるとリスク評価において確認された場合とは、本スタック系統に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

1　第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

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	
（危機対策本部長）	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	バイエルクロップサイエンス株式会社
	Bayer CropScience, BioScience

2　第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は本スタック系統穀粒の我が国への輸入業者、我が国において本スタック系

統穀粒を配給した業者、輸入した本スタック系統穀粒の量及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ずるおそれに基づき、適切に、弊社は上記2で明らかにした本スタック系統穀粒の我が国への輸入業者及び我が国における配給業者に当該影響を防止するために適切な措置を講ずることを通知する。さらに、弊社は可能な限りにおいて本スタック系統穀粒を我が国に配給している、またはその可能性のある国の配給業者及び農業者団体に生物多様性影響が生ずるおそれが確認されたこと及び当該影響を防止する措置に関して通知する。

4　遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続するための具体的な措置の内容

確認された明らかな生物多様性影響が生ずるおそれに基づき、適切に、弊社は上記2及び3において示した個人または団体に対し、本スタック系統を不活性化する措置または本スタック系統の環境への放出を防止するための措置、並びに既に環境に放出された本スタック系統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

科学的根拠に基づき、本スタック系統が我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認められた場合には、速やかに、農林水産省農産安全管理課及び環境省野生生物課に連絡するとともに、緊急措置対応のための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。