

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等に係る実験計画報告書

2021年 9月 22日

文部科学省研究振興局ライフサイエンス課
生命倫理・安全対策室安全対策官 殿

氏名 国立研究開発法人
農業・食品産業技術総合研究機構
提出者 理事長 久間和生
住所 茨城県つくば市観音台3-1-1

ゲノム編集技術により得られた生物の使用等を行いたいので、次のとおり報告します。

ゲノム編集技術により得られた生物の名称	アラニンアミノ酸転移酵素を改変した穂発芽耐性コムギ (系統名 <i>Triticum aestivum</i> disrupted <i>TaQsd1_t1-1/WT_abd_1</i>)	
使用等の内容	ゲノム編集技術により得られたアラニンアミノ酸転移酵素を改変した穂発芽耐性コムギの野外栽培での検証 (限定されたほ場における栽培等)	
使用等をする場所	名称	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 1. 観音台第一事業場 高機能隔離圃場 2. 観音台第二事業場 隔離ほ場 3. 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場 国立大学法人 岡山大学 4. 倉敷キャンパス 実験ほ場 (「別紙 2-1, 2-2 限定されたほ場に関する情報」に詳細を記載)
	所在地	1. 茨城県つくば市観音台3-1-1 2. 茨城県つくば市観音台2-1-2 3. 茨城県つくば市観音台3-1-3 4. 岡山県倉敷市中央二丁目20-1
宿主の名称	コムギ (Wheat ; <i>Triticum aestivum</i>)	
宿主の自然環境における生理・生態学的特性	<p>生息・生育可能な環境の条件 ; 涼しい季節に栽培する作物で、25℃前後で生育が最も良好。最低3~4℃で発芽、32℃ほどが高温側の生育限度、低温側は、春小麦の実生は-5℃、冬小麦は-25℃ (Acevedo et al. 2002)。</p> <p>繁殖または増殖の様式 ; 種子繁殖する。自家受粉で、自然交雑率は1%未満 (Hucl and Matus-Cadiz 2001)。</p> <p>有害物質の産生性 ; 栄養阻害因子やアレルゲンの問題を除けば一般に有毒物質の産生性はないと考えられる。他感作用のあるヒドロキサム酸、フェノール酸、脂肪酸などの化学物質を環境に放出し、雑草の生育を妨げる制圧作物としての活用が報告されている (Aslam et al. 2017 Chemoecology 27, 1-24)。</p> <p>我が国における具体的な生息・生育域 ; 全国都道府県にわたって広く栽培され、年間約80万トンが生産されている。しかしながら、コムギ <i>Triticum aestivum</i> と自然環境で交雑可能な近縁野生種は自生してい</p>	

		<p>ない。</p> <p>上記は OECD コンセンサス文書を参照した。OECD コンセンサス文書は以下の URL の通り</p> <p>https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815608.pdf</p>
使用したゲノム編集技術の種類・導入方法		<p>使用した技術の種類； a. CRISPR/Cas9 (SpCas9)</p> <p>導入方法； c. 人工ヌクレアーゼ遺伝子を宿主のゲノムに挿入</p>
細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無		<p>移入した核酸の構成；別紙 1（1. 移入した核酸の構成に関する情報）参照。</p> <p>移入方法；アグロバクテリウム法 (Ishida et al. 2015)</p> <p>除去した方法；野生型への戻し交配による遺伝的分離により除去</p> <p>残存の有無を確認した方法； c. その他、NGS データ解析により外来遺伝子が検出されないことを確認した。別紙 1（4. 細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無について）参照。</p>
改変した遺伝子等	名称	<i>TaQsd1</i> (<i>Triticum aestivum</i> , quantitative trait locus on seed dormancy 1, Onishi et al. 2017 BMC Genomics, 18, 497)
	機能	<i>TaQsd1</i> は、その塩基配列から「アラニンアミノ酸転移酵素」をコードしており、その機能抑制により種子休眠が長くなる。この酵素が休眠を制御する仕組みは判っていない。
	予想される機能の変化	種子休眠が長くなることで、結果として種子の発芽抑制が予想される。
改変生物の形質の変化	当該改変により生じた変化	A、B および D ゲノムの <i>TaQsd1</i> 遺伝子のそれぞれの標的配列を解析した結果、すべて 1 塩基の挿入が生じ、フレームシフト変異により遺伝子機能が欠失していると考えられる。この改変に伴い、開花 60 日後の種子の 20°C における発芽試験では、50% の種子が発芽するのにかかる日数が、非編集型に比べて 5 日ほど遅延した。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照。
	上記以外に生じた変化	<p>種子休眠性以外の可視的な形質等（草姿、草丈、出穂日）の変化は観察されていない。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照。</p> <p>用いた gRNA 配列について、WheatCrispr (https://crispr.bioinfo.nrc.ca/WheatCrispr/) で Off-target 検索を行った結果、同祖遺伝子以外に完全一致の Off-target は存在しなかった。また、同ウェブサイトでは CRISPR/Cas9 により切断される効率の数値化において最もスコアの高い Off-target となりうる配列は、ミスマッチ数が 3 塩基であった。この配列をゲノム編集個体で解析したところ、Off-target 変異は確認されなかった。詳細は別紙 1（5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違）参照。</p>
生物多様性影響が生ずる可能性についての考察		<p>1. 競合における優位性</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定</p> <p><i>TaQsd1</i> は「アラニンアミノ酸転移酵素」をコードしており、その機能抑制によって種子休眠が長くなり、その結果、種子発芽が抑制された。</p>

休眠性が変化しても生活サイクル、繁殖様式、形態的、生理的特性が変わることはないと考えられる。なお、本ゲノム編集コムギを閉鎖系温室で栽培したところ、形態学的差異は観察されなかった。また、コムギは侵入性・雑草性が高い作物ではないため、畑地外へ進出して繁茂することは想定されず、本ゲノム編集コムギも形態的变化が確認されなかったことなどから、競合に関わる特性も従来のコムギと同等と推定される。栽培等に当たっては、植物体の散逸を防止するために特定のほ場内での栽培等に限定し、栽培管理を厳格に行う。

以上から、本ゲノム編集コムギは、ほ場の外部にある野生動植物等と競合することはない、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。

(3) 影響の生じやすさの評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

本ゲノム編集コムギを限定されたほ場で栽培等する場合、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ず、生物多様性への影響が生じ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

*TaQsd1*は「アラニンアミノ酸転移酵素」をコードしており、種子胚で特異的に発現している遺伝子である。このため、ゲノム編集個体で種子のアミノ酸組成などが若干変化する可能性は否定できないが、コムギに有害物質は知られていないことや *TaQsd1* が何らかの有害物質の産生に関与するという報告がないことから、*TaQsd1* の変異によって新たに有害物質が増強または産生されることは想定されない。同様に、他感作用のある物質についても、種子胚で特異的に発現する遺伝子の改変によって新たに増強または産生されることは想定されない。

以上から、本ゲノム編集コムギを限定されたほ場で栽培する場合、有害物質の産生により影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されない。

(2) 影響の具体的内容の評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。

(3) 影響の生じやすさの評価

影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。

	<p>(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 本ゲノム編集コムギを限定されたほ場で栽培等する場合、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ず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。</p> <p>3. 交雑性</p> <p>(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 コムギは自殖性の作物であり、日本国内では、同属の野生植物は自生しておらず、そのほかに自然環境で交雑可能な近縁野生植物は国内に存在しない。 以上のことから、本ゲノム編集コムギ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い。</p> <p>(2) 影響の具体的内容の評価 影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。</p> <p>(3) 影響の生じやすさの評価 影響を受ける可能性のある野生動植物等が特定されないことから、非該当。</p> <p>(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 本ゲノム編集コムギを限定されたほ場で栽培等する場合、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ず、生物多様性への影響が生じるおそれはないと判断した。</p> <p>生物多様性影響の総合的評価 本ゲノム編集コムギについては、限定されたほ場で栽培等するものであり、持出しを防止する施設・措置を講じるため、ほ場の外部にある野生動植物等と競合することはないと考えられる。有害物質産生性については、本ゲノム編集コムギにおいて新たな有害物質が産生されることは想定されない。交雑性については、コムギと交雑する近縁野生種が我が国には存在しない。 以上を総合的に評価し、本ゲノム編集コムギを限定されたほ場において栽培等した場合には、生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。</p>						
緊急連絡先	<table border="1"> <tr> <td data-bbox="293 1682 491 1957">所属機関の名称及び職名</td> <td data-bbox="491 1682 1444 1957"> 1. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究部門 研究推進部研究推進室 研究推進室長 2. 国立大学法人 岡山大学 資源植物科学研究所 教授 </td> </tr> <tr> <td data-bbox="293 1957 491 2002">氏名</td> <td data-bbox="491 1957 1444 2002"></td> </tr> <tr> <td data-bbox="293 2002 491 2045">住所</td> <td data-bbox="491 2002 1444 2045">1. 郵便番号 305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2</td> </tr> </table>	所属機関の名称及び職名	1. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究部門 研究推進部研究推進室 研究推進室長 2. 国立大学法人 岡山大学 資源植物科学研究所 教授	氏名		住所	1. 郵便番号 305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2
所属機関の名称及び職名	1. 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 作物研究部門 研究推進部研究推進室 研究推進室長 2. 国立大学法人 岡山大学 資源植物科学研究所 教授						
氏名							
住所	1. 郵便番号 305-8518 茨城県つくば市観音台 2-1-2						

		2. 郵便番号 710-0046 岡山県倉敷市中央二丁目 20-1
		電話番号
		メールアドレス
緊急時の対応	<p>生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合は、緊急措置を講じた後、速やかに文部科学省研究振興局ライフサイエンス課生命倫理・安全対策室及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。</p>	
その他	<p>当該生物の取扱いについて検討する委員会の設置状況：農研機構 ゲノム編集委員会にて検討を行った。</p> <p>委員長名：（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構企画戦略本部新技術対策課 課長）</p> <p>検討日：令和3年4月23日</p> <p>当該生物の不活化処理の具体的な措置内容：不活化を行う場合は、試験終了後、地上部及び地下部を取り出し、オートクレーブ又は焼却炉等を用い確実に不活化する。</p>	

別紙1 移入した核酸、細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無、宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違についての詳細情報

1. 移入した核酸の構成に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

本ゲノム編集コムギの作出に用いられた供与核酸の発現カセットの構成及び構成要素の由来を表1に、またベクターマップを図1に示した。

表1 ゲノム編集に使用した核酸のサイズ、由来及び機能

構成要素	サイズ	由来及び機能
RB	26 bp	由来；アグロバクテリウム、リゾビウム属に属する細菌。多くの双子葉植物に感染し、癌腫病を起こす。 機能；T-DNA の right border (RB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を開始させる。
gRNA (ガイド RNA) 発現カセット (発現カセット 1)		
OsU6-P	250 bp	由来；イネ。イネ科の作物で、世界三大穀物の一つ。 機能；RNA polymerase III (pol III) 系のプロモーターとして、短い RNA の転写を誘導する。
gRNA (ガイド RNA)	100 bp	以下の二つの配列を結合したもの 標的配列 由来；コムギ。イネ科の作物で、世界三大穀物の一つ。 機能；DNA の二本鎖切断を誘発する位置を特定する 20 塩基の配列。 gRNA common 由来；Streptococcus pyogenes、レンサ球菌属に属する細菌。健康なヒトの咽頭や消化管、表皮にも生息する常在細菌の一種。 機能；Cas9 タンパク質との複合体を形成するために必要な足場となる配列。
PolyT	7 bp	由来；合成 機能；T の繰り返し配列により pol III 系のプロモーターによる転写を終結させる。
Cas9 発現カセット (発現カセット 2)		
ZmUbi-P	2.0 kb	由来；トウモロコシ。イネ科の作物で、世界三大穀物の一つ。 機能；トウモロコシのユビキチン遺伝子のプロモーター領域

		から第1エクソン、第1イントロン、第2エクソンの非翻訳領域までを含む配列で、単子葉植物で下流の遺伝子を強力に発現させる。
OsADH5'	100 bp	由来；イネ（前出）。 機能；アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子5'非翻訳領域に存在する。下流の遺伝子の翻訳効率を増強する。
NLS	50 bp	由来；Simian virus40、ポリオーマウイルス科のウイルス。DNA ウイルスで、DNA の複製や転写の仕組みの解明に大きく寄与した。 機能；T-抗原遺伝子の核移行シグナル配列で、連結されたタンパク質（ここでは Cas9）が翻訳された後に核へ運ばれる。
SpCas9	4.1 kb	由来；Streptococcus pyogenes（前出）。 機能；Cas9ヌクレアーゼ遺伝子。Cas9ヌクレアーゼはgRNAと複合体を形成して、gRNAに含まれる標的配列を認識してDNA二本鎖を切断する。
rbc3A-T	470 bp	由来；エンドウ、マメ科の一・二年草。広く栽培され、食用となっている。 機能；炭素固定に関わる酵素ルビスコの複合体を構成する小サブユニットの一つの遺伝子、rbc3A遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
OsAct1-T	1.3 kb	由来；イネ（前出） 機能；イネのアクチン遺伝子のターミネーター配列。転写を終結させる。
hpt 発現カセット（発現カセット3）		
35S-P	830 bp	由来；カリフラワーモザイクウイルス、カリモウイルス科に属する植物ウイルス。主にアブラナ科植物に感染し、モザイク症を引き起こす。 機能；35SRNAのプロモーター領域。下流の遺伝子を強力に発現させる。
hpt	1.0 kb	由来；大腸菌、腸内細菌科に属する細菌。温血動物の消化管内に生息する。 機能；ハイグロマイシンリン酸基転移酵素（hygromycin phosphotransferase）。翻訳産物が抗生物質ハイグロマイシンBを解毒する。選抜マーカー。
Oshsp17.3-T	1.1 kb	由来；イネ（前出） 機能；イネのヒートショックタンパク質 17.3 遺伝子のター

		ミネーター配列。転写を終結させる。
LB	25 bp	由来；アグロバクテリウム（前出） 機能；T-DNA left border (LB) 配列。T-DNA の切り出しと転移を終結させる。

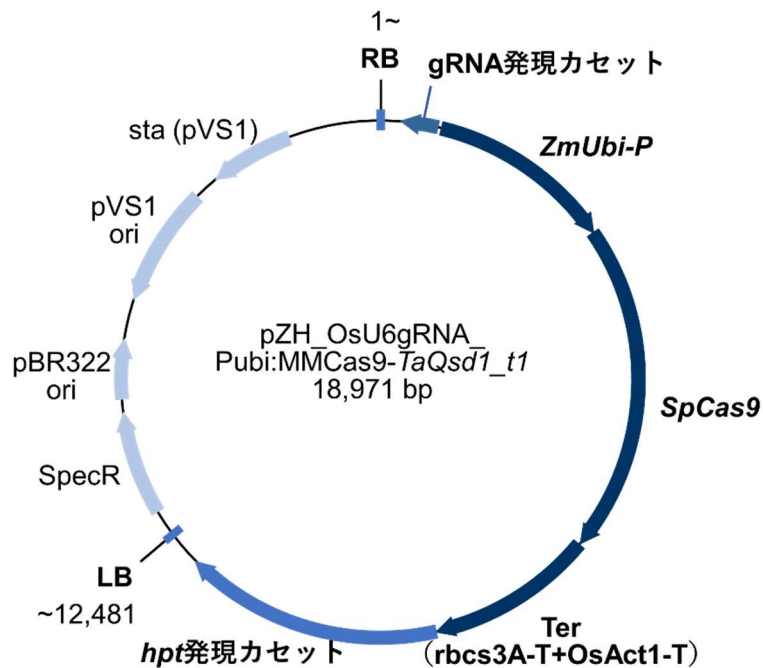


図 1. *TaQsd1* 遺伝子の標的変異を導入するために用いたベクターのマップ

RB と LB に挟まれた T-DNA 領域の構成要素の詳細は表 1 のとおり。ベクターバックボーンには、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) と大腸菌の複製開始点である pVS1 ori と pBR322 ori、プラスミドの安定化に寄与する *sta*(pVS1)、ストレプトマイシン耐性遺伝子 (SpecR) を保持する。

(2) 構成要素の機能

表 1 に示した発現カセット 1 と発現カセット 2 の働きにより、gRNA と Cas9 タンパク質が産生され、その複合体が標的配列の切断（ゲノム編集）を行う。また、発現カセット 3 の働きにより、抗生物質ハイグロマイシン B に耐性となり、ハイグロマイシン B を含む培地上での T-DNA 配列を保持するカルス増殖、再分化が可能となり、遺伝子組換え植物体の選抜が可能となる。

(3) CRISPR/Cas9 システムについて

外来の DNA 配列を認識して切断する原核生物の免疫機構の仕組みを利用している。このシステムでは gRNA と呼ばれる標的となる 20 塩基の配列を一部に含む核酸と、Cas9 と呼ばれるタンパク質との複合体が、DNA 上を移動して、PAM 配列（5' 側から NGG の順；N は任

意の塩基, G はグアニン) を認識し、そのすぐ上流が標的となる 20 塩基と一致する場合に、PAM 配列の上流 3 塩基目と 4 塩基目の間で二本鎖 DNA を切断する (図 2)。通常、切断された DNA は正確に修復されて標的配列が復元し、何度も切断と修復を繰り返すこととなる。その間、まれに修復の過程でミスが起こって配列が変化することがある。そうすると標的は認識されなくなり、以後の切断が起こらないため、生じた配列の変化が遺伝子変異として固定される。

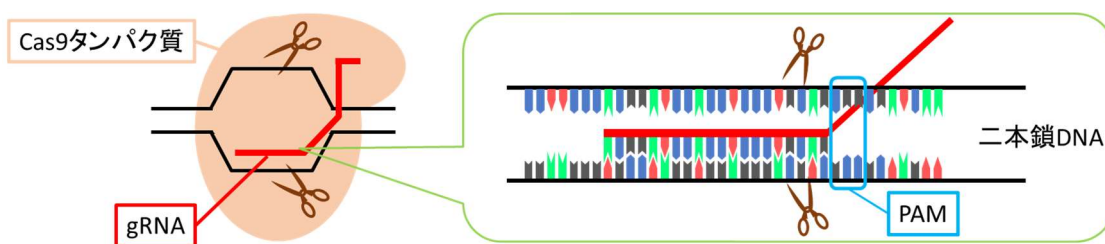


図 2 CRISPR/Cas9 システムによる二本鎖 DNA の切断

二本鎖 DNA (黒線) 上を gRNA と Cas9 の複合体が移動し、gRNA 内の標的となる 20 塩基の配列と一致する部位で二本鎖 DNA を切断する。

本ゲノム編集コムギの作出にあたっては、CRISPR/Cas9 システムを利用し、標的配列として *TaQsd1* 遺伝子 (後述) の第 14 エキソンの A, B 及び D ゲノムで、配列が共通する領域に gRNA の標的配列を設計した (図 3)。この変異誘発により各同祖遺伝子の PAM 配列の 3 塩基上流部位に 1 塩基の挿入が生じ、トリプレットコドンの読み枠がずれることにより C 末端側の 80 残基が変化している (図 4)。

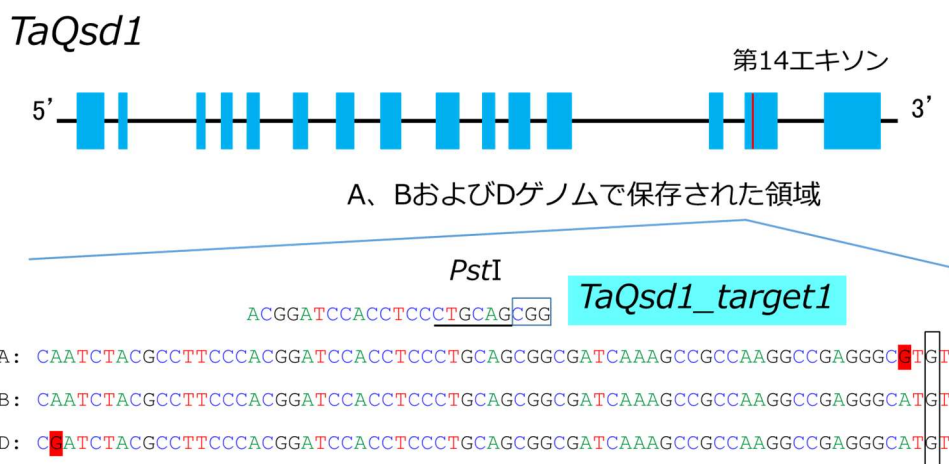


図 3 *TaQsd1* 遺伝子の構造と標的とした配列

TaQsd1 遺伝子は 15 個のエキソンからなるオオムギの QTL (Quantitative Trait Locus) の原因変異の一つ (黒枠 G) が存在する第 14 エキソンで、A, B 及び D ゲノムで完全に一致する 20 塩基を標的配列 (*TaQsd1_target1*) とした。青枠は PAM 配列、赤ハイライトは各サブゲノム間で異なる塩基を示す。PAM 配

列の上流には制限酵素の *PstI* の認識サイトがあるため、標的部位を含む PCR 増幅断片は、変異が生じた場合に *PstI* で切断されず、変異の有無が検出できる。

A

```

MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVASGIAARDGFFSRPEDIFLTD
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVASGIAARDGFFSRPEDIFLTD
GASSAINLSMQILIRSQEDGVLCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
GASSAINLSMQILIRSQEDGVLCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
AMVIINPGNPTGQVLSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDRKFHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
AMVIINPGNPTGQVLSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDRKFHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPAAAIKAAKAEVSPDMFYACRLLDATGIAVVPGSFGHQVS
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPSGDQSRQGRGVPRHVRVLPVPSRRHRDRRCPWLWIFPGV
GRNKATGTCHIRCTILPGEDIKEMI PRLKEFHESFMNEFRDRS*
WAQQGHRDMAYPVHDPFRRGQDQDDPAPQGVPRVLRHERVPRPKLMCIFS YTSHRPVRALKAV*

```

B

```

MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVANGIAARDGFFSRPEDIFLTD
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVANGIAARDGFFSRPEDIFLTD
GASSAINLSMQILIRSQEDGILCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
GASSAINLSMQILIRSQEDGILCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
AMVIINPGNPTGQALSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDKFKHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
AMVIINPGNPTGQALSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDKFKHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPAAAIKAAKAEVSPDMFYACRLLDATGIAVVPGSFGHQVS
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPSGDQSRQGRGVSRHVRVLPVPSRRHRDRRCPWLWIFPGV
GRNKATGTWHIRCTILPGEDIKAMI PRLKEFHESFMNEFRDRS*
WAQQGHRDMAYPVHDPFRRGQDQDDPAPQGVPRVLRHERVPRPKLMRTFTYTSHRPVRAPKV*

```

D

```

MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
MSYNKTASITAEINPKVKIFDYEPCEGIARHAERLEQEMEKSPGSRPFPEITYCNLGNPQALGQRPITFFREVL
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVASGIAARDGFFSRPEDIFLTD
SLCDNPALLRRDETRMLFSPCAINRARKIIESMPGRNSGAYTNSQGIRSLREAVASGIAARDGFFSRPEDIFLTD
GASSAINLSMQILIRSQEDGVLCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
GASSAINLSMQILIRSQEDGVLCPLEYPYLSASIIHLGGTMVFNLSLSEDGWGLEIFEVKRCLEEARIAGLTVR
AMVIINPGNPTGQVLSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDRKFHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
AMVIINPGNPTGQVLSITNQEIEIVEFCRKEGLVLADEVYQDNVYVEDRKFHSPFKKVARSLGYDENDISIVSFHS
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
VSMGFSGECGRRGGYMEICGFGDDVMGEIRKVASVTLCPNIGGQILTSLAMDPKLDGDCGFENFMAEKEDIRLSL
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPAAAIKAAKAEVSPDMFYACRLLDATGIAVVPGSFGHQVS
AKRAKTLSSAFSSLEGMTCNKVEGAIYAFPRIHLPSGDQSRQGRGVSRHVRVLPVPSRRHRDRRCPWLWIFPGV
GRNKATGTWHIRCTILPGEDIKMI PRLKEFHESFMNEFRDRS*
WAQQGHRDMAYPVHDPFRRGQDQDNDPAPQGVPRVLRHERV*

```

図4 推定アミノ酸配列

A、B および D ゲノムの *TaQsd1* の推定アミノ酸配列。上段が野生型、下段がゲノム編集型で両者で異なるアミノ酸残基をゲノム編集型において赤字で示した。

(4) *TaQsd1* 遺伝子について

Qsd1 (quantitative trait locus on seed dormancy 1) 遺伝子は、オオムギの主要な種子休眠性 QTL の原因遺伝子として同定され、アラニンアミノ酸転移酵素をコードしており、種子胚特異的に発現している遺伝子である。オオムギにおいて、形質転換技術を用いてその発現抑制体を作成すると種子休眠が長くなる (Sato et al. 2016, Nature Commun. 7:11625)。この遺伝子の発現が抑制されることにより種子休眠が長くなるメカニズムについては解明されていない。オオムギの *Qsd1* 配列に基づいてコムギの3つのサブゲノムにおける *Qsd1* 同祖遺伝子 (*TaQsd1-A*, *B*, *D*) の配列を解析し (Onishi et al., 2018, BMC Genomics 18:497)、ゲノム編集技術を用いて3つの *TaQsd1-A*, *B*, *D* をそれぞれ機能欠失させた8つの組合せの

変異体を作成して解析を行った。その結果、3つの *TaQsd1-A*, *B*, *D* の全てが機能欠失した3重変異体で初めて種子の休眠が長くなることが明らかとなった。ゲノム編集により *TaQsd1-A*, *B*, *D* の機能を欠失させた変異体は、閉鎖系温室における栽培で、他の形質の変化は観察されていない。

2. ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

pZH_OsU6gRNA_ZmUbi:MMCas9_HPT (由来の詳細は、次項に記載)

(2) 特性本ベクターの基となった pZH_OsU6gRNA_ZmUbi:MMCas9_HPT のベクターバックボーン領域の由来は pPZP202 (Hajdukiewicz et al. 1994, Plant Mol. Biol. 25: 989-994) である。pPZP202 は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) の DNA 複製開始点 pVS1 ori (oriV) と大腸菌の DNA 複製開始点 pBR322 ori を持つ2本鎖環状 DNA であり、微生物においてストレプトマイシン耐性を発現し、アグロバクテリウム及び大腸菌に伝達される。本ベクターを有するアグロバクテリウムの感染により、基本的には右側境界配列 (RB) と左側境界配列 (LB) に挟まれた領域の DNA (T-DNA 領域) が宿主植物の染色体に伝達される。T-DNA 領域以外には植物で機能する発現カセットは存在しない。植物に移入されゲノムに組み込まれた核酸のみが後代に遺伝・維持される。

3. ゲノム編集生物の調製方法

(1) コムギ細胞内に移入された核酸全体の構成

バイナリーベクターの構成要素は表 1 に記載した。また、ベクター内での T-DNA 領域における供与核酸の構成要素の位置を、図 5 に示した。



図 5 本ゲノム編集コムギ作出に用いた形質転換用ベクターの T-DNA 領域にある発現カセットの構造 (各構成要素は表 1 参照)

(2) 遺伝子組換え生物等の育成の過程

アグロバクテリウム法 (Ishida et al. 2015, Methods Mol. Biol. 1223: 189-198) により行った。形質転換能の高い品種「Fielder」を育成し、開花約 2 週間後の未熟胚にアグロバクテリウムを感染させ、2 日間感染培地上で共存培養した後、ハイグロマイシンを含むカルス誘導培地で選抜培養した後、植物体を再生させ、T-DNA が宿主植物のゲノムに組み込まれた遺伝子組換え体を得た。共存培養後の選抜培養、再分化の行程において、アグロバクテリウムの除菌のため、カルベニシリンを含む培地を用いた。再分化シュートより DNA を抽

出し、標的領域を含む部位を PCR で増幅した後、標的部に認識配列が存在する制限酵素 *PstI* で切断を行い、制限酵素で切断されない（変異が導入された）個体を選抜した。以降の各個体の *TaQsd1* 遺伝子の遺伝子型について、A、B および D ゲノムの *TaQsd1* の野生型をそれぞれ *TaQsd1-A*、*TaQsd1-B* および *TaQsd1-D*、編集型を *TaQsd1-a*、*TaQsd1-b* および *TaQsd1-d* とした場合、全て野生型ホモの個体（*TaQsd1-A TaQsd1-A TaQsd1-B TaQsd1-B TaQsd1-D TaQsd1-D*）の遺伝子型を *AABBDD* と表記し、全て編集型ホモの個体（*TaQsd1-a TaQsd1-a TaQsd1-b TaQsd1-b TaQsd1-d TaQsd1-d*）の遺伝子型を *aabdd* と表記する。ゲノム編集された *TaQsd1* の遺伝子変異は、A、B および D ゲノムの標的領域をそれぞれ含む部位を PCR で特異的に増幅した後、大腸菌にクローニングして塩基配列を確認した。A、B および D サブゲノム全てに変異導入が確認された個体#1（遺伝子型：*aaBbdd*）が得られ、この個体と「Fielder」（*AABBDD*）との F1 世代 158 個体中、11 個体は T-DNA 領域に座する *hpt* と *Cas9* が PCR 法で増幅されず、導入遺伝子が遺伝的分離により抜け落ちているとみられた。この分離比（147:11）は導入遺伝子が 4 遺伝子座に存在することを示しており、この 11 個体のうち 3 個体は各同祖遺伝子の変異がヘテロ型（*AaBbDd*）を示した（図 6）。*AaBbDd* (WT/#1_136) の自殖種子からは、非編集型も含めた全 8 つの組合せの編集ホモ型（*AABBDD*, *aaBBDD*, *AAbbDD*, *AABBdd*, *aabbDD*, *AAbbdd*, *aaBBdd*, *aabdd*）が 1/64 の確率で出現し、これらを一度に複数個体ずつ選抜することができた（図 6）。図 6 に示した 8 個体の F2 に稔った F3 種子を播種して栽培し、その F3 個体に稔った F4 種子を用いて発芽試験による形質評価を行った（後述）。

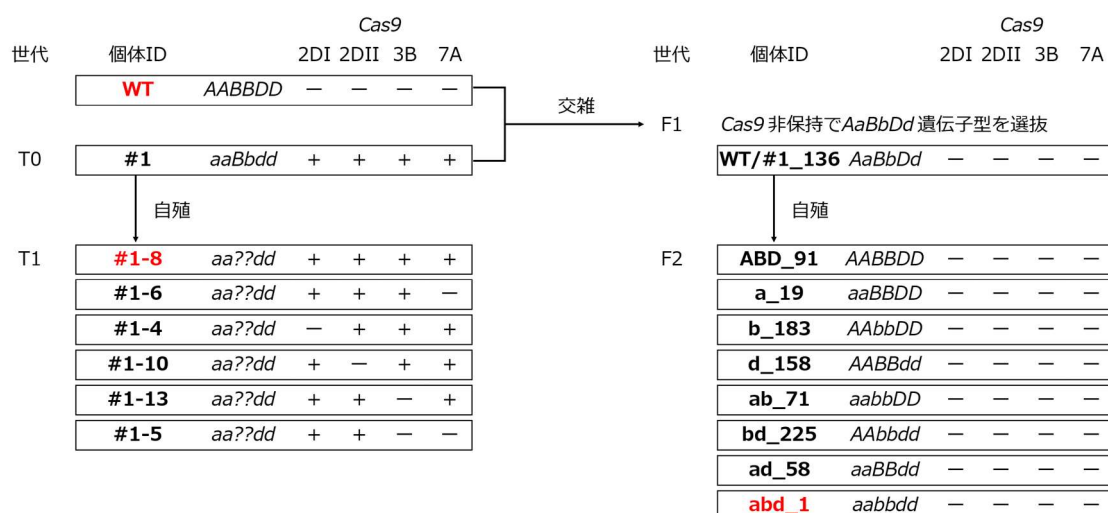


図 6 ゲノム編集系統の系譜

各個体の情報について、四角で囲われた中に、個体 ID、*TaQsd1* の遺伝子型、導入された 4 ヶ所の *Cas9* の有無について示した。*TaQsd1* の遺伝子型は、A、B および D ゲノムの遺伝子について、それぞれの小文字が編集型、大文字が野生型を示す。赤字（WT、#1-8、abd_1）は、NGS データを取得した個体。

4. 細胞外で加工した核酸の移入・残存の有無について

アダプターPCR法を用いて T-DNA の隣接するコムギゲノム配列を取得することで、#1 個体での外来遺伝子のコムギゲノムへの組み込み位置は、2D 染色体に 2 ヶ所、3B 染色体に 1 ヶ所、7A 染色体に 1 ヶ所の合計 4 ヶ所であることが推定された (図 7A)。そこで、それぞれ 4 ヶ所の導入遺伝子を区別して増幅することのできる PCR プライマーを作成して (図 7B)、「Fielder」(WT)、ヌルセグリガント (abd_1)、T1 各個体 (図 6) における 4 ヶ所の導入遺伝子の有無を解析した結果、ヌルセグリガントとして選抜したゲノム編集系統では、4 ヶ所に導入された T-DNA 配列は遺伝分離によって除去されていることが示された (図 7C)。

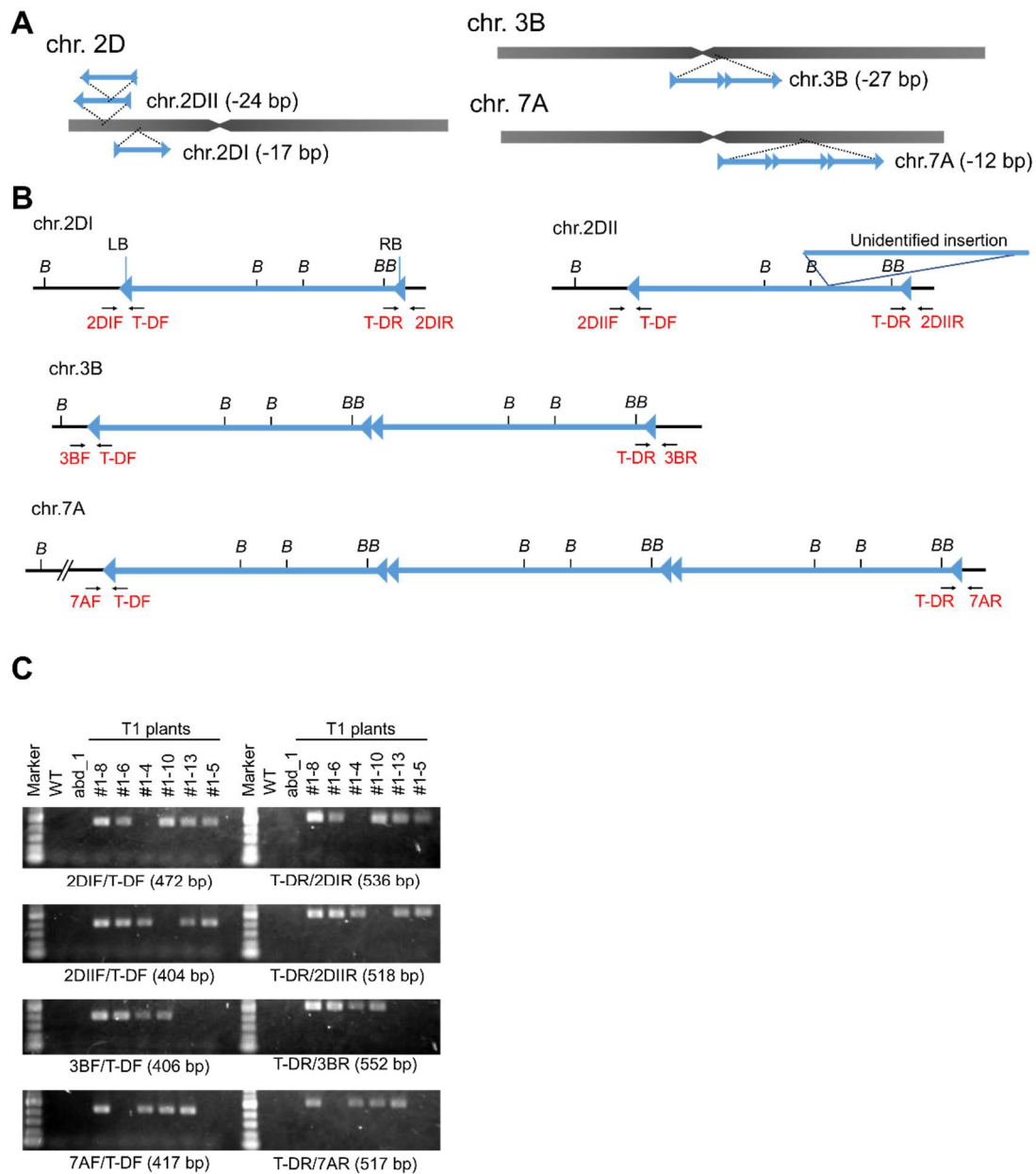


図 7 ゲノム編集系統作成において用いた T-DNA の挿入位置の特定

A. リファレンスゲノムの配列との比較より同定された染色体上の T-DNA 挿入位置。2D 染色体の短腕に 2ヶ所、3B と 7A 染色体の長腕に 1ヶ所ずつ特定された。T-DNA 挿入時に欠失したと考えられる塩基数をそれぞれ示した。B. T-DNA の挿入位置に作出したプライマー。位置を矢印で名称を赤字で示した。C. 「Fielder」(WT)、ヌルセグリガント (abd_1)、T1 各個体における同定した 4ヶ所の挿入位置の T-DNA 保持・非保持の確認。

次に、全ゲノムショットガンシーケンシングによって、外来遺伝子の配列断片の有無を確認した。WT、abd_1、T1 個体 (#1-8) のゲノム DNA から、各々インサート長を 400~500bp とするライブラリーを調整し、Illumina HiSeq(X)によってそれぞれゲノムサイズの約 33 倍量の配列データを取得した。解読配列を K-mer 法 (Itoh et al. 2020, Sci. Rep. 10: 4914) により解析したところ、NGS ライブラリーを作成する際の試薬からのベクター配列の混入であることが示されている共通の部位 (図 8D の*のある領域)、コムギのゲノム配列とベクター配列が 20 塩基分完全に一致している 3ヶ所 (図 8D の I に 2ヶ所、II に 1ヶ所) 以外に WT と abd_1 の有意差は検出されなかった (図 8)。以上の解析結果によって、abd_1 では導入した外来遺伝子は遺伝分離によって取り除かれており、ベクターの部分断片もゲノム上に残存していないことが示された。

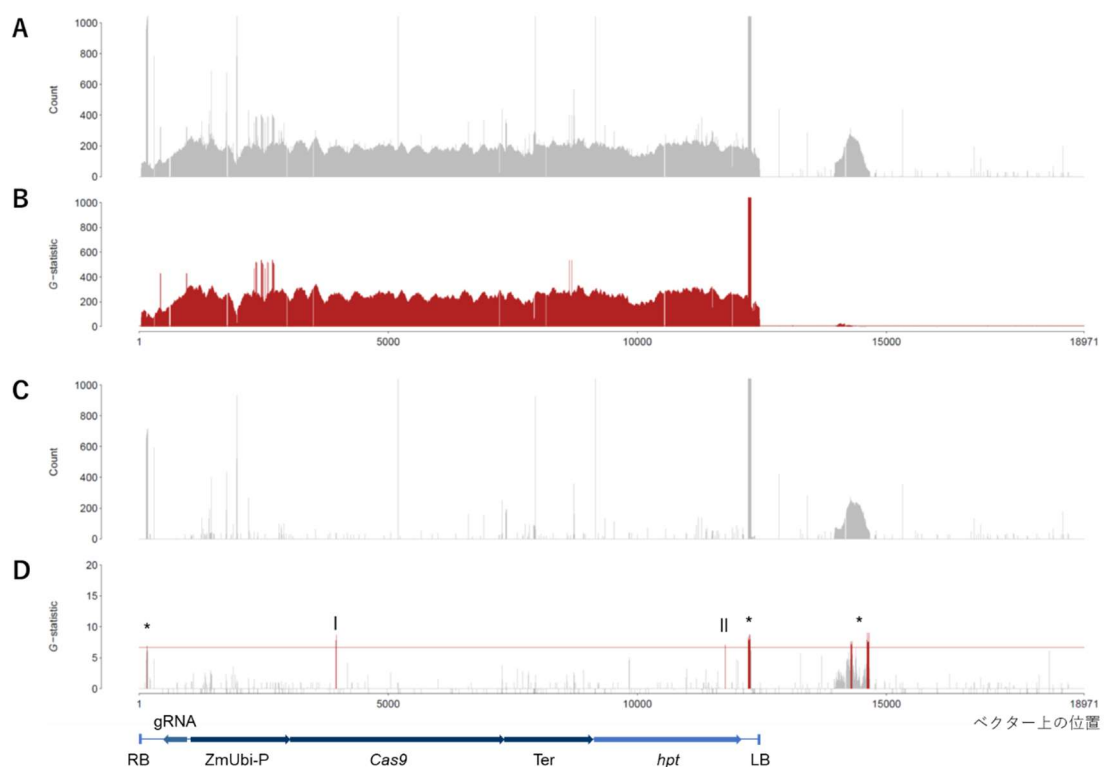


図 8 K-mer 法によるヌルセグリガントの外来遺伝子残存性の検証

A. T1 個体 (#1-8) のベクター配列上にマッピングされた NGS データのリード数。#1-8 は #1 の自殖後代で 4

つの遺伝子座に導入された Cas9 遺伝子が分離除去されずに全て残っている系統で、外来遺伝子が残存しているコントロールとして用いた。B. #1-8 と WT のリード数の比較による G-検定値。C. ヌルセグリガント (abd_1) のベクター配列上にマッピングされた NGS データのリード数。D. abd_1 と WT のリード数の比較による G-検定値。G-検定値が 6.634 以上の場合 1%水準で有意に差があることを示す。横軸はベクター上の位置で、対応する T-DNA のマップを下に示した。abd_1 と WT との G-検定値が 6.634 を超えている部分について、Itoh et al. (2020) において試薬からのベクター配列の混入によりピークが検出されている部位を *で、コムギのゲノム配列と完全に一致している部位を I, II で示した。

5. 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

(1) 導入された遺伝子変異

ゲノム編集された *TaQsd1* の遺伝子変異は、A、B および D ゲノムの標的領域をそれぞれ含む部位を PCR で特異的に増幅した後、大腸菌にクローニングして塩基配列を確認した。変異は全て 1 塩基挿入で、世代促進において *TaQsd1-A* には A (アデニン)、*TaQsd1-B, D* には T (チミン) の挿入変異がホモで固定されている。この 1 塩基の挿入により、コードするアミノ酸配列が図 4 のように変化していると考えられる。

また、gRNA 配列について、WheatCrispr (<https://crispr.bioinfo.nrc.ca/WheatCrispr/>) で Off-target 検索を行った結果、同祖遺伝子以外に完全一致の Off-target は存在しなかった。同ウェブサイトでは CRISPR/Cas9 により切断される効率の数値化されたスコア (cfd) 順で cfd スコアが 1 の標的配列と、Off-target となりうる配列の上位 9 種の配列を表 2 に示した。Off-target となりうる配列の最上位のサイトでは mismatches が 3 塩基であり、このサイトについて WT、T1 個体 (#1-8, #1-6, #1-4, #1-10, #1-13, #1-5)、ヌルセグリガント (abd_1) のゲノム DNA より PCR 法により該当領域を増幅して塩基配列を解析したところ、Off-target 変異は確認されなかった。

表2 オフターゲットとなり得る配列の検索結果

WheatCrispr				
	protospacer	pam	cfid	mismatches
1	ACGGATCCACCTCCCTGCAG	GG	1	0
2	ATAGATTCACCTCCCTGCAG	GG	0.553977273	3
3	ACGGAACGTCTCCCTGCAG	GG	0.475816994	4
4	ATAGATCAACCTCCCTGCAG	GG	0.443181818	3
5	ATGGCACCACCTCCCTGCAG	GG	0.393939394	3
6	ACGGATCCAACGCTCAGCAG	GG	0.288888889	4
7	ACGGAGCGACCCCTCCTGCAG	GG	0.243609022	4
8	ATAGATCCACTTCCCTGCAG	GG	0.20979021	3
9	ACGGATCCACCACCTGAAA	GG	0.183938026	4
10	ATGGATCAACTTCCCTGCAG	GG	0.181818182	3

(2) 導入された遺伝子変異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

作出した各編集ホモ型 (*AABBDD*, *aaBBDD*, *AAbbDD*, *AABBdd*, *aabbDD*, *AAbbdd*, *aaBBdd*, *aabddd*) を閉鎖系の人工気象室内で育成して種子休眠性を評価した。生育中の草姿、草丈、開花日については、各編集ホモ型の8系統間で明確な差異は見られなかった (図9、表3)。開花までの日数については、生育の早い系統と遅い系統で有意差が検出されたが、異なる繰り返し実験では別の系統間で有意差が検出されるなど編集遺伝子型による影響ではないと考えられた。続いて、F3植物体に稔ったF4種子を用いて発芽試験を行った。1穂 (10粒) ×各個体2穂×1ポット6個体の計120粒について4ポット分の反復を設けた。20°Cで発芽率50%に到達する日数は、三重変異体 (*aabddd*) では11日であるのに対し、その他の遺伝子型は5日から6日と約半分の期間であった (図10A, 10B)。Tukey法での統計解析の結果、7日目の発芽率は三重変異体 (*aabddd*) でのみ他の系統との間に有意差が確認された。また、実際の栽培環境に近づけるため、穂についてそのまま加湿して発芽試験を行ったところ、三重変異体 (*aabddd*) と非編集型 (*AABBDD*) の間に明確な差異が観察された (図11)。このように、*TaQsd1* の三重変異体 (*aabddd*; *TaQsd1_t1-1/WT_abd_1*) でのみ種子休眠性が長くなることが観察された。閉鎖系の育成室内で観察されたゲノム編集系統の種子休眠性が長くなる形質が、実際の栽培においてどこまで再現されるか確認するため、*TaQsd1_t1-1/WT_abd1* の後代系統を限定されたほ場内で栽培し、野外の登熟環境での種子休眠性を複数年にわたり評価する。



AABBDD *AAbbDD* *aabbDD* *aaBBdd* —
aaBBDD *AABBdd* *AAbbdd* *aabbdd*

図9 *TaQsd1* 遺伝子のゲノム編集系統の開花2週間後の各編集ホモ型固定個体の草姿
 右下のスケールは10cm

表3 発芽試験のために育成した各遺伝子型のF3植物体の草丈と開花までの日数

遺伝子型	草丈 (cm)	開花までの日数 (日)
<i>AABBDD</i>	65.21±3.87	69.3±2.5
<i>aaBBDD</i>	60.04±4.67	68.8±2.2
<i>AAbbDD</i>	61.90±3.50	68.2±2.5
<i>AABBdd</i>	60.55±4.04	69.2±1.6
<i>aabbDD</i>	60.54±4.28	69.4±1.9
<i>AAbbdd</i>	62.17±4.43	71.9±1.5
<i>aaBBdd</i>	61.96±4.62	69.5±1.4
<i>aabbdd</i>	63.49±3.88	67.4±1.7

平均値±標準偏差。Tukey 検定 (n=12) により、草丈は有意差なし。開花までの日数は、早かった *aabbdd*、*AAbbDD* と最も遅かった *AAbbdd* の間で有意差が検出された。

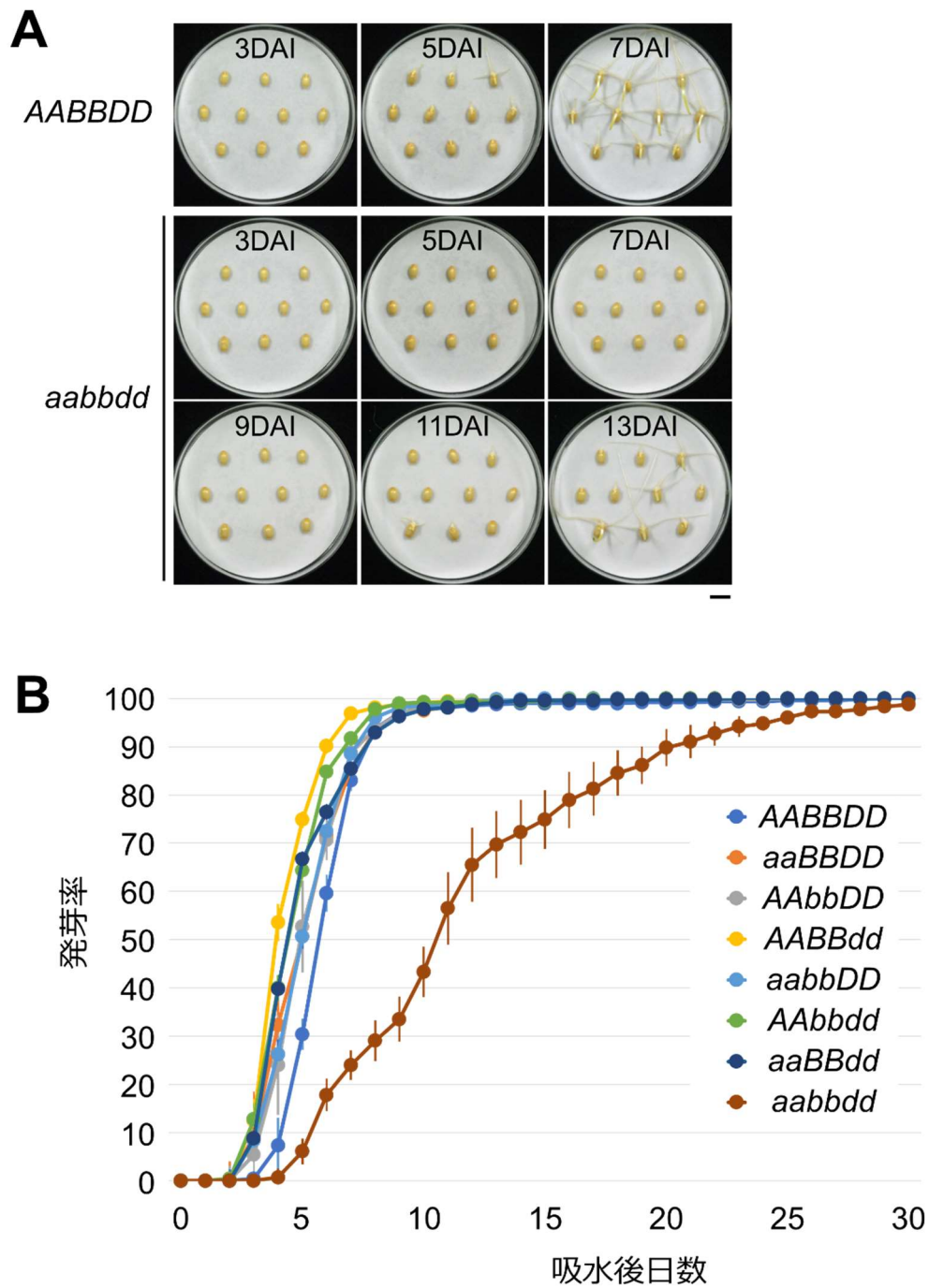


図 10 シャーレでの発芽試験における発芽の様子 (A) と発芽率の推移 (B)
 開花 60 日後の穂を刈り取り、穂の中央部 10 粒の種子で、20℃暗黒で発芽させた。A 右下のスケールは 1cm。



図 11 穂を立てた条件での発芽試験

開花 60 日後の穂を刈り取り、密閉した容器内に穂を立て、毎日 2 回霧吹きで濡らして発芽させた。20℃暗黒 5 日後、20℃12 時間日長に移して 7 日後の様子。右下のスケールは 1cm。

(3) その他の生理学的又は生態学的特性について、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

形態及び生育の特性；閉鎖系の人工気象室における観察では、本ゲノム編集コムギの草丈には有意な差異は認められず、形態学的特性においても特筆すべき差異は認められなかった。

別紙2-1 限定されたほ場に関する情報

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等を予定している、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（以下、農研機構という）がつくば観音台地区に保有する3か所の隔離ほ場に相当する管理が可能なほ場（以下、隔離ほ場という）の情報を以下に示す。

◎ 受容環境（隔離ほ場）に関する情報

1. 隔離ほ場の所在地等

（1）名称

1. 観音台第一事業場 高機能隔離ほ場
2. 観音台第二事業場 隔離ほ場
3. 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場

（2）所在地

1. 茨城県つくば市観音台3-1-1
2. 茨城県つくば市観音台2-1-2
3. 茨城県つくば市観音台3-1-3

（図1、2、4、6）

2. 施設概要

部外者の立入りを制限するためのフェンス、立入禁止であることを記載した標識、洗場、焼却炉を設置している。水田を備えている。

畑ほ場を備えている（3.のみ）

（図3、5、7）

3. 面積

1. 全体の面積は約60a（うち、水田の面積は約30a）
2. 全体の面積は約55.4a（うち、水田の面積は約20.8a）
3. 全体の面積は約82a（うち、水田の面積は約5.2a、畑ほ場は約13.8a）

4. 隔離ほ場の周辺環境

（1）地形

茨城県つくば市内、筑波・稲敷台地に位置する

(2) 周辺の土地利用状況

隔離ほ場は機構の敷地内にある。隔離ほ場外周から農研機構の敷地境界までそれぞれ最短で

1. 約 150m である。
2. (農研機構敷地を貫く公道を除き) 約 250m である。
3. 約 50m である。

(3) 5. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

半径 1km 圏内に環境省の定める自然保護地域(国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域)はない。なお、最も近い自然保護地域は水郷筑波国定公園であり、茨城県土浦市の霞ヶ浦まで約 10 km である。

(4) 気象条件

隔離ほ場の最寄りの気象情報観測地点である茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値を表1に示した（気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021年2月25日、http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_sfc_ym.php?prec_no=40&block_no=47646&year=&month=&day=&view）。

表1 茨城県つくばアメダス観測所（茨城県つくば市館野）における気象データの平年値

つくば(館野) 平年値(年・月ごとの値) 主要要素						
要素	降水量 (mm)	気温 (°C)			風向・風速 (m/s)	日照時間 (時間)
	合計	平均	最高	最低	平均	合計
統計期間	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010	1981 ～2010
資料年数	30	30	30	30	30	30
1月	43.8	2.7	9	-3.2	2.3	194.1
2月	51.6	3.7	9.7	-2.2	2.5	174.2
3月	99.5	7.1	12.8	1.2	2.6	171
4月	105.6	12.5	18.3	6.6	2.8	173.3
5月	120.3	16.9	22	11.8	2.6	172.7
6月	133.1	20.2	24.6	16.3	2.4	121.2
7月	127.1	23.9	28.3	20.4	2.4	139.5
8月	130.6	25.5	30.2	21.8	2.4	178.6
9月	183.2	21.9	26.2	18.1	2.3	123.9
10月	165.9	16	20.9	11.3	2	136.5
11月	78.8	10	15.9	4.6	1.9	146.5
12月	43.6	5	11.4	-0.9	2.1	181.3
年	1282.9	13.8	19.1	8.8	2.4	1912.8

(5) 台風の襲来歴

隔離ほ場のある関東地方への過去 10 年間の台風の接近数を表 2 に示した。

表 2 関東地方への過去 10 年間の台風の接近数

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021 年 2 月 25 日

http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html)

「台風が中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署等から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方（伊豆諸島および小笠原諸島を除く）に接近した台風」としています。(注) 接近は 2 か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しません。」(原文のまま)

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2020									1	1			2
2019						1	1		1	1			4
2018						1	1	2	2	1			6
2017							1	1	1	2			5
2016								4	1	1			6
2015									1				1
2014							1	1		2			4
2013									1	2			3
2012						1			1	1			2
2011							1		1				2

(6) 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

隔離ほ場の建設（1. 2006 年、2. 2004 年、3. 1991 年）以来、冠水したことはない。

(7) 過去 10 年における強風の経験とその程度

2018 年 9 月 30 日に関東地方を通過した平成 30 年台風 24 号によるほ場外からの倒木により、観音台第三事業場組換え植物隔離ほ場外周を取り巻くフェンスが破損した（当時、栽培されていた遺伝子組換え植物はなかった）。フェンスは早急に修繕を行い、倒木の処理を行った。それ以外では、隔離ほ場を建設して以来、強風による設備・作物への被害はなく、直近の令和元年東日本台風（令和元年台風第 19 号）でも特筆すべき被害はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置付け

隔離ほ場は、つくば市が作製した「つくば市洪水ハザードマップ」において、浸水想定区域に指定されていない。

(9) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

隔離ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られるが、鳥類による被害は報告されていない（防鳥網の設置等によってこれらの侵入を防ぐことができる）。また、隔離ほ場にはフェンスが設置されており、獣害は発生していない。

(10) 隔離ほ場周辺の生物相

- 1) 遺伝子組換え植物を隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。
- 2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
交雑可能な近縁野生種はない。

5. 栽培管理等

(1) 栽培履歴

隔離ほ場における過去5年間の栽培履歴は以下のとおりである。

1.

栽培年度	植物
2016年	イネ*
2017年	イネ*
2018年	イネ*
2019年	イネ*
2020年	イネ

*は遺伝子組換え植物を含む

2.

栽培年度	植物
2016年	イネ*
2017年	イネ*
2018年	イネ*、バレイシヨ
2019年	イネ*、バレイシヨ
2020年	イネ*、バレイシヨ

*は遺伝子組換え植物を含む

C.

栽培年度	植物
2016 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2017 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2018 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2019 年	イネ*
	ソルガム
	コムギ
	コマツナ
2020 年	イネ*
	コムギ

(2) 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、速やかに対策を講じる。

(3) 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。

6. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

届出書に記載されたほ場内でのみ栽培試験を実施する。



図1 つくば地区観音台事業場における隔離ほ場の配置図

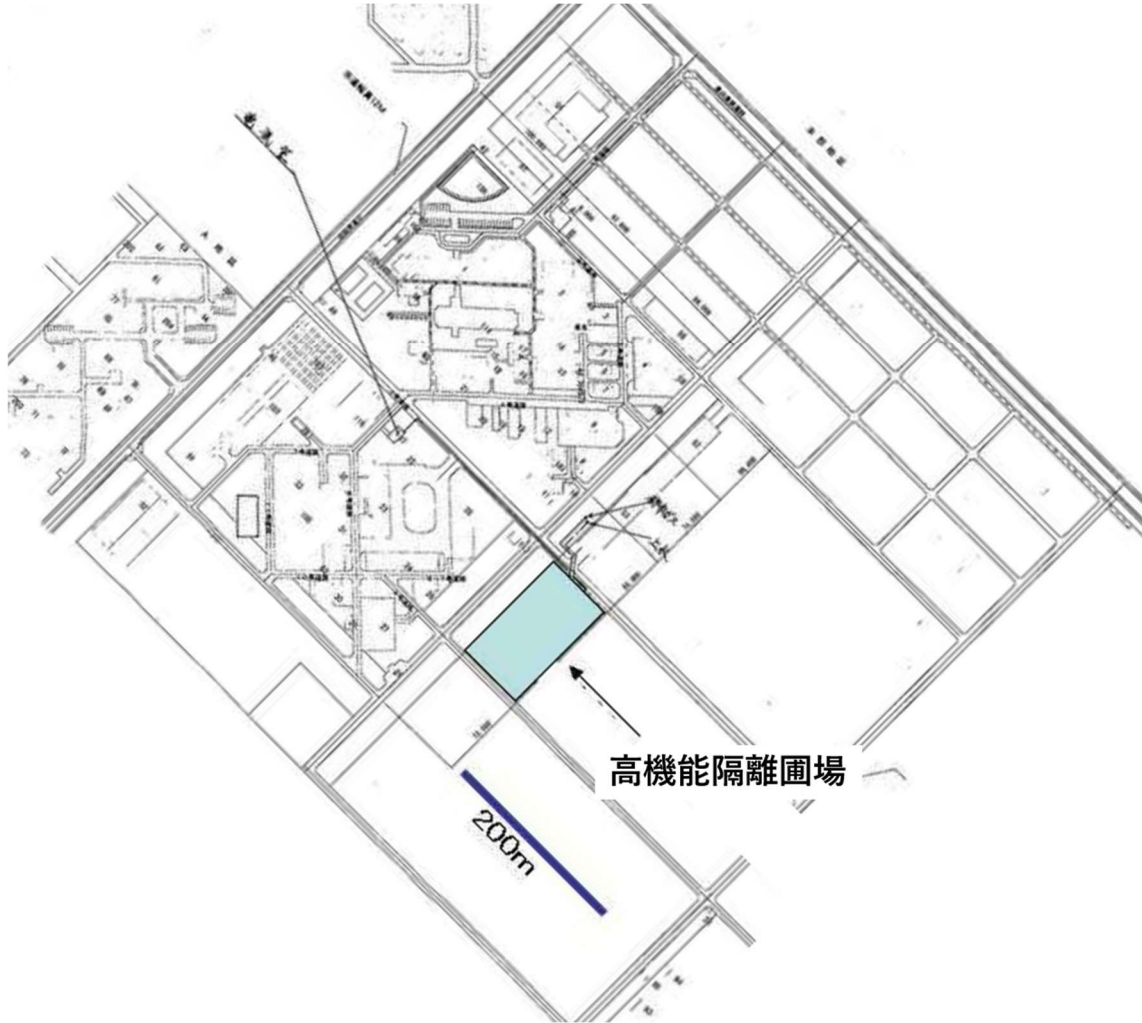


図2 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第一事業場内配置図

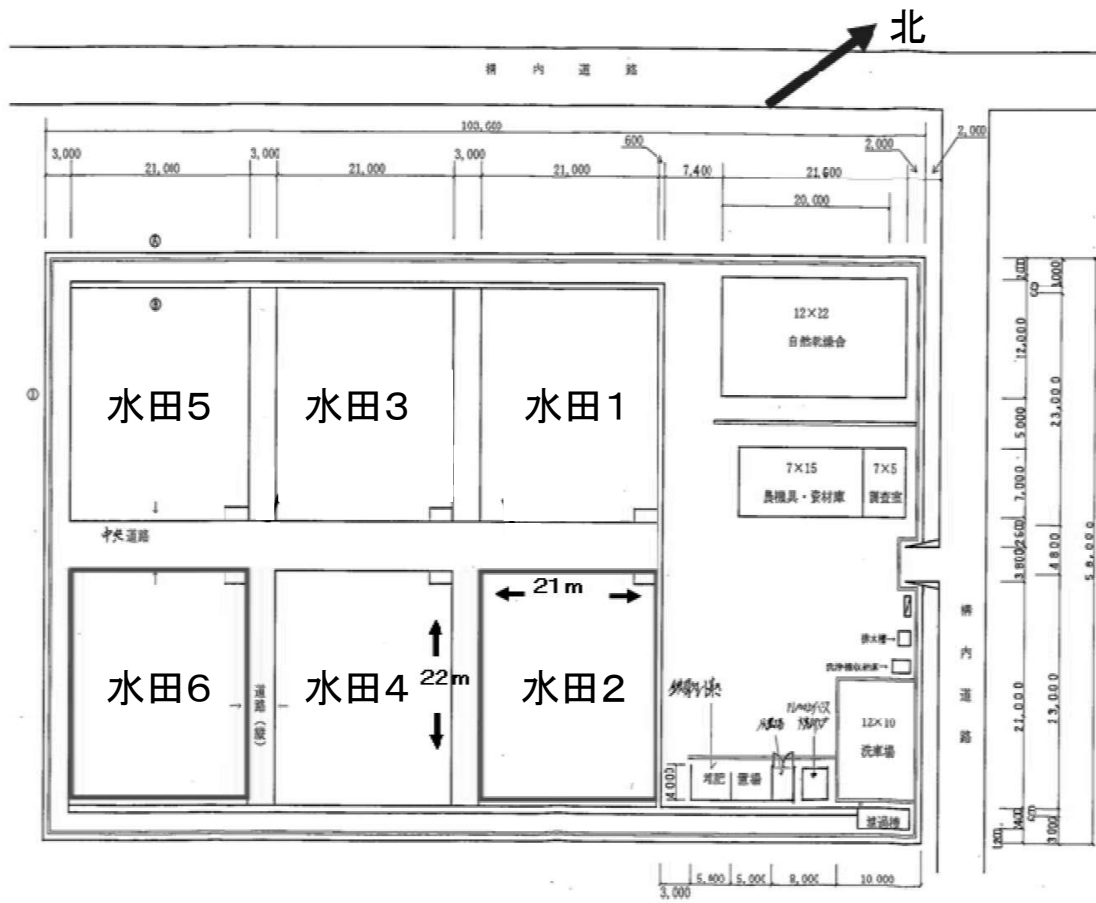


図3 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第一事業場 高機能隔離ほ場内配置図

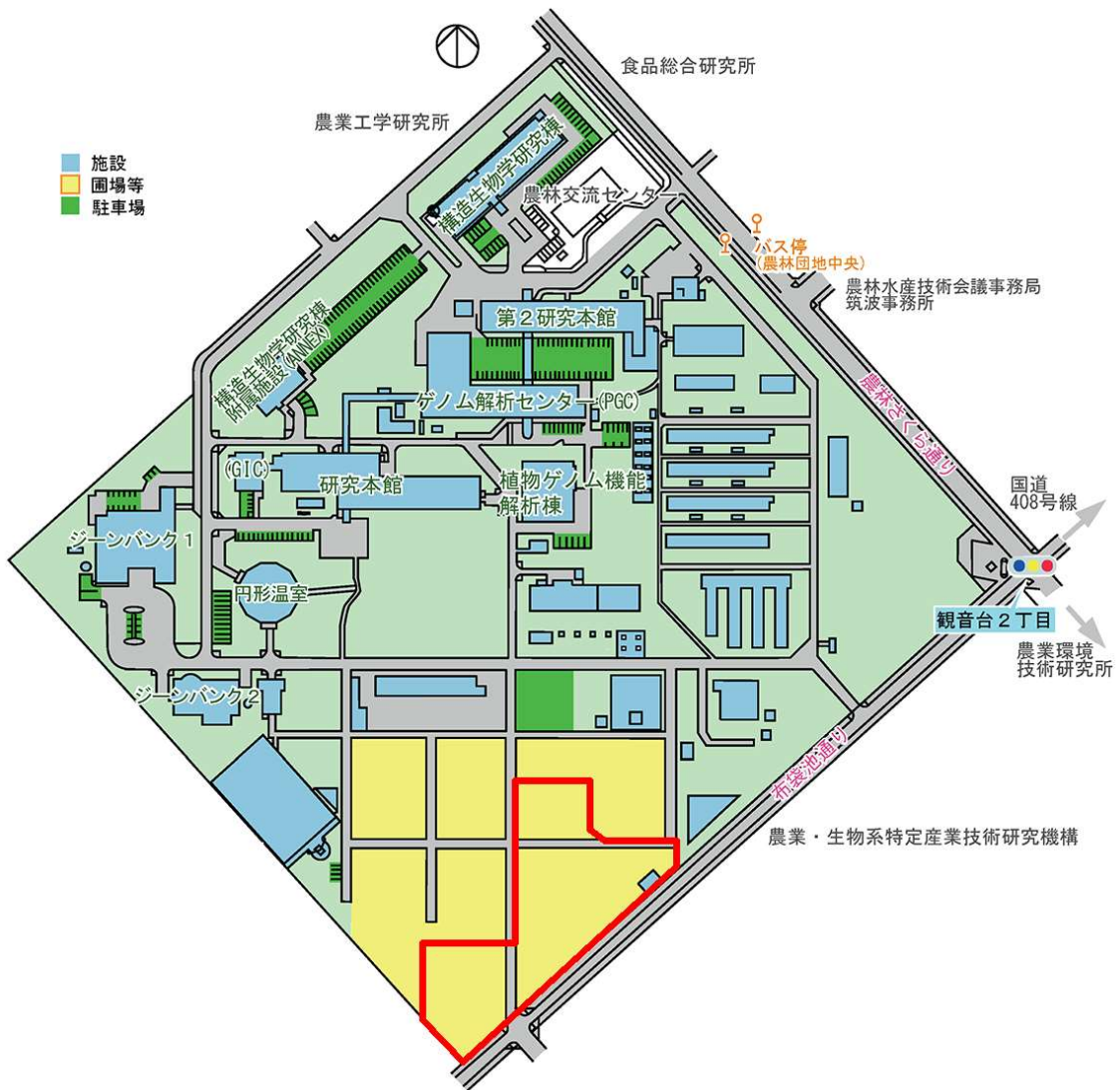


図4 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第二事業場内配置図

隔離ほ場略図

- 水田
- 畑地・土
- 舗装コンクリート
- 建物等
- フェンス
- 出入口
- 給水施設
- 浸透升
- 排水用溝及び流路

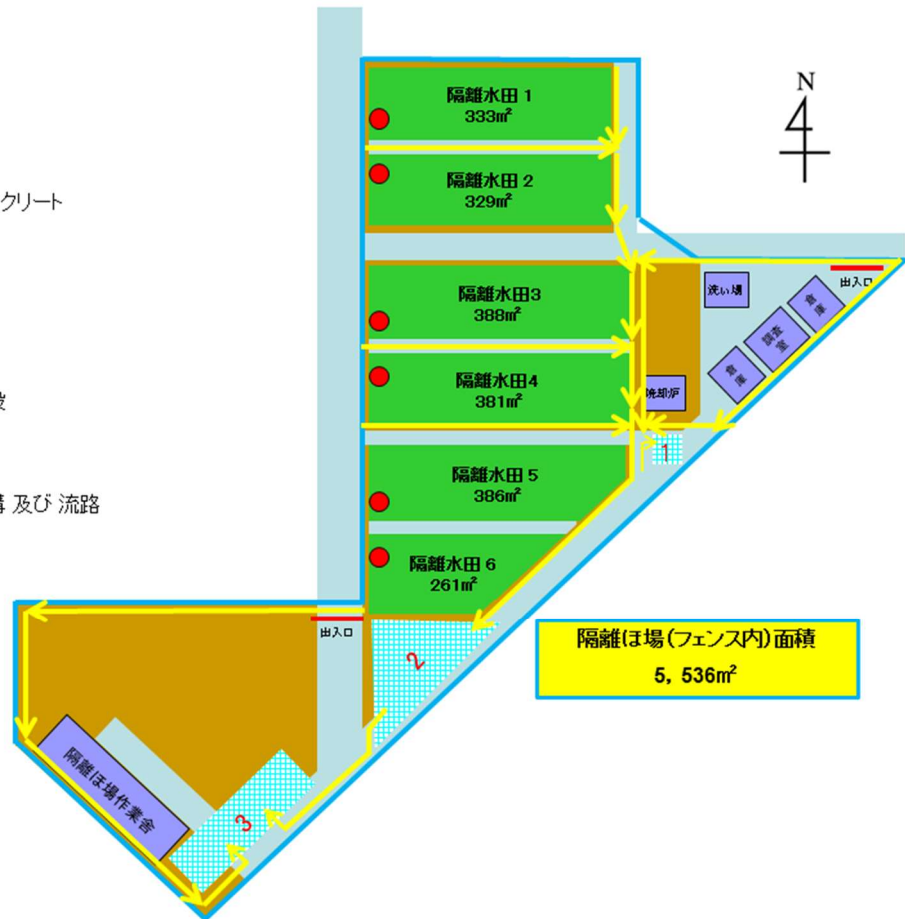
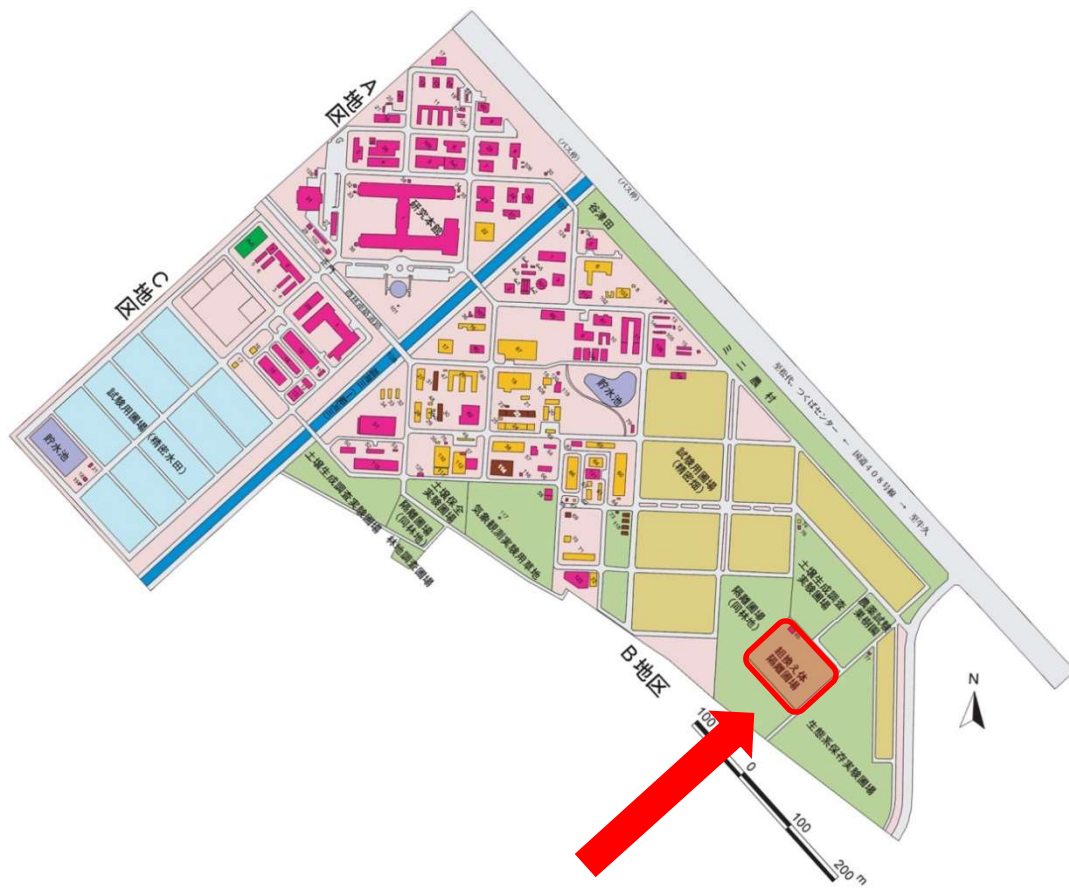


図5 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第二事業場 隔離ほ場内配置図



組換え植物隔離ほ場

図6 農業・食品産業技術総合研究機構
観音台第三事業場内配置図

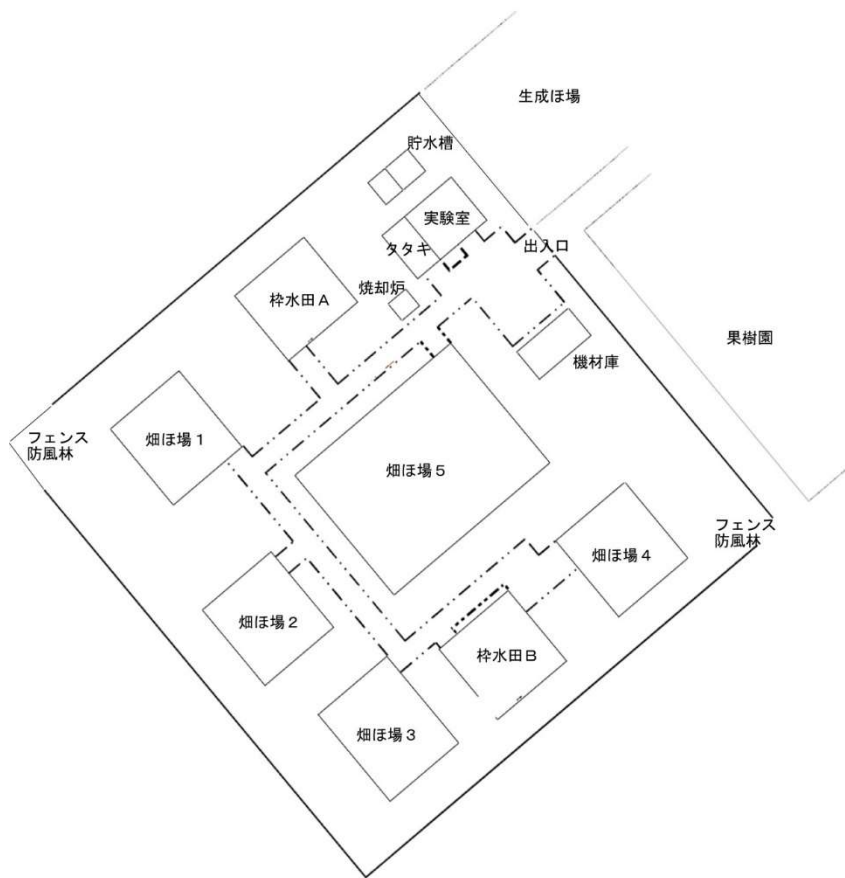


図7 農業・食品産業技術総合研究機構
 観音台第三事業場 組換え植物隔離ほ場内配置図

別紙 2-2 限定されたほ場に関する情報

ゲノム編集技術の利用により得られた生物の使用等を予定している、国立大学法人岡山大学が倉敷キャンパスに保有する隔離ほ場に相当する管理が可能な管理ほ場の情報を以下に示す。

◎受容環境（管理ほ場）に関する情報

1. 管理ほ場の所在地等

(1) 名称

1. 倉敷キャンパス 実験ほ場

(2) 所在地

1. 岡山県倉敷市中央二丁目 20-1

(図 1)

2. 施設概要

部外者の立入りを制限するため、管理ほ場の周囲全体に上下をワイヤーで固定した堅牢な侵入防止網（樹脂製、網目 1 cm 二重織、高さ 2m）および南側に金属製施錠付き扉を設置し、立入禁止であることを記載した標識を掲示している。また、倉敷キャンパス全体は金属製のフェンスあるいはコンクリート製の塀で囲われており、平日の午前 8 時から午後 6 時以外は施錠されている。倉敷キャンパスの要所および管理ほ場周辺は防犯およびモニター用のビデオカメラが設置されており、終日録画している。

3. 面積

1. 全体の面積は約 500 m²

4. 管理ほ場の周辺環境

(1) 地形

岡山県倉敷市内、市街地に位置する

(2) 周辺の土地利用状況

管理ほ場は岡山大学の敷地内にある。管理ほ場外周から最短で 30m である。コムギの一般栽培ほ場は半径 4km 圏内がない（図 2）。

(3) 周辺の環境保護区の名称と管理ほ場からの距離

半径 1km 圏内にある環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、厚生自然環境保全地域、自然環境保全地域）はない。なお、最も近い自然保護地域は瀬戸内海国立公園であり、瀬戸内海沿岸の鷲羽山まで約 10km である。

(4) 気象条件

管理ほ場に隣接する岡山県倉敷アメダス観測所における気象データの平年値を表1に示した(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021年4月12日 http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=66&block_no=0669&year=2021&month=&day=&view=p1)

表1 岡山県倉敷アメダス観測所における気象データの平年値

要素	降水量 (mm)	平均気温 (°C)	日最高気温 (°C)	日最低気温 (°C)	平均風速 (m/s)	日照時間 (時間)
統計期間	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1981～ 2010	1988～ 2010
資料年数	30	30	30	30	30	23
1月	32.2	4.3	9.0	0.1	1.6	145.9
2月	47.1	4.8	9.7	0.3	1.6	140.7
3月	82.7	8.2	13.1	3.2	1.7	167.4
4月	86.3	13.8	19.2	8.4	1.8	186.3
5月	116.1	18.6	23.9	13.5	1.7	185.0
6月	153.2	22.7	27.2	18.7	1.7	141.3
7月	146.1	26.5	30.6	23.1	1.8	169.0
8月	75.7	27.5	31.9	24.0	1.8	200.5
9月	129.3	23.6	28.1	19.7	1.5	154.8
10月	79.6	17.5	22.7	12.8	1.3	167.0
11月	50.8	11.7	16.9	6.9	1.3	149.0
12月	30.5	6.6	11.7	2.1	1.4	145.9
年	1028.6	15.5	20.3	11.0	1.6	1948.0

(5) 台風の襲来歴

管理ほ場のある中国地方(山口県を除く)への接近数を表2に示した。

表2 中国地方(山口県を除く)への接近数

(気象庁ウェブサイト、気象統計情報ページより。アクセス日 2021年4月12日 <https://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/chugoku.html>)

「台風の中心が鳥取県、島根県、岡山県、広島県のいずれかの気象官署等から300km以内に入った場合を「中国地方(山口県を除く)に接近した台風」としています。(注)接近は2

か月にまたがる場合があり、各月の接近数の合計と年間の接近数とは必ずしも一致しません。」(原文のまま)

年	1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	年間
2020								1	1				2
2019						1	1	2	1	1			6
2018							2	2	2	1			7
2017							1	1	1				3
2016									2	1			3
2015							2	1	1				4
2014							1	1		2			4
2013									2	1			3
2012						1			1				2
2011					1		1		2				4

(6) 過去10年におけるほ場冠水の経験とその程度

栽培時に冠水したことはない。

(7) 過去10年における強風の経験とその程度

強風による設備・作物への被害はない。

(8) 市町村が策定するハザードマップ上の位置づけ

管理ほ場は、倉敷市が作成した「倉敷市洪水土砂災害ハザードマップ(令和2年作成)」において、浸水想定区域に指定されている。コムギの栽培時期は11月に播種して翌年5月に収穫し、梅雨および台風の接近の多い時期には栽培は行わないため、この時期に浸水する恐れはない。なお、少なくとも過去30年間浸水の記録はない。

(9) 周辺地域における鳥獣害の発生状況

管理ほ場周辺にカラス及びスズメ等が見られ、防鳥網の設置等によってこれらの侵入

を防ぐことができる。また、管理ほ場周囲には上下をワイヤーで固定した侵入防止網および金属製施錠付き扉が設置されており、獣害は発生していない。

(10) 管理ほ場周辺の生物相

- 1) 遺伝子組換え植物を管理ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
影響を受ける可能性のある野生動植物等はない。
- 2) 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれる場合はその名称
交雑可能な近縁野生種はない。

5. 栽培管理等

(1) 栽培略歴

管理ほ場における過去5年間の栽培履歴は以下のとおりである。

栽培年度	植物
2016年	イネ、オオムギ
2017年	イネ、オオムギ
2018年	イネ、オオムギ
2019年	イネ、オオムギ
2020年	イネ、オオムギ

(2) 気象災害時の対応

気象災害が発生した場合、まず、栽培区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には、速やかに対策を講じる。

(3) 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに管理ほ場内での不活化や拡散防止措置を行うとともに、その他の適切な措置を講じる。

6. 管理ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

届出書に記載されたほ場内でのみ栽培試験を実施する。

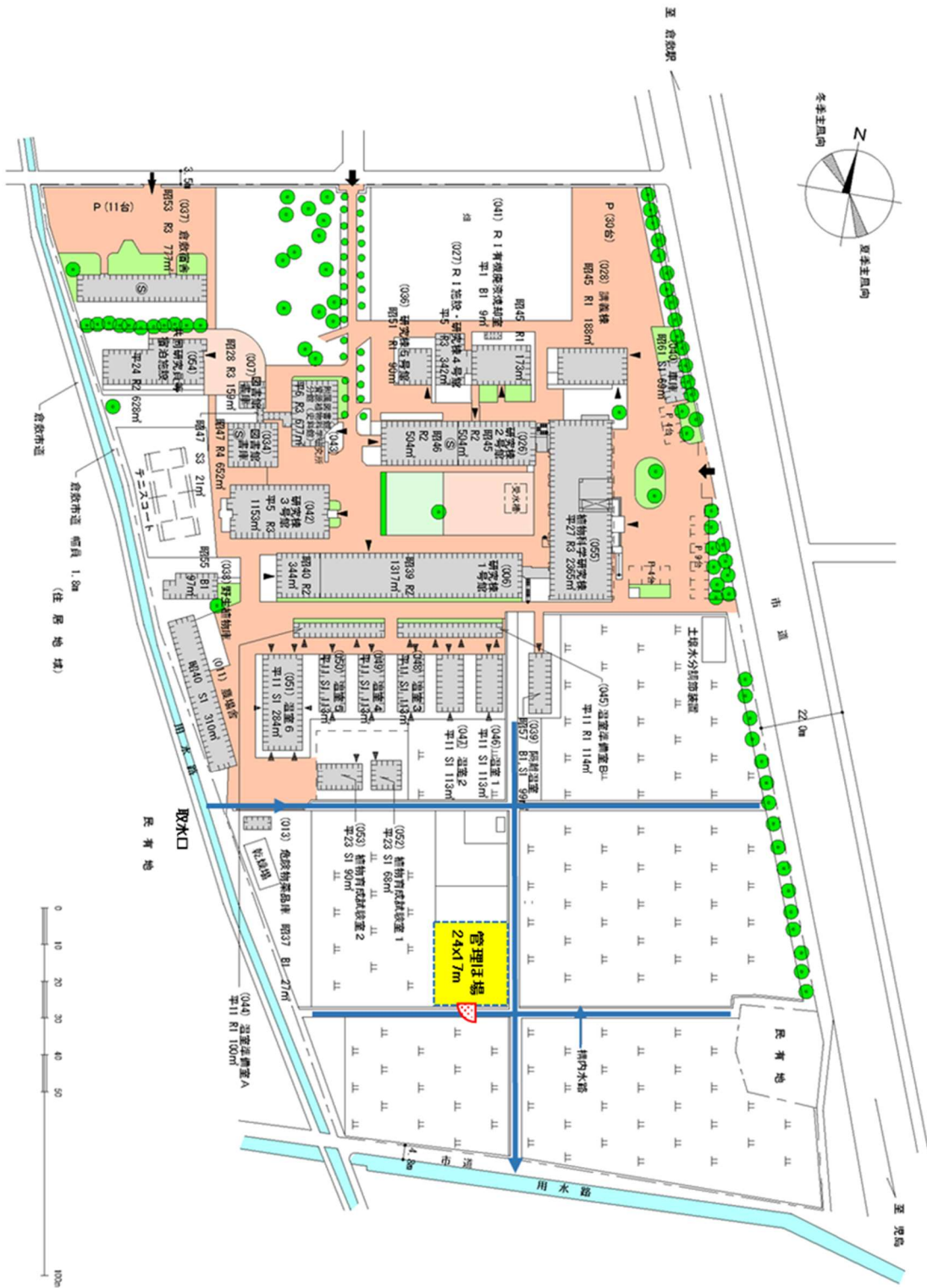


図1 倉敷キャンパス 実験ほ場における管理ほ場（黄色）の配置図。管理ほ場周囲の点線は侵入防止網を示す。管理ほ場南側には金属製施錠付き扉（赤色）を設置し、立入禁止であることを記載した標識を正面に掲示している。



図2 倉敷キャンパス 実験ほ場における管理ほ場周辺のムギ類一般栽培地域（点線外側）