

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ワタ (*2mepsps*, *hppdPfw336-1Pa*, *Gossypium hirsutum* L.)(GHB811, OECD UI:BCS-GH811-4)申請書等の概要

5	第一種使用規程承認申請書	1
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
	1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
10	(2) 使用等の歴史及び現状	5
	(3) 生理学的及び生態学的特性	6
	イ 基本的特性	6
	ロ 生息又は生育可能な環境の条件	6
	ハ 捕食性又は寄生性	6
15	ニ 繁殖又は増殖の様式	7
	ホ 病原性	8
	ヘ 有害物質の産生性	8
	ト その他の情報	9
	2. 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報	10
20	(1) 供与核酸に関する情報	10
	イ 構成及び構成要素の由来	10
	ロ 構成要素の機能	12
	(2) ベクターに関する情報	19
	イ 名称及び由来	19
25	ロ 特性	19
	(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
30	(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	22
	(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	26
	(6) 宿主又は宿主に属する分類学上の種との相違	26
	3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	28
	(1) 使用等の内容	28
35	(2) 使用等の方法	28
	(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	29
	(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	29
5	(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	29
	(6) 国外における使用等に関する情報	29
	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	30
	1. 競合における優位性	30
10	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	30
	(2) 影響の具体的内容の評価	30
	(3) 影響の生じやすさの評価	31
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	31
	2. 有害物質の産生性	31
15	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	31
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
	(3) 影響の生じやすさの評価	32
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	32
	3. 交雑性	32
20	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	32
	(2) 影響の具体的内容の評価	32
	(3) 影響の生じやすさの評価	32
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	33
25	4. その他の性質	33
	第三 生物多様性影響の総合的評価	34
	参考文献	36
	別添資料の内容	41
30	緊急措置計画書	42
	隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画書	44

第一種使用規程承認申請書

平成 28 年 9 月 5 日

5

農林水産大臣 山本 有二 殿
環境大臣 山本 公一 殿

10

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 ハーラルト・プリンツ 印
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

15

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。

20

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イソキサフルトール耐性ワ タ (<i>2mepsps</i> , <i>hppdPfw336-1Pa</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> L.)(GHB811, OECD UI:BCS-GH811-4)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこ れらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	所在地：茨城県筑西市向上野 1500 番地 41 名 称：バイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所 隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 32 年 3 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り 囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であるこ と及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やす い所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した 土、本遺伝子組換えワタの種子等を洗浄によって 除去するための洗い場を設置しているとともに、 当該ワタの隔離ほ場の外への流出を防止するた めの設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、防風林及び防風網を設置して いる。また、栽培試験期間中の播種期及び収穫期 には栽培実験区画を覆うように防鳥網を設置し、 野鳥等の食害による遺伝子組換え種子の拡散を防 止する。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えワタ及び比較対照のワタ以外の植 物が隔離ほ場内で生育することを最小限に抑え る。 (2) 本遺伝子組換えワタを隔離ほ場の外に運搬し、又 は保管する場合は、当該ワタが漏出しない構造の 容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子 組換えワタの栽培終了後は、当該ワタ及び比較対 照のワタを隔離ほ場内にすき込む等により確実に 不活化する。 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終 了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図 せず本遺伝子組換えワタが隔離ほ場の外に持ち

	<p>出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	--

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

5 (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(陸地棉)

10 英名：upland cotton

学名：*Gossypium hirsutum* L.

② 宿主の品種名

15 宿主はワタ(*Gossypium hirsutum* L.)の品種Coker312である。

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20 *G. hirsutum* L.は四倍体ワタの栽培種であり(OECD, 2008)、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。)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。ワタ属には、二倍体種と四倍体種の二つの群がある。そ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、オーストラリア群(*Sturtia*亜属)の約17種、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種である。また、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。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*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(OECD, 35 2008)。

(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

5 ワタの栽培利用の歴史は極めて古い。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居住跡で*G. barbadense*の種子と原始的織機や織物の破片が発見された。これらの事から、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
10 では紀元前5800年頃の洞窟からワタ(*G. hirsutum*)のさくが発掘されたと言われている(原田, 1981)。

 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
15 ったが、南北戦争でその供給が絶たれたのを機に、世界の熱帯及び亜熱帯の諸国に広がった(原田, 1981)。今日生産されるワタ属の栽培種の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(OECD, 2008)。

20 我が国における在来の栽培種は中国大陸中・北部にて一年生の*G. arboreum*から品種分化したナンキンワタの系統である(巽, 2000)。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(巽, 2000)。しかし、輸入綿にお
25 おかれて次第に衰微し、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(原田, 1981)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

30 2014年における世界の主な綿実生産国は中国(1,232万t)、インド(1,230万t)、米国(465万t)、パキスタン(455万t)であり、主な綿実油生産国は中国(158万t)、インド(105万t)、パキスタン(45万t)、米国(36万t)である(FAO, 2016)。

 我が国における2015年の搾油用綿実の総輸入量は約10.3万tであり、主な輸入
35 先はオーストラリア(4.3万t)、米国(3.1万t)及びブラジル(2.6万t)であった。また、2015年の綿実油の輸入量は4,170tであり、主な輸入先はオーストラリア(1,720t)、

トルコ(1,452t)及び米国(497t)であった(農林水産省, 2016)。また、2015年の綿実油粕の輸入量は2,409tであり、主な輸入先はインド(1,460t)、中国(939t)及び米国(10t)であった(財務省, 2016)。

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
5 の混入を防ぐために収穫前に薬剤で落葉させる(巽, 2000)。

ワタは工芸作物の中で最大の栽培面積を持ち、また繊維利用の中で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、綿花の大部分は紡績用(綿糸、綿織物など)あるいは製綿用(ふとん綿、脱脂綿など)に利用される。地
10 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、油脂から綿実油が生産される。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(巽, 2000)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

15

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(OECD, 2008)。主茎は直立し、単軸性、無限成長性である(Oosterhuis and
20 Jernstedt, 1999)が、一般的に草高約1~1.5mで栽培されている(OECD, 2008)。

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
25 生育遅延が起こる。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。また、正常な生育には、180~200日以上は無霜期間及び栽培期間中に500mm以上の降雨量若しくは灌水を要する。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い(OECD, 2008)。塩分に対しては作物の中でも耐性が高く、塩分の多いアルカリ
30 性土壌で栽培可能である(巽, 2000)。

ハ 捕食性又は寄生性

—

35

二 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

5 ワタのさくは3~5室に分かれており、1室に7~8個の種子が含まれる。発育に伴い水分が減少し、さく皮が裂けて開じよする。種子は地毛が絡み合っ
て分離しにくく、脱粒性は低いと考えられる(原田, 1981)。品種によっては収穫後2~3カ月の休眠期を持つが、栽培種は育種により休眠性を最小限に抑えられているか若しくは完全に失っている(OECD, 2008)。

10

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

15 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

20 ワタは基本的に自家受粉植物であるが、花粉媒介昆虫により、一般に低い頻度の他家受粉が生じる場合がある(OECD, 2008)。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

30 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(OECD, 2008)。ワタの花粉粒は直径100~140 μ mと大きく、重く、やや粘着性があり、風で花粉が運ばれることはほとんどなく、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)等の花粉媒介昆虫の活動に依存している(OECD, 2008)。米国での調査では、除草剤耐性ワタの栽培ほ場から1625m地点での0.04%の交雑が認められたことが報告されている(Van Deynze *et al.*, 2005)。また、米国において同様に、除草剤耐性ワタを用いた交雑試験では、ミツバチの放飼を行うなど花粉媒介昆虫が活発に活動する条件下では花粉源からの距離が
35 9m以上で交雑率は1%以下になり、害虫防除などにより花粉媒介昆虫の活動が活発でない条件下では花粉源からの距離が1m以上で交雑率1%以下であった(Van

Deynze *et al.*, 2005)。さらに、除草剤耐性ワタを用いた中国における試験では、10m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、60m以上では耐性個体の出現は認められなかった(Zhang *et al.*, 2005)。

5 花粉の発芽率は、25°C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、オオタバコガ(*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、さらに低下することが確認されている(OECD, 2008)。

10 ホ 病原性

—

へ 有害物質の産生性

15

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す可能性のあ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。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(OECD, 2008)。

20

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(Stipanovic *et al.*, 2005)。また、両異性体には遊離型と結合型があり、ワタの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、鳥類及び多くの昆虫や微生物に対して毒性を示し、ほ乳類においては食欲減退、体重減少や呼吸困難などを引き起こす(Berardi and Goldblatt, 1980)。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(OECD, 2008)、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(新谷, 1989)。

25

シクロプロペン脂肪酸(マルバリン酸、ステルクリン酸)は種子中の脂質に0.5-1.0%程含まれており、飽和脂肪酸の不飽和化を阻害し、鶏では卵白の変色や

30 ふ化率の低下などを引き起こすが、精油工程で除去される(OECD, 2004; OECD, 2008)。

30

ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、綿実は大量の繊維に覆われているため鳥類のような種子を摂食する動物は好まず、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや種子の形態により摂食は避けると考えられる。また、野生の

35 哺乳動物が綿実を摂食するという例は報告されていない。

ト その他の情報

—

5

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 イ 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ワタ (*2mepsps*, *hppdPfw336-1Pa*, *Gossypium hirsutum* L.)(GHB811, OECD UI: BCS-GH811-4)(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

由来を表1に示した。

表1 構成要素のサイズ、ベクター上の位置、由来及び機能

構成要素	サイズ (bp)	ベクター上の 位置	由来及び機能
T-DNA 領域			
<i>hppdPfw336-1Pa</i> 遺伝子発現カセット			
ThistonAt	667	83 - 749	シロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>)由来の H4 遺伝子の 3'非翻訳領域 (Chabouté <i>et al.</i> , 1987)を含む配列で、ポリアデニル化サイトを含む。
	16	750 - 765	合成ポリリンカー配列
<i>hppdPfw336-1Pa</i>	1077	766 - 1842	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A32 株の 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子を由来とし、336 番目のグリシンをトリプトファンへ置換している。これにより除草剤イソキサフルトールへの耐性を付与する(Boudec <i>et al.</i> , 2001)。なお、ワタにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
<i>TPotpY-1Pa</i>	372	1843 - 2214	ヒマワリ(<i>Helianthus annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Zea mays</i>)の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体ペプチドのコード領域(アミノ酸配列 55 番目をチロシンへ置換している)を基に合成された(Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。HPPD W336 蛋白質を色素体へ輸送する。なお、ワタにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。
	8	2215 - 2222	合成ポリリンカー配列
Pcsmv	513	2223 - 2735	Cassava Vein Mosaic Virus のプロモーター領域の配列を含み、 <i>hppdPfw336-1Pa</i> 遺伝子発現カセットにおいて構成的な発現を行う。

構成要素	サイズ (bp)	ベクター上の 位置	由来及び機能
<i>2mepsps</i> 遺伝子発現カセット			
Ph4a748	917	2834 - 3750	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列で <i>2mepsps</i> 遺伝子の発現を制御する (Chabouté <i>et al.</i> , 1987)。
	39	3751 - 3789	合成ポリリンカー配列
intron1 h3At	466	3790 - 4255	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来のヒストン H3.3 第II遺伝子の第一イントロンを含む配列 (Chaubet <i>et al.</i> , 1992)。Ph4a748 プロモーターとの組み合わせで、構成的に発現レベルを高くする。
	13	4256 - 4268	合成ポリリンカー配列
<i>TPotpC</i>	372	4269 - 4640	ヒマワリ(<i>H. annuus</i>)及びトウモロコシ(<i>Z. mays</i>)の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体ペプチドのコード領域(アミノ酸配列 55 番目をチロシンへ置換している)を基に合成された (Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。2mEPSPS 蛋白質を色素体へ輸送する。
<i>2mepsps</i>	1338	4641 - 5978	トウモロコシ(<i>Z. mays</i>)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 (<i>epsps</i> 遺伝子)に点突然変異を導入した、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で、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する (Lebrun <i>et al.</i> , 1997)。
	20	5979 - 5998	合成ポリリンカー配列
ThistonAt	667	5999 - 6665	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)由来の H4 遺伝子の 3'非翻訳領域 (Chabouté <i>et al.</i> , 1987)を含む配列で、ポリアデニル化サイトを含む。
その他			
RB	25	1 - 25	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の T-DNA 由来の右側境界反復配列 (Zambryski, 1988)
	57	26 - 82	合成ポリリンカー配列
	60	2736 - 2795	合成ポリリンカー配列
lox	34	2796 - 2829	バクテリオファージ P1 の Cre リコンビナーゼに対する 34bp の認識配列 (Hoess and Abremski, 1985)。
	4	2830 - 2833	合成ポリリンカー配列
	4	6666 - 6669	合成ポリリンカー配列
lox	34	6670 - 6703	バクテリオファージ P1 の Cre リコンビナーゼに対する 34bp の認識配列 (Hoess and Abremski, 1985)。
	128	6704 - 6831	合成ポリリンカー配列

構成要素	サイズ (bp)	ベクター上の 位置	由来及び機能
LB	25	6832 - 6856	<i>A. tumefaciens</i> の T-DNA 由来の左側境界反復配列 (Zambryski, 1988)。
外骨格領域(本組換えワタには導入されていない)			
	305	6857 - 7161	pTiAch5 の左側境界反復部位の Ti-plasmid 配列(Zhu <i>et al.</i> , 2000)。
<i>aadA</i>	1785	7162 - 8946	大腸菌(<i>Escherichia coli</i>)のアミノグルコシド系抗生物質耐性遺伝子を含む配列(Fling <i>et al.</i> , 1985)。
ORI pVS1	2790	8947 - 11736	<i>Pseudomonas</i> 由来のプラスミド pVS1 の複製起点を含む配列 (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
ORI ColE1	1157	11737 - 12893	<i>E. coli</i> のプラスミド pBR322 由来複製起点を含む配列(Bolivar <i>et al.</i> , 1977)。
	206	12894 - 13099	pTiAch5 の右側境界反復部位の Ti-plasmid 配列(Zhu <i>et al.</i> , 2000)。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

ロ 構成要素の機能

- 5 ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

本組換えワタの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能は表1(p.10)に示した。

- 10 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

2mEPSPS蛋白質

- 15 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(以下、「EPSPS蛋白質」とする。)は、植物、菌類及び微生物に特有の芳香族アミノ酸や芳香族化合物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)を生ずる反応を触媒する。除草剤グリホサートはEPSPS蛋白質を阻害してシキミ酸経路を止め、その結果、植物は蛋白質の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(Lebrun *et al.*, 1997)。
- 20

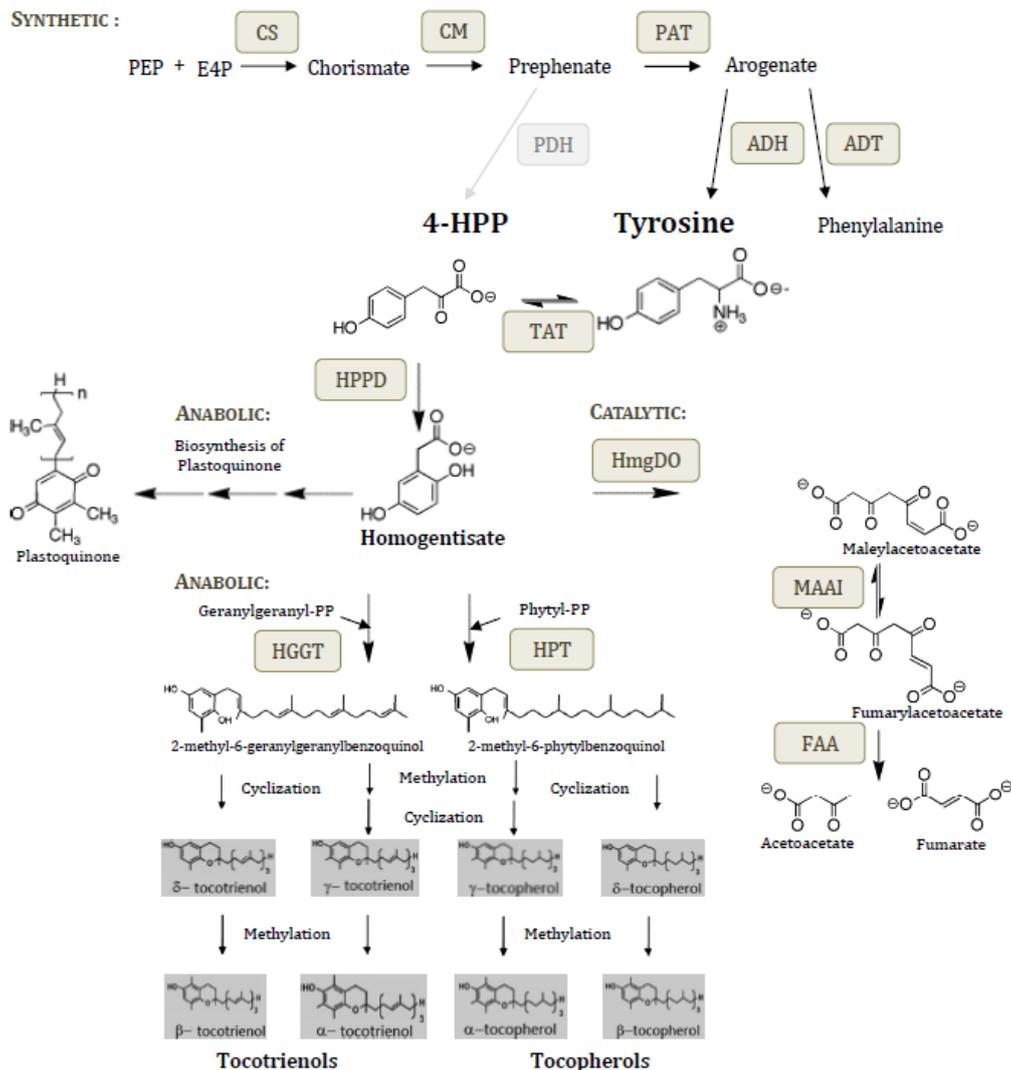
本組換えワタに導入された2mepsps遺伝子の供与体は、トウモロコシである。2mepsps遺伝子は、トウモロコシから単離された野生型epsps遺伝子の翻訳領域2ヵ所に部位特異的に点突然変異を導入して作製された。この突然変異により、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列は、野生型epsps遺伝子産物であるEPSPS蛋白質の102番目のトレオニン(Thr)がイソロイシン(Ile)に、また、106番目プロリン(Pro)がセリン(Ser)にそれぞれ変化している(Lebrun *et al.*, 1997)。これにより、2mEPSPS蛋白質はグリホサートに対する結合親和性が低くなり、グリホサート存在下でも十分な酵素活性を維持することができシキミ酸合成が正常に機能するため、植物は生育することができる(Lebrun *et al.*, 1997)。

また、2mEPSPS蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2016年にFARRPのAllelgenOnlineデータベース(version16)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な同源性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの同源性は認められなかった。

なお、2mepsps遺伝子は、我が国において平成22年6月11日に第一種使用規程承認が得られている除草剤グリホサート耐性ワタ GHB614(OECD UI:BCS-GHØØ2-5)に導入されている。

HPPD W336蛋白質

4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ(4-hydroxy phenylpyruvate dioxygenase)(以下、「HPPD蛋白質」とする。)は、微生物、菌類、植物及び哺乳類を含む動物に広くみられる酵素であり、HPPD蛋白質が関与する代謝経路は植物と非光合成生物で異なっている。HPPD蛋白質はチロシン代謝経路において4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(4-HPP)からホモゲンチジン酸(HGA)の合成を触媒し(図1, p.14; 図2, p.15)、生成されたHGAは、微生物及び動物ではフマル酸及びアセト酢酸に代謝される(Brownlee *et al.*, 2004)。植物ではこの反応に加え、HGAはトコトリエノール、トコフェロール及びプラストキノン合成に利用される。これらは光合成電子伝達系や抗酸化反応に必須な化合物である(Fritze *et al.*, 2004)(図1, p.14)。



5 図1 チロシン代謝経路におけるHPPD蛋白質

図中の略語の正式名称

CS: chorismate synthase

CM: chorismate mutase

E4P: erythrose 4-phosphate

PEP: phosphoenol pyruvate

PAT: prephenate aminotransferase

ADH: arogenate hehydrogenase

ADT: arogenate dehydratase

PDH: prephenate dehydrogenase

4-HPP: 4-hydroxypyruvate

HPPD: hydroxyphenylpyruvate dioxygenase

TAT: tyrosine aminotransferase

HmgDO: homogentisate dioxygenase

HPT: homogentisate phytyltransferase

HGGT: homogentisate geranylgeranyltransferase

MAAI: maleylacetoacetate isomerase

FAA: fumaryl acetoacetase

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する)

除草剤イソキサフルトールは、植物の根及び葉より吸収されると速やかに2-シア
 ノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プ
 ロパン-1,3-ジオン(除草剤イソキサフルトール由来のジケトニトリル構造物。以
 下、「DKN」とする。)へと代謝され、生じたDKNが4-HPPと競合してHPPD蛋白
 5 質の活性部位に可逆的に結合することにより、HPPD蛋白質の活性を阻害する
 (Matringe *et al.*, 2005)。その結果、植物はHGAを合成できなくなり、チロシン分
 解、プラストキノン及びトコフェロールの合成が阻害され、光合成が不安定と
 なり、葉緑体の分解を伴った白化症状を示し、枯死する(図2)。

i) 非組換えワタに除草剤イソキサフルトール散布



ii) 本組換えワタに除草剤イソキサフルトール散布

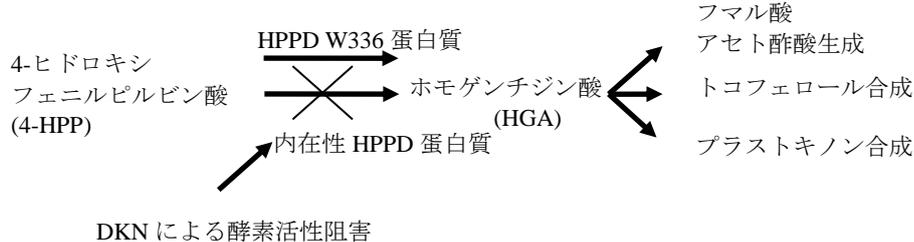


図2 本組換えワタにおける HPPD W336 蛋白質の作用機作

HPPD 蛋白質は4-ヒドロキシフェニルピルビン酸(4-HPP)からホモゲンチジン酸(HGA)への反応を触媒する。通常、イソキサフルトールの細胞内代謝産物である DKN によってこの酵素活性が阻害され、チロシン分解、トコフェロール合成及びプラストキノン合成ができなくなり、枯死するのに対して、HPPDW336 蛋白質は影響を受けず、正常な代謝ができることで除草剤イソキサフルトールに対して耐性を示す。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

10

本組換えワタに導入された *hppdPfW336-1Pa* 遺伝子の供与体は、*P. fluorescens* A32株である。*hppdPfW336-1Pa* 遺伝子は、*P. fluorescens* A32株から単離された野生型 *hppd* 遺伝子の翻訳領域の1ヵ所に部位特異的に突然変異を導入して作製された。この突然変異により HPPD W336蛋白質のアミノ酸配列は野生型 HPPD蛋白質の336番目のアミノ酸のグリシン(Gly)がトリプトファン(Trp)に変化し、HPPD
 15 阻害剤に対する耐性が改善している(Boudec *et al.*, 2001)。

DKNが4-HPPの競合阻害剤となることから、DKNに対する結合定数(constant of

association; K_{on})値を*P. fluorescens*由来の野生型HPPD蛋白質とHPPD W336蛋白質で比較したところ、前者の $1.3 \times 10^4 (M^{-1}S^{-1})$ に対し後者は $4.4 \times 10^2 (M^{-1}S^{-1})$ であり、野生型HPPD蛋白質のDKNに対する結合定数値はHPPD W336蛋白質のそれと比較して29.5倍高かった (Matringe *et al.*, 2005)。その結果、HPPD W336蛋白質は
5 DKNによる活性阻害を受けずHGA合成が機能するため、チロシン分解、トコフェロール合成及びプラストキノンの合成が正常に行われ、生育することができる(図2, p.15)。

また、HPPD W336蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2016年にFARRPの
10 AllelgenOnlineデータベース (version16)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な
同源性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの同源性は認められなかった。

なお、本組換えワタに導入された*hppdPfW336-1Pa*遺伝子は、生物多様性影響
評価検討会総合検討会(平成26年12月9日開催)において第一種使用規程に従って
15 使用した場合、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された除草剤グリ
ホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72(OECD UI: MST-FGØ72-2)に
導入されている*hppdPfW336*遺伝子のDNAコドンに最適化しているが、この改変によりHPPD W336蛋白質のアミノ酸配列は変化していない。

20 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蛋白質と機能的に同一である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であるが、本経路における律速酵素
25 ではなく、EPSPS活性が増加しても、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る(Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。
また、通常40倍のEPSPS蛋白質を生成する植物培養細胞において、最終産物の芳香族アミノ酸は過剰に合成されないことが報告されている(Smart *et al.*, 1985)。

30 なお、同一の遺伝子を有する除草剤グリホサート耐性ワタGHB614において、芳香族アミノ酸の値に影響がないことが示されている。

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、反応の起こり易さを示す特異性定数(Specificity constant) k_{cat}/K_m の値で比較すると、EPSPS蛋白質のシキミ酸との反応特異性は、
35 EPSPS蛋白質のS3Pとの反応特異性の約200万分の1に過ぎず (Gruys *et al.*, 1992)、EPSPS蛋白質は高い基質特異性を有している。

以上から、*2mepsps*遺伝子の発現により、宿主の持つ代謝系への影響はないと考えられる。

5 HPPD W336蛋白質

HPPD W336蛋白質と機能的に同一なHPPD蛋白質は、好氣的代謝でのチロシン分解において4-HPPを基質としHGAへの反応を触媒することが知られているが、植物においてはHGAを基にトコフェロール、トコトリエノール及びプラストキノンの同化が行われる。既存のHPPD蛋白質に加えてHPPD W336蛋白質が発現することにより、HPPD蛋白質の活性が高まることでトコフェロール及びトコトリエノール量の増加が考えられたが、HPPD蛋白質が本経路における律速酵素ではないことは多くの文献によって報告されている(Mène-Saffrané and Dellapenna, 2010)。実際に、HPPD蛋白質を過剰発現させたナタネ、イネ、タバコ及びシロイヌナズナにおいて本経路の最終産物の一つであるトコフェロールの量は変わらないかわずかに上昇した程度であった。この理由の一つとして、4-HPPよりも上流にあるチロシンの量が制御を受けていると考えられている(Tsegaye *et al.*, 2002; Falk *et al.*, 2003; Raclaru *et al.*, 2006; Farré *et al.*, 2012)。

なお、同一のHPPD W336蛋白質を発現する除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72のチロシン及びトコフェロール量において、非組換えダイズとの間に顕著な影響がないことが示されている。

HPPD蛋白質の基質特異性に関し、真核生物及び原核生物におけるHPPD蛋白質の基質となり得る化合物について、文献調査を行った。その結果、HPPD蛋白質の基質として知られる4-HPPのほかに、植物体内に見られ基質となり得る化合物としてフェニルピルビン酸(PP)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸(3,4-dHPP)、 α -ケトイソカプロン酸(KIC)、 α -ケト- γ -(メチルチオ)ブチル酸(KMTB)が挙げられた(別添資料1)。

また、*P. fluorescens*の野生型HPPD蛋白質とHPPD W336蛋白質の4-HPPに対する反応定数(K_m , K_{cat})を調査したところ、HPPD W336蛋白質の活性速度(K_{cat} ; 野生型HPPD $4.0 \pm 1.4 \text{ s}^{-1}$, HPPD W336 $1.9 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$)は低下していたが、両蛋白質の4-HPPに対する親和性(K_m ; 野生型HPPD $262 \pm 54 \mu\text{M}$, HPPD W336 $262 \pm 67 \mu\text{M}$)は同等であった(別添資料2, Table 1, p.9)。そこで、基質となり得る4つの化合物それぞれについて両蛋白質との反応を4-HPPと相対的に比較したところ、PP、KIC及びKMTBでは反応がみられなかった。一方、3,4-dHPPのみわずかに反応が見られたがその値は非常に小さく(野生型HPPD 2.4%, HPPD W336 4.8%)、また、人工

的に調整した*in vitro*における結果であることから、3,4-dHPPは植物体内において自然条件下では基質としての機能はないと考えられた(別添資料2, Table 2, p.9)。

5 以上から、HPPD W336蛋白質の発現により、宿主の代謝系に及ぼす影響は低いと考えられる。

(2)ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

- 5 本組換えワタの作出に用いたベクターは、pUC19及びpGSC1700等を基に構築されたプラスミドpTSIH09である(図3, p.20)。

ロ 特性

10 ① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えワタの作出に用いられたプラスミドpTSIH09の全塩基数は13,099bpである(別添資料3)。プラスミドpTSIH09の構成要素は表1(p.10)に示した。

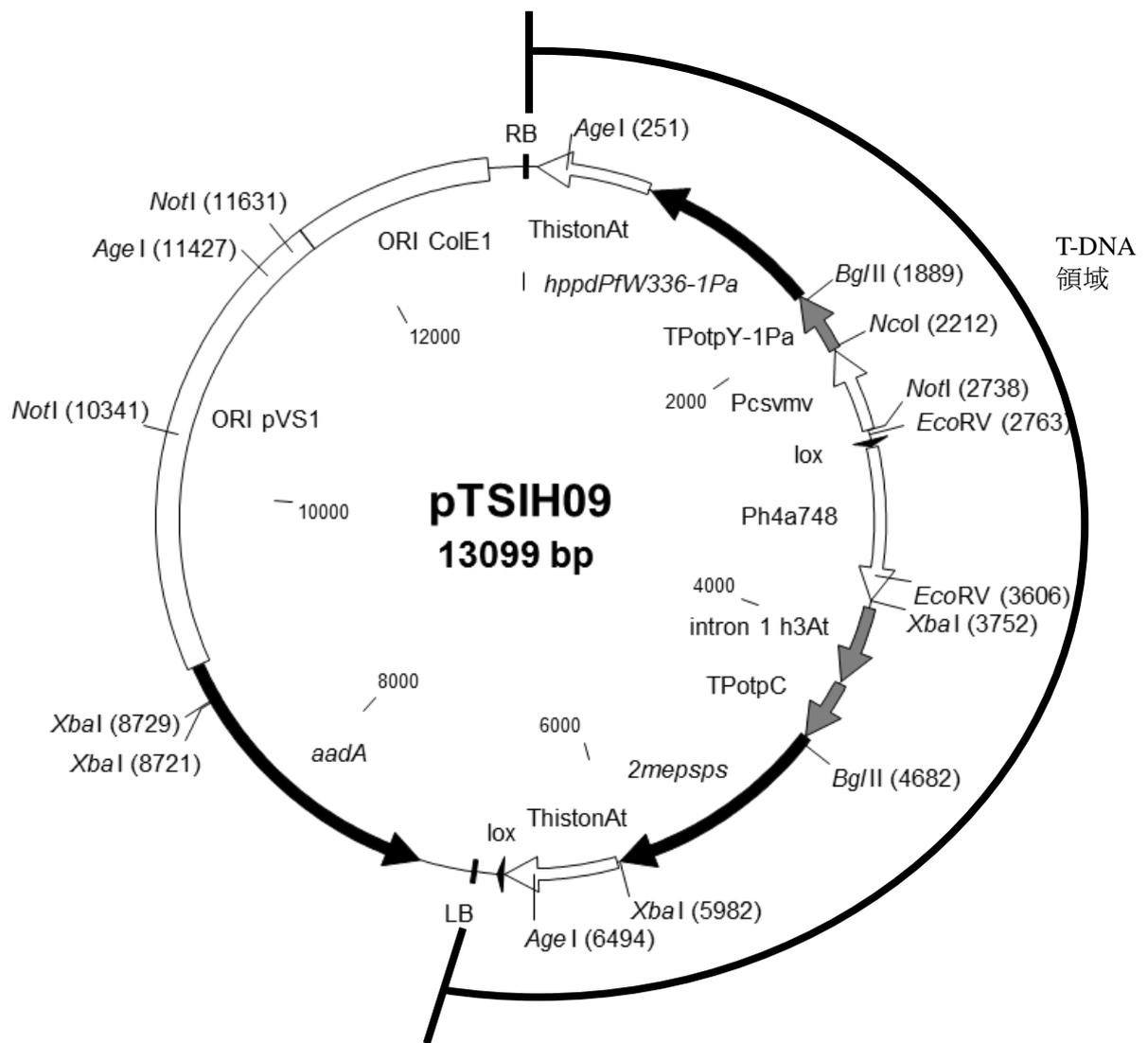
15 ② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20 プラスミドpTSIH09は、T-DNA領域配列の外側に下記に示す機能を持つ配列を有する。なお、本組換えワタ(T1及びBC2F3世代; 図4の③, p.22)にはこれらの配列が導入されていないことがサザンブロット分析により確認されている(別添資料4)。

- *E. coli*のプラスミドpBR322由来複製起点(ORI ColE1; Bolivar *et al.*, 1977)及び*P. aeruginosa*のプラスミドベクターpVS1の複製起点(ORI pVS1; Hajdukiewicz *et al.*, 1994)。それぞれ、*E. coli*及び*A. tumefaciens*において自律的複製を行わせる機能を有する。
- 25 - *E. coli*由来のアミノグリコシド系抗生物質耐性遺伝子(*aadA*; Fling *et al.*, 1985)を含む配列。*E. coli*及び*A. tumefaciens*において選抜マーカーとして利用した。

30 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

プラスミドpTSIH09の感染性は知られていない。



5

10

図3 プラスミドpTSIH09の構成地図及び制限酵素切断部位
 (注：本図にに記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

(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

5 宿主内にはプラスミド pTSH09 上の *2mepsps* 遺伝子発現カセット [Ph4a748]-[intron1 h3At]-[TpotpC]-[*2mepsps*]-[ThistonAt] 及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子発現カセット [Pcsmv]-[Tpotp Y-1Pa]-[*hppdPfw336-1Pa*]-[ThistonAt] を含む T-DNA 領域が移入された。T-DNA 領域の構成は図3(p.20)に示した。

10 ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

既存のワタ品種 Coker 312 の種子を MS 培地上で発芽させ、プラスミド pTSH09 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により既存のワタ品種 Coker312 の胚軸断片に導入した。

15

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

20 形質転換を行った細胞は、除草剤グリホサートを含む培地で選抜した。

② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

25 抗生物質チカルシリン (Ticarcillin) を添加した培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は除去されている。さらに、本組換えワタの T4 世代 (図4の⑦, p.22) のバルク種子において、無作為に抽出した 10 粒の種子を 1 サンプルとして 3 サンプル用意し、それぞれのサンプルから DNA を抽出した。T-DNA とプラスミド pTSH09 外骨格領域にまたがる位置を標的として PCR 分
30 析を行ったところ、調査した全てのサンプルにおいて標的とする増幅産物は得られなかった。このことから、本組換えワタには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は存在しないことが確認された。

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
35

形質転換後のT0世代の植物体において、HPPD阻害型除草剤により *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の発現を確認した。その後、T1世代からT7世代までグリホサート散布により *2mepsps* 遺伝子の発現を確認するとともに、本組換えワタを選抜した。本図中に該当する系統及び本申請における承認対象の範囲を図4に示した。

本組換えワタについては、隔離ほ場試験終了後に「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」における第一種使用等の申請を行う予定である。その他、2017年前半に食品衛生法に基づく食品としての安全性の確認申請を厚生労働省に、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく飼料としての安全性の確認申請を農林水産省にそれぞれ行う予定である。

【社外秘情報につき非開示】

図4 本組換えワタの育成図

(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

本組換えワタのヘテロ接合体を自殖することで得られた3つの世代集団(F2、BC1F2及びBC2F2; 図4の⑤)における *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子各々の遺伝子型について、それぞれの遺伝子に特異的に設計したプライマーを用いて、リアルタイムPCRにより各個体ごとに接合性の判定を行った。その結果について分離比の検定を行ったところ、いずれの遺伝子においても供試したすべての世代において、両遺伝子をホモで有する個体(ホモ接合体)、ヘテロで有する個体(ヘミ接合体)及び遺伝子を有さない個体(null分離体)の分離比が1:2:1を示した(表2, p.23)。この結果は、挿入遺伝子座に関して一遺伝子座支配と仮定した場合に想定される分離比に適合することから、挿入遺伝子は染色体上の1カ所に存在すると考えられる。

表 2 F2、BC1F2 及び BC2F2 世代における PCR による *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子各々の遺伝子型の検定

	F2		BC1F2		BC2F2	
	観測値	期待値	観測値	期待値	観測値	期待値
ホモ接合体	19	21.25	24	23	45	57.25
ヘミ接合体	49	42.50	50	46	116	114.5
null 分離体	17	21.25	18	23	68	57.25
χ^2 値*	2.08		1.48		4.66	

*一遺伝子座と仮定し、 χ^2 検定を実施。自由度 2、有意水準 5%において χ^2 値 5.99 以上で帰無仮説が棄却される。

5 本遺伝子型の検定では *2mepsps* 遺伝子の特異的に増幅するプライマー及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子の特異的に増幅するプライマーを設計した。遺伝子型の検定では量的リアルタイムPCR法を用い、各個体の *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子それぞれの遺伝子型を、遺伝子コピー数が 1 の場合と比較することで決定した。また、図 5 (p.24) に示すように、本組換え体における *2mepsps* 遺伝子と *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子は同一染色体上に近接して挿入されているため、それぞれの遺伝子型の検定結果がすべての個体で一致したことから同一の表としてまとめた。

10 (注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

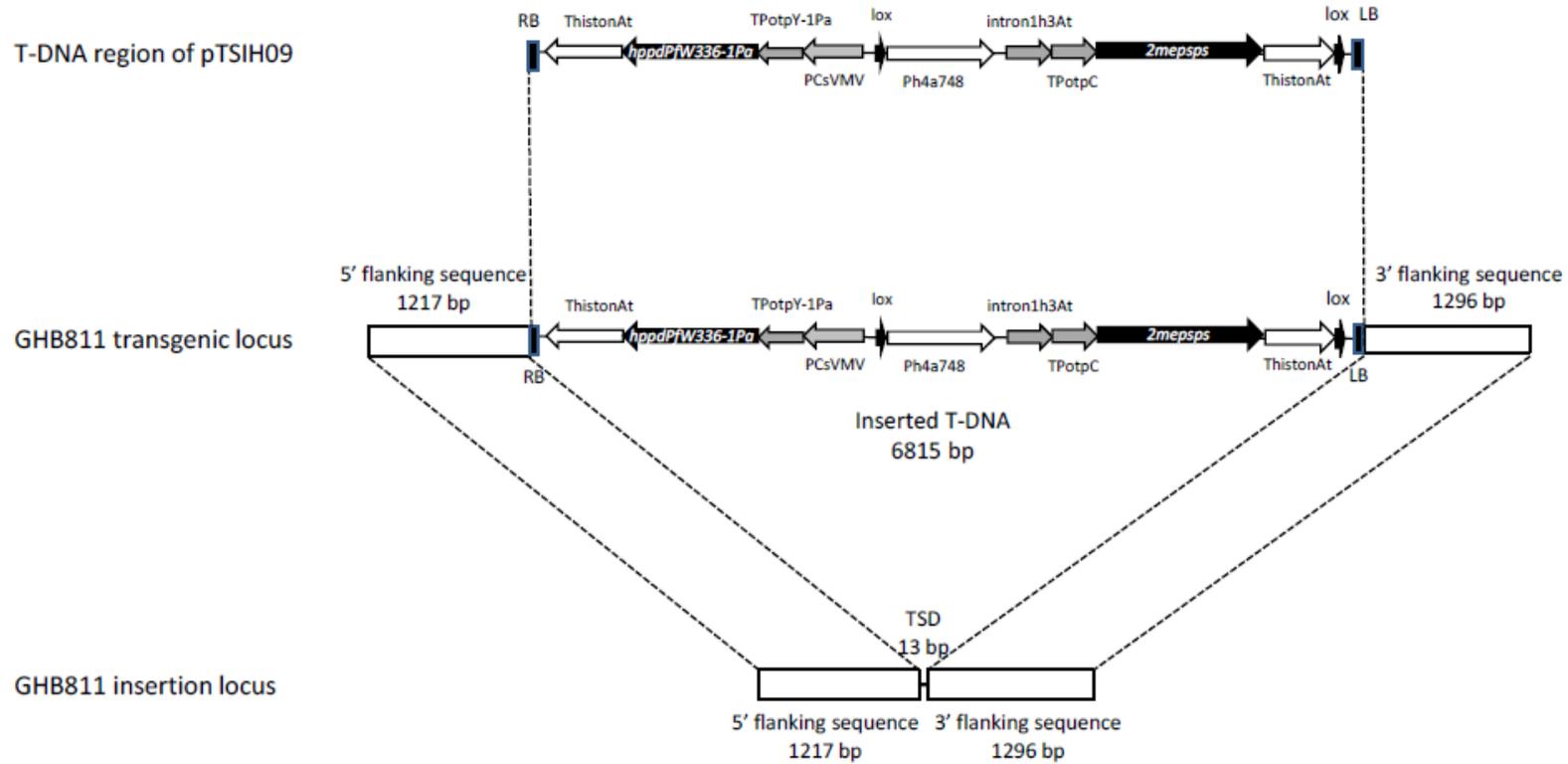
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

15 本組換えワタ(T1世代; 図4の①及び②, p.22)の葉から抽出したゲノムDNAについてサザンブロット分析及びシーケンス解析を行った。

その結果、本組換えワタには *2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPfw336-1Pa* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域が 1 コピー挿入されていることが確認された(図5 p.24; 別添資料4)。

20 また、シーケンス解析の結果、挿入DNAの5'側(1217bp)及び3'側(1296pb)の近傍配列は、宿主品種の挿入位置に隣接する配列と一致したが、挿入位置において13bpの欠失が確認された(図5, p.24; 別添資料5)。

25 また、挿入遺伝子の安定性を調べるため、本組換えワタの T1、T3、T4、BC1F2 及び BC2F3 世代(図 4 の④, p.22)の葉から抽出したゲノム DNA について T-DNA 領域をプローブとしてサザンブロット分析を行った。その結果、各世代において同じサイズのバンドが検出され、挿入 DNA が複数世代に安定して伝達されていることが確認された(別添資料 6, Figure 3~7, p. 22~26)。



20 図5 本組換えワタにおける挿入DNA領域の概略図

図中のInsertion locusはワタ宿主品種の染色体におけるDNA挿入前の概略図を、transgenic locusはDNA挿入後の概略図をそれぞれ示す。また、TSD(Target Site Deletion)は、遺伝子挿入により欠失した部位を示す。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

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

本組換えワタには1コピーのT-DNA領域が移入されたため、本項目は該当しない。

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

2015年に米国の温室内で栽培された、本組換えワタ3世代(T4、T5及びBC2F4、各4個体；図4の⑥，p.22)を用い、4~6葉期の葉及び成熟期の有毛種子における2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現量をELISA法により分析した。その結果、いずれの世代及び組織においても両蛋白質が検出されたが(表3)、組織、世代間で両蛋白質の発現量に違いがみられた。一般的に、植物内における蛋白質の発現には、遺伝的背景、環境の違い、個体差といった多数の要因が関与し、発現量の変動することが報告されている(Nguyen and Jehle, 2007; Jamal *et al.*, 2009; Nguyen and Jehle, 2009; Kramer *et al.*, 2016)。これらのことから、本組換えワタの世代間に見られる両蛋白質の発現量の差は自然変動の範囲内と考えられた。

表3 本組換えワタの3世代(T4,T5及びBC2F4)における葉及び有毛種子での2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現量

組織	供試世代	2mEPSPS ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重量)	HPPD W336 ($\mu\text{g/g}$ 乾燥重量)
		平均値 \pm 標準偏差	平均値 \pm 標準偏差
葉	T4	1078.03 \pm 66.03	442.73 \pm 38.21
	T5	1115.46 \pm 14.17	421.06 \pm 47.68
	BC2F4	1498.30 \pm 98.31	410.89 \pm 60.30
有毛種子	T4	163.07 \pm 5.78	42.83 \pm 8.34
	T5	160.49 \pm 14.68	42.45 \pm 9.69
	BC2F4	147.80 \pm 4.77	34.97 \pm 3.13

分析には4個体を用いて、1個体につき3回の測定を行った値の平均値 \pm 標準偏差(n=4)。

葉及び有毛種子における定量限界下限値(LLOQ)は2mEPSPS蛋白質でそれぞれ2 $\mu\text{g/g}$ 及び8 $\mu\text{g/g}$ 、HPPD W336蛋白質それぞれ16 $\mu\text{g/g}$ 及び0.5 $\mu\text{g/g}$ である。なお、非組換え体における2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質の発現量は共に定量限界下限値以下であった。

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

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

5 本組換えワタは伝達性のあるDNA配列を有しておらず、自然環境下において移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(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

10 本組換えワタは、本組換えワタに特異的に結合可能なプライマーとTaqmanプローブを用いた real-time PCR法による検出及び識別が可能である(別添資料7)。検定に用いるDNAの濃度は、PCRの1反応当たり2.5ng~50ngであることが推奨されている。

15 本法の信頼性については8サンプルの本組換えワタ及び2サンプルの非組換えワタを用いて再現性の確認を行った。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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

本組換えワタでは、*2mepsps*遺伝子の発現により2mEPSPS蛋白質が産生され、除草剤グリホサート耐性を示すと共に、*hppdPfw336-1Pa*遺伝子の発現によりHPPD W336蛋白質が産生され、除草剤イソキサフルトール耐性を示す。

25

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

30 ワタは我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下において雑草化した事例は報告されていない。本組換えワタは、*2mepsps*遺伝子がコードする2mEPSPS蛋白質により除草剤グリホサート耐性を、また、*hppdPfw336-1Pa*遺伝子がコードするHPPD W336蛋白質により除草剤イソキサフルトール耐性を示す。2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質は共に高い基質特異性を有しており、これらの蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはない
35 と考えられる。なお、本組換えワタで発現する2mEPSPS蛋白質は、既に第一種使用規程が承認(平成22年6月11日)されている除草剤グリホサート耐性ワタ

GHB614が有する2mEPSPS蛋白質と同一である。また、本組換えワタで発現するHPPD W336蛋白質は、生物多様性影響評価検討会総合検討会(平成26年12月9日開催)において第一種使用規程に従って使用した場合、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズFG72が有するHPPD W336蛋白質と同一である。いずれの蛋白質についても、
5 これまでに除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性を付与する以外に、宿主の生理学的又は生態学的特性に影響を及ぼしたとする報告はない。

以上より、2mEPSPS 蛋白質及び HPPD W336 蛋白質が宿主の代謝系を変化させる可能性、生理学的及び生態学的特性に影響を与える可能性は低い。よって、
10 本組換えワタの生理学的又は生態学的特性に関するデータを用いずに、隔離ほ場における生物多様性影響評価を行うことは可能であると判断した。

なお、本組換えワタの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。我が国には宿主であるワタ(*G. hirsutum* L.)
15 と交雑可能な近縁野生種は存在しないことから交雑性については調査しない。

- a) 形態及び生育の特性
- b) 生育初期における低温耐性
- c) 成体の越冬性
- 20 d) 花粉の稔性及びサイズ
- e) 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率
- f) 有害物質の産生性

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

5 隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

(2) 使用等の方法

所在地：茨城県筑西市向上野1500番地41

10 名称：バイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所 隔離ほ場
試用期間：承認日から平成32年3月31日まで

隔離ほ場の施設

- 15
- 1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
 - 2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている。
 - 20 3) 隔離ほ場で使用した、機械、器具、靴等に付着した土、組換え作物の種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該作物の隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
 - 4) 隔離ほ場周辺には、防風林を設置している。また、鳥害を防ぐための防鳥網を設置している。

25 隔離ほ場での作業要領

- 1) 組換え作物及び比較対象の作物以外の植物が隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- 2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該作物が漏出しない構造の容器に入れる。
- 30 3) 2)により運搬又は保管をする場合を除き、組換え作物の栽培終了後は当該作物及び比較対照の作物を隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せず組換え作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 35 5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管

理を行う。

- 6) 1)から5)までに掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。
- 7) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

5

- (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

—

10

- (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。

15

- (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

—

20

- (6) 国外における使用等に関する情報

2014 及び 2015 年に、米国においてはほ場試験が行われているが、本組換えワタと非組換えワタとの間に、生物多様性に影響を与えるような相違は報告されていない。

25

なお、本組換えワタの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は表 4 に示す。

表 4 本組換えワタの海外における申請予定

機関	安全性審査の種類	申請時期
米国農務省(USDA)	環境	【社外秘情報につき非開示】
米国食品医薬品庁(FDA)	食品・飼料	【社外秘情報につき非開示】
韓国食品医薬品安全処(MFDS)	食品	【社外秘情報につき非開示】
韓国農村振興庁(RDA)	環境・飼料	【社外秘情報につき非開示】
カナダ保健省(HC)	食品	【社外秘情報につき非開示】
カナダ食品検査庁(CFIA)	環境・飼料	【社外秘情報につき非開示】
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)	食品	【社外秘情報につき非開示】

30

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

第一、2(6)②に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場で使用する場合の生物多様性影響について、生理学的又は生態学的特性のデータを用いずに評価した。

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

10

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

第一、2(6)②より、本組換えワタの導入遺伝子である2mepsps遺伝子により発現する2mEPSPS蛋白質及びhppdPfw336-1Pa遺伝子により発現するHPPD W336蛋白質はともに基質特異性が高く、植物体の他の代謝系を変化させることはないと考えられる。したがって、2mepsps遺伝子及びhppdPfw336-1Pa遺伝子による影響が宿主の持つ代謝系を変化させ、競合における優位性に関わる生理学的又は生態学的特性について宿主との相違をもたらすことはないと考えられる。

20

また、本組換えワタが有する除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性は、除草剤グリホサート及び／又は除草剤イソキサフルトールが散布される環境下においてのみ競合において優位に作用するが、自然環境下ではこれらの除草剤が散布される環境は考え難く、本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。

25

したがって、競合における優位性について、非組換えワタとの間に大きな相違はないと考えられ、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、競合における優位性に起因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。

30

(2) 影響の具体的内容の評価

35

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

5 (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、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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

15

本組換えワタの種子には既存のワタの種子と同様に、非反芻動物等に対して毒性を示すゴッシポール、並びに飽和脂肪酸の脱飽和を阻害し、鶏卵の変色や孵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。ワタは種子中にこれらの有害物質を含むが、綿実は大量の繊維に覆われているため鳥類のような種子を摂食する動物は好まず、哺乳類もゴッシポールが含まれていることや種子の形態により摂食は避けると考えられる。さらに、野生の哺乳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、ワタが他感物質等のような野生動植物等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。

25

本組換えワタは除草剤グリホサート耐性を付与する2mEPSPS蛋白質及び除草剤イソキサフルトール耐性を付与するHPPD W336蛋白質を産生するが、2mEPSPS蛋白質及びHPPD W336蛋白質は有害物質としては知られておらず、さらに両蛋白質はいずれも高い基質特異性を有しており、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。また、両蛋白質のアミノ酸配列に基づき包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

したがって、有害物質の産生性について、非組換えワタとの間に相違はないと考えられ、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲

35

内では、有害物質の産生性に起因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

5

—

(3) 影響の生じやすさの評価

10

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

15 以上から、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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

20

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

25 我が国において本組換えワタの宿主品種であるワタ(*G. hirsutum*)と交雑可能な近縁野生種は存在しないことから、本組換えワタの交雑性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

30

(3) 影響の生じやすさの評価

—

35

(4)生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

5 以上から、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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. その他の性質

10 上記のほかに生物多様性影響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考えられる。

第三 生物多様性影響の総合的評価

第一、2(6)②に記載したとおり、本組換えワタの宿主の特性と導入遺伝子の特性を考慮し、本組換えワタを隔離ほ場で使用する場合の生物多様性影響評価を、
5 生理学的又は生態学的特性のデータを用いずに評価した。

競合における優位性に関して、ワタは我が国において長期にわたる使用等の経験があるが、我が国の自然環境下における自生は報告されていない。本組換えワタの導入遺伝子である2mepsps遺伝子により発現する2mEPSPS蛋白質及び
10 hppdPfw336-1Pa遺伝子により発現するHPPDW336蛋白質はともに基質特異性が
高く、除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性を付与する以外に、宿主の代謝系を変化させ影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。さらに、本組
換えワタが有する除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性は、除草剤
15 が散布されない自然環境下では、競合において優位に作用することはないと考
えられた。

以上から、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲
20 内では、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。

有害物質の産生性に関して、本組換えワタの種子は既存のワタの種子と同様に、ゴッシポールやシクロプロペン脂肪酸といった有害物質が含まれているが、綿実
25 は大量の繊維に覆われている形状から、野生動物がワタの種子を好んで摂食することは考え難い。また、ワタが他感物質等のような野生動植物等に影
響を及ぼす有害物質を産生することは知られていない。

2mEPSPS蛋白質及びHPPDW336蛋白質はいずれも高い基質特異性を有しており、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。

以上から、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲
30 内では、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。

交雑性に関して、我が国には、ワタ(*G. hirsutum*)と交雑する可能性のある野生
35 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
それはないと判断した。

以上を総合的に評価し、一定の作業要領を備えた限定環境で実施される本組換えワタの隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲では、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

- Berardi, L. C.; Goldblatt, G. A. (1980) Gossypol. *In*: Liener, I. E. (ed.) Toxic Constituents of Plant Foodstuffs, 2nd edn. Academic Press, New York. 184-237.
- 5 Bolivar, F.; Rodriguez, R. L.; Greene, P. J.; Betlach, M. C.; Heyneker, H. L; Boyer, H. W. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95-113.
- 10 Boudec, P.; Rodgers, M.; Dumas, F.; Sailland, A.; Bourdon, H. (2001) Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides. US Patent US 6245968B1 (12-JUN-2001) AVENTIS CROPSCIENCE S.A. (FR).
- 15 Brownlee, J. M.; Johnson-Winters, K.; Harrison, D. H.; Moran, G. R. (2004) Structure of ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. *Biochemistry* 43: 6370-6377.
- 20 Chabouté, M.; Chaubet, N.; Philipps, G.; Ehling, M.; Gigot, C. (1987) Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 8: 179-191.
- Chaubet, N.; Clement, B.; Gigot, C. (1992) Genes encoding a histone H3.3-like variant
25 in *Arabidopsis* contain intervening sequences. *Journal of Molecular Biology* 225: 569-574.
- Falk, J.; Andersen, G.; Kernebeck, B.; Krupinska, K. (2003) Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in
30 elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40.
- FAO (2016) FAOSTAT Final 2014 data, Crops. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
<http://faostat3.fao.org/home/E>
35 (閲覧日2016年2月15日)

Farré, G.; Sudhakar D.; Naqvi S.; Sandmann, G.; Christou, P.; Capell, T.; Zhu, C. (2012) Transgenic rice grains expressing a heterologous *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase shift tocopherol synthesis from the γ to the α isoform without increasing absolute tocopherol levels. *Transgenic Res.* 21: 1093-1097.

5

Fling, M. E.; Kopf, J.; Richards, C. (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.

10 Fritze, I. M.; Linden, L.; Freigang, J.; Auerbach, G.; Huber, R.; Steinbacher, S. (2004) The crystal structures of *Zea mays* and *Arabidopsis* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Plant Physiology* 134: 1388-1400.

15 Gruys, K. J.; Walker, M. C.; Sikorsli, J. A. (1992) Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.

20 Hajdukiewicz, P.; Svab, Z.; Maliga, P. (1994) The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25: 989-994.

Herrmann K. M. (1983) The common aromatic biosynthetic pathway. *In: amino acids: Biosynthesis and genetic regulation.*, Herrmann K. M. and R. L. Somerville, (eds) Addison-Wesley Publishing Co., Advanced Book Program Reading, MA. pp.301-322.

25

Hoess, R. H.; Abremski, K. (1985) Mechanism of strand cleavage and exchange in the *Cre-lox* site-specific recombination system. *J. Mol. Biol.* 181: 351-362.

30 Jamal A., Ko K., Kim H-S., Choo Y-K., Joung H., Ko, K. (2009) Role of genetic factors and environmental conditions in recombinant protein production for molecular farming *Biotechnology Advances* 27; 914-923.

35 Kramer, C., Brune, P., McDonald J., Nesbitt M., Sauve A., Stock-Weyhtermueller S. (2016). Evolution of risk assessment strategies for food and feed uses of stacked GM events. *Plant Biotechnology Journal* 14; 1-15.

- Lebrun, M.; Leroux, B.; Sailland, A. (1996) Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996). RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- 5 Lebrun, M.; Sailland, A.; Freyssinet, G. (1997) Mutated 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. PCT Patent Application (WO9704103-A1). PHONE POULENC AGROCHIMIE (FR).
- 10 Matringe, M.; Sailland, A.; Pelissier, B.; Rolland, A.; Zink, O. (2005) *p*-Hydroxyphenylpyruvate dioxigenase inhibitor-resistant plants. Pest Management Science 61: 269-276.
- Mène-Saffrané L.; DellaPenna, D. (2010) Biosynthesis, regulation and functions of
15 tocochromanols in plants. Plant Physiology and Biochemistry 48:301-309.
- Nguyen, H. T., and Jehle, J. A. (2007) Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize Mon810. Journal of Plant Diseases and Protection 114: 82-87.
- 20 Nguyen, H. T. and Jehle, J. A. (2009). Expression of Cry3Bb1 in transgenic corn MON88017. J. Agric. Food Chem. 57: 9990-9996.
- OECD (2004) Consensus document on compositional considerations for new varieties of
25 cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*): key food and feed nutrients and anti-nutrients. Series on the safety of novel foods and feeds, No. 11. ENV/JM/MONO(2004)16.
- OECD (2008) Consensus document on the biology of cotton (*Gossypium* spp.). Series
30 on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, No. 45. ENV/JM/MONO(2008)33.
- Oosterhuis, D. M.; Jernstedt, J. (1999) Morphology and anatomy of the cotton plant. *In*; Smith, W. C., Cothren, J. T. (eds.) Cotton: Origin, History, Technology and Production.
35 Wiley, New York. 175-206.

Raclaru, M.; Gruber, J.; Kumar, R.; Sadre, R.; Lühs, W.; Zarhloul, M. K.; Friedt, W.; Frentzen, M.; Weier, D. (2006) Increase of the tocopherol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Mol. Breeding* 18: 93-107.

5

Smart, C. C.; Johanning, D.; Muller, G.; Amrhein, N. (1985) Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260: 16338-16346.

10 Stipanovic, R. D.; Puckhaber, L. S.; Bell, A. A.; Percival, A. E.; Jacobs, J. (2005) Occurrence of (+)- and (-)-gossypol in wild species of cotton and in *Gossypium hirsutum* var. *marie-galante* (Watt) Hutchinson. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6266-6271.

15 Tsegaye, Y.; Shintani, D. K.; DellaPenna, D.; (2002) Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 913-920.

Van Deynze, A. E.; Sundstrom, F. J.; Bradford, K. J. (2005) Pollen-mediated gene flow in California cotton depends on pollinator activity. *Crop Sci.* 45: 1565-1570.

20

Weiss, U.; Edwards, J. M. (1980) Regulation of the shikimate pathway. *In: the biosynthesis of aromatic compounds.* John Wiley and Sons, New York. pp.287-301.

25 Zambryski, P. (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu. Rev. Genet.* 22:1-30.

Zhang, B.; Pan, E.; Guo, T.; Wnad, Q.; Anderson, T. A. (2005) Measuring gene flow in the cultivation of transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Molecular Biotechnology* 31: 11-20.

30

Zhu, J.; Oger, P. M.; Schrammeijer, B.; Hooykaas, P. J. J.; Farrand, S. K.; Winans, S. C. (2000) The bases of crown gall tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* 182: 3885-3895.

35 財務省 (2016) 貿易統計 <http://www.customs.go.jp/toukei/srch/index.htm>
(閲覧日 2016年5月6日)

新谷 勲 (1989) 食品油脂の科学 幸書房 31-32.

巽 二郎 (2000) ワタ. “作物学(Ⅱ) 工芸・飼料作物編”石井龍一 (執筆代表), 文永堂出版, 東京. 8-15.

5

農林水産省 (2016) 農林水産物輸出入概況 2015年 (平成27年) 確定値. 国際部 国際政策課 (平成28年3月24日公表)

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/pdf/yusyutu_gaikyo_15.pdf

(閲覧日 2016年4月6日)

10

原田 重雄 (1981) Ⅱ 繊維料 ワタ. 工芸作物学 栗原 浩編 農文協. 26-42.

別添資料の内容

- 別添資料1 : HPPD蛋白質の基質になり得る化合物の文献調査(Literature survey on potential alternative substrates for HPPD)
5 【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料2 : *Pseudomonas fluorescens*由来の野生型HPPD蛋白質及びHPPD W336蛋白質の基質特異性(Substrate specificity of the wild type HPPD and HPPD W336 proteins from *Pseudomonas fluorescens*)
10 【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料3 : プラスミドpTSIH09の塩基配列(Sequence determination of plasmid pTSIH09)
15 【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料4 : GHB811における挿入DNA領域の詳細決定及びベクター外骨格領域配列不在の確認 (Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in cotton GHB811)
20 【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料5 : GHB811の挿入部位及び挿入DNAの塩基配列(DNA sequence determination of the transgenic and insertion loci of cotton GHB811)
25 【社外秘情報につき非開示】
- 別添資料6 : GHB811の挿入配列の安定性(Structural stability analysis of cotton GHB811)
【社外秘情報につき非開示】
- 30 別添資料7 : イベント識別法(End-point taqman method)
【社外秘情報につき非開示】

緊急措置計画書

平成 28 年 9 月 5 日

5 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 ハーラルト・プリンツ
住所 東京都千代田区丸の内一丁目 6 番 5 号

10 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イソキサフルトール耐性ワタ(2mepsps, hppdPfw336-1Pa, *Gossypium hirsutum* L.)(GHB811, OECD UI: BCS-GH811-4)(以下、「本組換えワタ」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科学的に認められた場合は、以下の措置を執ることとする。

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

15

本組換えワタが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断された場合は、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部(表 1)を速やかに設置する。

表 1 危機対策本部名簿(平成 28 年 9 月現在)

(危機対策本部長)	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部 MA&RPD マネージャー
*	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部 種子規制部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 広報部 部長
	バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部 種子規制部

*管理責任者

(個人名は個人情報のため非開示)

20

2 第一種使用等の状況の把握の方法

栽培試験担当者及び管理責任者は、第一種使用等の状況に関し、可能な限り情報収集を行う。

25

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を

周知するための方法

本組換えワタの使用に伴い、生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合は、栽培試験担当者及び管理責任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
5 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

10 当該影響を生ずるおそれに基づき、本組換えワタを不活化する措置、本組換えワタの環境への放出を防止するための措置、又はすでに環境に放出された本組換えワタの拡散を防止する措置を講ずる。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

15

本組換えワタ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、緊急措置に対応するための社内における組織体制及び連絡窓口を報告する。

20

隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画書

第1 受容環境

5 1. 隔離ほ場の所在地等

(1) 名称

バイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所 隔離ほ場

(2) 住所

10 茨城県筑西市向上野 1500 番地 41

(3) 電話番号

0296-54-5120

15 (4) 地図

図 1(p.49)参照

2. 責任者等

(1) 隔離ほ場管理責任者

20 【個人情報につき非開示】

バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部

(2) 隔離ほ場管理主任者

【個人情報につき非開示】

25 バイエルクロップサイエンス株式会社 RPGA 本部

3. 試験期間

承認日から平成 32 年 3 月 31 日まで

30 4. 施設概要

部外者の立入りを禁止するための施設(フェンスや標識)及び組換え体がほ場外に流出することを防ぐための各種設備(洗い場、防鳥網、防風網、排水溝、浸透池、オートクレーブ等)を設置している(図 2, p.50)。

5. 面積

- (1) 隔離ほ場全体の面積
約 5200m²

- 5 (2) 試験に使用する面積
約 220m²

- (3) 試験区の配置図
図 3(p.50)参照

10

6. 隔離ほ場の周辺環境

- (1) 隔離ほ場周辺の地形

隔離ほ場が位置する茨城県筑西市は、茨城県の西部、筑波山の西側に位置する。市域はほぼ平坦で、利根川の支川、鬼怒川・小貝川が南北に貫流している(茨城県筑西市ホームページ、<http://www.city.chikusei.lg.jp/>)。

15

隔離ほ場には用水路が、また約 1.5km 離れた場所には桜川があるものの、隔離ほ場は筑西市が作成した洪水ハザードマップによると浸水想定区域に指定されておらず、また浸水実績区域にも含まれない。また、平成 27 年 9 月関東・東北豪雨の際にも浸水していない。

20

- (2) 土地利用状況

隔離ほ場の周辺は工業団地として利用されている。また、工業団地の周辺は水田・畑・民家・道路・用水路として利用されている。

25

- (3) 周辺の環境保護区

隔離ほ場より半径 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、原生自然環境保全地域、自然環境保全地域等)はない。また、最も近い自然保護地域は、水郷筑波国定公園(筑波地区)であり、隔離ほ場からの距離はほぼ 2.5km である。

30

- (4) 気象条件の平年値

① 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における気象データの平年値を表 1(p.51)に示す。

② 隔離ほ場の最寄の気象情報観測地点である下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における過去 3 年分の気象データを表 2(p.52)に示す。

35

(5) 台風の襲来歴

① 平均値

5 隔離ほ場のある関東甲信地方(伊豆諸島および小笠原諸島を除く)への台風
接近数の平均値は、年間 3.1 個である(気象庁ホームページ気象統計情報、ア
クセス 2016 年 2 月 17 日)。

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>

② 過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近数

10 関東甲信地方に台風が接近し¹、かつ隔離ほ場の最寄りの観測地点(茨城県
下妻アメダス観測所)において日ごとの最大風速が 15m/s を超えた回数²を隔
離ほ場周辺への接近回数とした。過去 10 年の隔離ほ場周辺への台風の接近
回数は、合計 5 回(2009 年 10 月、2011 年 9 月、2012 年 6 月、2012 年 9 月、
2013 年 9 月)であった。

15 (6) 過去 10 年間の隔離ほ場冠水の状況

隔離ほ場は 2012 年に完成して以来、冠水していない。なお、隔離ほ場が位
置する工業団地内の他の箇所においても過去 10 年にわたって冠水していない。

(7) 強風による被害の状況

20 防風網を設置していることから、強風による被害は受けにくく、過去に隔
離ほ場で栽培した作物が強風により大きな被害を受けたことはない。

(8) ハザードマップ

25 筑西市が作成した洪水ハザードマップ(筑西市ホームページ、
http://www.city.chikusei.lg.jp/cms/data/doc/1264495785_doc_2.pdf)において、隔離
ほ場周辺は浸水想定区域に指定されていない。また浸水実績区域内に位置し
ていない。

(9) 隔離ほ場における鳥獣害の被害

30 鳥獣による農作物への被害が考えられるが、隔離ほ場にはフェンス及び防
鳥網を設置する。

¹ 台風の中心が、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」とする。気象庁ホームページ気象統計情報ページより(閲覧日 2016 年 4 月 12 日)

² http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

台風の強風域の定義が平均風速 15m/s であることによる。

http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html

7. 隔離ほ場周辺の生物相

- (1) 遺伝子組換え農作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物等及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等なし

5

- (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等なし

8. 栽培管理

- 10 (1) 栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴を表 3(p.53)に示す。

- (2) 気象災害時の対応

15 気象災害が起こった場合、まず試験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緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずる。

- (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にすき込む等の適切な手段で処分する。

20

- (4) 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

・隔離ほ場の施設

25 1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。

2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすいところに掲げている。

30 3) 隔離ほ場で使用した、機械、器具、靴等に付着した土、組換え作物の種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該作物の隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

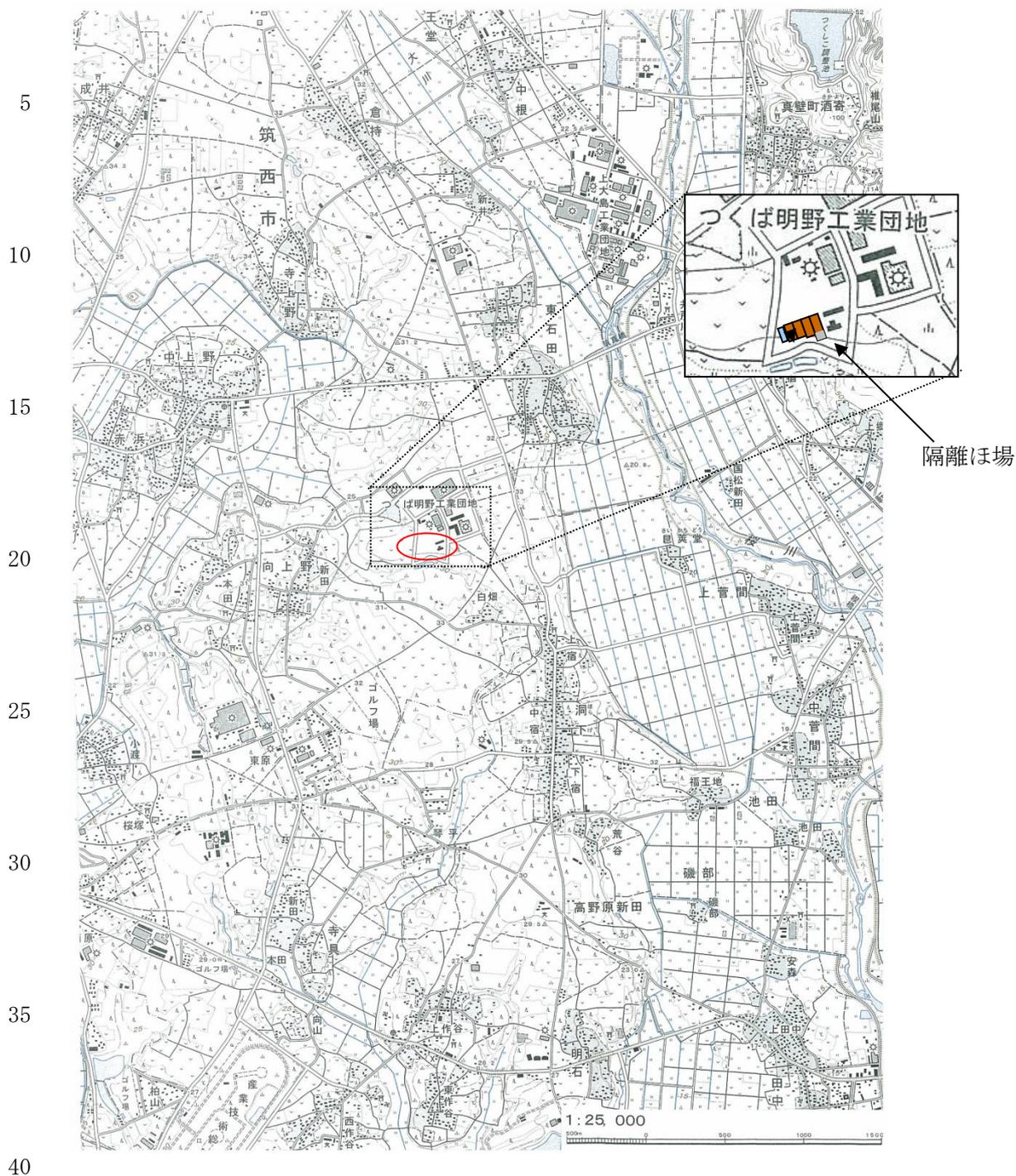
4) 隔離ほ場周辺には、防風林を設置している。また、花粉の飛散を減少させるための防風網及び鳥害を防ぐための防鳥網を設置している。

・隔離ほ場での作業要領

35 1) 組換え作物及び比較対象の作物以外の植物が隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。

- 2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該作物が漏出しない構造の容器に入れる。
- 3) 2)により運搬又は保管をする場合を除き、組換え作物の栽培終了後は当該作物及び比較対照の作物を隔離ほ場内にすき込む等により確実に不活化する。
- 5 4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せず組換え作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように設備の維持及び管理を行う。
- 10 6) 1)から 5)までに掲げる事項を第一種使用等を行うものに遵守させる。
- 7) 生物多様性影響が生ずる恐れがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。

図1 隔離ほ場の所在地に関する地図



○：隔離ほ場の所在地

「この地図は国土地理院長の承認を得て、同院発行の2万5千分の1地形図を複製したものである。(承認番号 平成23情複、第273号)」



5

図2 隔離ほ場の設備

① 事務所兼実験棟、②洗い場、③入口、④隔離ほ場を示す標識

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

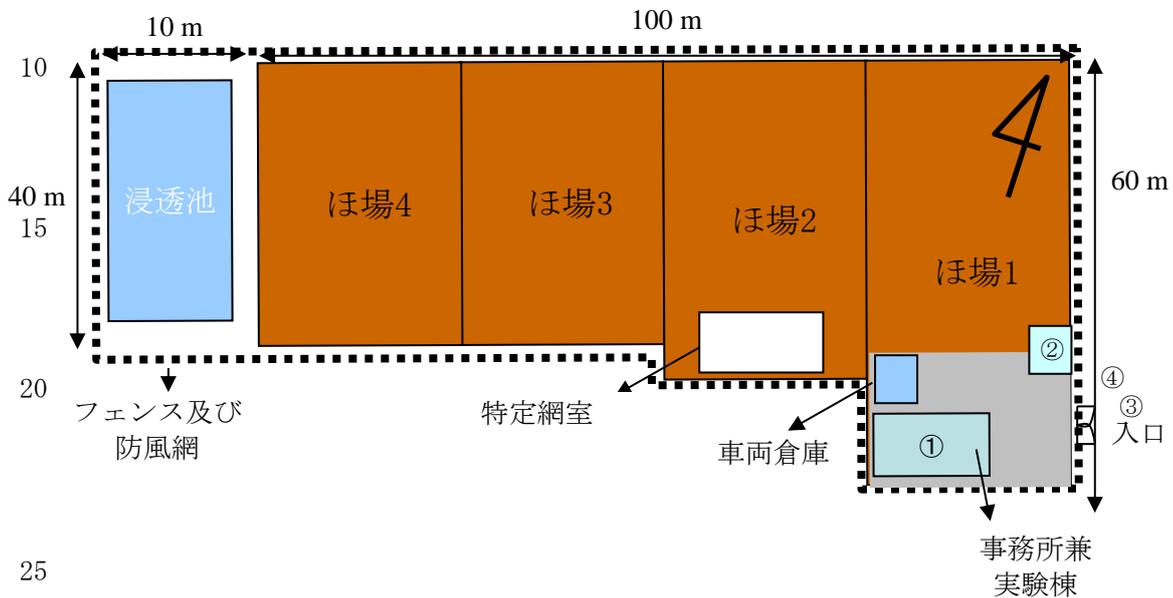


図3 試験区の配置図

ほ場 1~4 のうち約 220m² を使用する予定である。

図中の①~④は図2 の設備の位置を示す。

(注：本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

30

表 1 隔離ほ場周辺における平年値

(下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における気象データの平年値)

要素	降水量 (mm)	平均気温 (°C)	最高気温 (°C)	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	1987～ 2010
資料年数	30	30	30	30	30	24
1月	35.5	2.7	8.8	-2.7	2.0	190.0
2月	44.9	3.6	9.5	-1.8	2.2	180.3
3月	85.0	7.0	12.8	1.6	2.3	180.3
4月	101.1	12.6	18.6	7.0	2.5	175.7
5月	121.8	17.3	22.5	12.8	2.3	162.9
6月	131.1	20.6	25.0	16.9	2.0	113.7
7月	140.4	24.1	28.7	20.7	1.8	128.7
8月	141.8	25.5	30.5	22.0	1.9	168.5
9月	176.0	22.0	26.8	18.3	1.8	123.8
10月	155.8	16.1	21.4	11.8	1.5	138.4
11月	68.2	10.1	16.0	5.0	1.5	153.6
12月	39.2	4.9	11.3	-0.5	1.7	182.1
年	1242.8	13.9	19.3	9.3	2.0	1901.6

* 気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード(閲覧日 2016年2月17日)

5 http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=40&prec_ch=%88%EF%8F%E9%8C%A7&block_no=0322&block_ch=%89%BA%8D%C8&year=&month=&day=&elm=normal&view

表2 隔離ほ場周辺における過去3年分の気象データ
(下妻アメダス観測所(茨城県下妻市)における気象データ)

月	降水量(mm)				気温(°C)						風向・風速(m/s)					日照時間(h)
	合計	日最大	最大		平均			最高	最低	平均風速	最大風速		最大瞬間風速			
			1時間	10分間	日平均	日最高	日最低				風速	風速	風向	風速	風向	
2015																
1	57.0	21.0	8.5	2.0	3.9	9.2	-0.9	15.6	-5.7	3.1	12.5	西北西	19.2	西北西	207.2	
2	54.0	15.0	12.5	3.5	4.0	9.0	-0.4	16.5	-5.0	2.5	12.0	西北西	19.8	北西	182.0	
3	84.5	30.0	12.5	3.0	8.6	14.3	2.9	23.1	-2.6	2.7	11.5	西	17.9	北西	202.0	
4	83.0	18.0	5.5	3.0	13.4	18.9	7.9	28.9	1.3	2.5	14.2	南	19.8	南	155.5	
5	90.0	32.0	22.0	6.5	19.8	25.2	14.9	31.1	7.3	2.5	10.9	南	15.4	西北西	241.4	
6	137.5	25.0	10.5	8.5	21.3	25.6	17.6	29.7	12.2	2.4	9.7	西北西	15.9	西北西	133.8	
7	154.0	62.0	19.5	6.5	25.3	29.6	22.1	34.5	18.5	2.2	10.0	南	15.5	南	172.2	
8	102.0	51.5	43.5	14.0	25.5	29.7	22.6	35.7	17.7	2.1	9.0	北東	15.6	北北東	143.1	
9	359.0	128.0	50.5	17.0	21.6	25.7	18.4	31.9	12.7	2.0	7.9	南	13.1	東南東	120.3	
10	38.5	10.5	6.0	2.5	16.8	22.0	12.1	28.2	3.7	2.2	11.9	西	18.4	西	193.4	
11	141.5	39.5	11.0	3.0	12.5	16.5	8.6	21.4	0.6	1.7	9.9	西	15.6	西	114.1	
12	28.0	19.0	6.0	1.5	7.2	12.4	2.1	17.7	-3.2	1.7	9.1	西	13.8	西	185.4	
2014																
1	20.5	14.5	4.0	1.0	2.8	9.1	-3.3	14.4	-7.0	2.1	11.1	西北西	18.1	西	223.7	
2	108.0	82.0	18.5	5.5	3.4	8.7	-1.7	18.3	-8.0	2.4	10.3	西北西	18.1	北	173.1	
3	77.5	25.0	14.0	4.0	7.9	13.5	2.1	23.5	-4.6	3.1	14.6	西北西	20.8	西北西	214.2	
4	125.5	66.0	10.5	2.5	12.8	19.1	6.9	24.6	1.0	2.6	10.5	西北西	17.7	西北西	235.3	
5	96.0	32.5	9.0	6.5	18.6	24.2	13.4	31.2	6.8	2.9	11.2	南南東	18.2	西北西	242.9	
6	248.0	64.5	13.5	5.5	22.0	26.1	18.8	32.6	16.5	2.4	9.6	西南西	16.5	北東	151.6	
7	144.5	30.0	30.0	14.5	24.9	29.5	21.4	34.8	17.5	2.2	8.9	南	17.3	西北西	190.6	
8	132.0	48.0	18.5	9.0	25.6	30.1	22.2	35.4	18.8	2.2	11.0	南	18.0	南	163.5	
9	71.5	24.0	8.5	4.5	21.1	26.1	17.0	30.2	11.2	2.0	7.8	東北東	13.8	東北東	163.5	
10	270.0	132.5	43.0	10.0	16.7	21.8	12.2	29.9	2.9	2.1	12.3	南	20.6	南南東	153.7	
11	56.0	17.0	4.0	2.0	11.3	16.2	6.6	21.8	-0.2	1.9	9.8	西北西	15.8	西北西	138.0	
12	53.0	14.0	5.0	1.5	4.1	9.6	-0.9	14.0	-5.2	2.2	11.3	西北西	18.5	西北西	201.3	
2013																
1	38.0	38.0	6.5	1.5	2.5	8.4	-2.9	13.9	-6.5	2.3	11.4	西北西	16.9	西北西	231.5	
2	25.0	12.0	4.0	1.0	3.6	9.0	-1.6	18.2	-6.4	2.8	13.0	西北西	20.6	西北西	190.1	
3	51.0	20.5	18.0	6.5	9.8	15.9	3.5	25.0	-2.1	3.2	15.3	南南西	22.5	南	187.5	
4	144.0	49.5	26.0	6.0	12.6	18.4	6.6	24.5	1.2	3.2	14.6	南南西	21.3	南南	201.2	
5	51.0	18.5	6.0	4.5	17.8	23.4	13.1	28.7	4.8	3.0	9.6	南	15.5	北北西	243.7	
6	92.5	35.0	10.0	4.0	21.3	25.6	18.1	28.9	12.8	2.3	7.9	南	11.0	南東	123.5	
7	99.0	43.0	37.0	18.0	25.0	29.9	21.6	34.6	18.5	2.3	7.8	南	11.9	南	167.9	
8	44.5	14.0	12.5	5.5	26.8	32.1	22.8	37.3	18.6	2.1	7.2	東北東	12.3	北東	221.0	
9	278.0	116.0	67.0	32.0	22.9	28.0	18.5	35.3	9.7	2.3	15.3	南	23.5	南	168.2	
10	320.5	117.0	25.5	6.5	17.9	22.4	14.0	31.1	5.7	2.4	12.3	北	23.5	北北東	122.7	
11	17.0	9.0	3.5	1.5	9.9	16.3	3.9	21.0	-1.1	1.6	11.0	南	18.4	南	177.3	
12	42.5	18.0	4.0	1.0	4.9	10.9	-0.5	16.5	-5.8	2.2	11.0	西北西	16.7	西北西	202.8	

*表中の)は統計を行う対象資料が許容範囲でかけているものの、上位の統計を用いる際は一部の例外を除いて正常値(資料が欠けていない)と同等に扱うもの(準正常値)とする。必要な資料数は、要素または現象または統計方法により若干異なるが、全体数の80%を基準としている。

気象庁ホームページ気象統計情報ページよりダウンロード(閲覧日2016年2月17日)

2015年:

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&prec_ch=%88%EF%8F%E9%8C%A7&block_no=0322&block_ch=%89%BA%8D%C8&year=2015&month=&day=&elm=monthly&view

2014年:

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&prec_ch=%88%EF%8F%E9%8C%A7&block_no=0322&block_ch=%89%BA%8D%C8&year=2014&month=&day=&view=p1

2013年:

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/monthly_a1.php?prec_no=40&prec_ch=%88%EF%8F%E9%8C%A7&block_no=0322&block_ch=%89%BA%8D%C8&year=2013&month=&day=&view=p1

表3 隔離ほ場における過去3年間の栽培履歴

ほ場	作物	栽培期間(2013)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え コムギ												
	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
No.2	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え コムギ												
No.3	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え コムギ												
No.4	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え コムギ												

ほ場	作物	栽培期間(2014)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
No.2	非遺伝子組換え コムギ												
	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
No.3	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え コムギ												
No.4	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え コムギ												

ほ場	作物	栽培期間(2015)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え エンバク												
No.2	遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ダイズ												
	非遺伝子組換え ナタネ												
No.3	非遺伝子組換え コムギ												
	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え エンバク												
No.4	非遺伝子組換え コムギ												
	非遺伝子組換え ソルガム												
	非遺伝子組換え エンバク												

(注：本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。)

第2 隔離ほ場における生物多様性影響評価試験計画

【社外秘情報につき非開示】