

除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ
(改変 *cp4 epsps, pat*, 改変 *dmo, Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. altissima*)
(KWS20-1, OECD UI: KB-KWS201-6)申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書	1
生物多様性影響評価書の概要	3
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	3
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	3
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	3
① 和名、英名及び学名	3
② 宿主の品種名又は系統名	3
③ 国内及び国外の自然環境における自生地帯	3
(2) 使用等の歴史及び現状	4
① 国内及び国外における第一種使用等の歴史	4
② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途	5
(3) 生理学的及び生態学的特性	7
イ 基本的特性	7
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	7
ハ 捕食性又は寄生性	7
ニ 繁殖又は増殖の様式	8
① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命	8
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	8
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	8
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	12
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	12
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	18
③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	20
(2) ベクターに関する情報	22
イ 名称及び由来	22
ロ 特性	22
① ベクターの塩基数及び塩基配列	22
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	22
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	22
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法	22
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	22
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	23
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	23
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	23
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	23
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	24
(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	26
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	26
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	28
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	30
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	30
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物植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度	34
(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	34
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違	34
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	34
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	34
a 形態及び生育の特性	35
b 生育初期における低温耐性	36
c 成体の越冬性	36
d 花粉の稔性及びサイズ	36
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率	37
f 交雑率	39
g 有害物質の産生性	39
3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	40
(1) 使用等の内容	40
(2) 使用等の方法	40
(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	40
(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	40
(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	40
(6) 国外における使用等に関する情報	40
第二 項目ごとの生物多様性影響の評価	42
1 競合における優位性	42
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	42
(2) 影響の具体的内容の評価	44
(3) 影響の生じやすさの評価	44
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44
2 有害物質の産生性	44
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	44
(2) 影響の具体的内容の評価	46
(3) 影響の生じやすさの評価	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	46
3 交雑性	46

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	46
(2) 影響の具体的内容の評価.....	46
(3) 影響の生じやすさの評価.....	46
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	46
4 その他の性質.....	47
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	48
参考文献.....	51
緊急措置計画書.....	57
別添資料リスト.....	59

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

2024年10月24日

5 農林水産大臣 小里 泰弘 殿
環境大臣 浅尾 慶一郎 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 大島 美紀
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。

遺伝子組換え生物等の種類の名称	除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ (改変 <i>cp4 epsps, pat</i> , 改変 <i>dmo</i> , <i>Beta vulgaris</i> L. ssp. <i>vulgaris</i> var. <i>altissima</i>) (KWS20-1, OECD UI: KB-KWS201-6)
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、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 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

10

和名：テンサイ

英名：Sugar beet

学名：*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主は、KWS SAAT SE & Co. KGaA (ドイツ) が作成した育成系統 04E05B1DH05 である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

テンサイ (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) はヒユ科¹フダンソウ属に属する。フダンソウ属は *Beta* 節、*Corollinae* 節、*Procumbentes* 節及び *Nanae* 節の 4 つの節から成り、テンサイは *Beta* 節に属する *vulgaris* 種に含まれる。フダンソウ属 *vulgaris* 種は複数の栽培種を含む *vulgaris* 亜種から構成されており、*vulgaris* 亜種にはテンサイの他にも、フダンソウ (*B. vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *cicla*)、スイスチャード (*B. vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *flavescens*)、食用根菜ビート (*B. vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *vulgaris*)、飼料用ビート (*B. vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *rapacea*) 等の変種が存在する (OECD, 2001)。

30

¹ OECD (2001) にはアカザ科 (*Chenopodiaceae*) と記載されているが、APG (Angiosperm Phylogeny Group) 分類体系ではアカザ科はヒユ科 (*Amaranthaceae*) に統合されている (The Angiosperm Phylogeny Group, 2003)。

上述したテンサイを含む全ての栽培ビート類²の祖先種は、ヨーロッパから西アジアの海岸によく見られるハマフダンソウ (*B. vulgaris* L. ssp. *maritima*) と考えられている。一般的に、古代のハマフダンソウは先史時代に葉を食用とする野菜として栽培され始め、1世紀頃には栽培品種ができ、その後、根が肥大した種が実用化されたと考えられている。また、ハマフダンソウは起源中心地である近東から地中海沿岸、カナリア諸島、アゾレス諸島に広がり、その後大西洋沿岸からアイルランドとスコットランドの南部に拡大したと考えられている。ハマフダンソウは海岸性の植物であり、高潮線から10~20m内陸の海岸にのみ自生している。自然環境に定着したテンサイもハマフダンソウと同様に海岸から離れた地域では生育していない (OECD, 2001)。

我が国の自然環境下において、テンサイ及びフダンソウ属植物が自生しているという報告はない。

(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

ビートは古代ギリシャやローマで定着したサラダ野菜であり、ビートの葉は紀元前6世紀から紀元前4世紀には栽培化されサラダ野菜として用いられていた。最初の記述は紀元前350年頃のものである。16世紀から17世紀にかけて、赤や黄色のビートがサラダ野菜としてさらに一般的になった。根が肥大した種については、ヨーロッパにおいて中世に栽培されていた。この種はオランダに持ち込まれ、1500年以降に栽培が始まり、その後、ドイツ全土に広まった。飼料用ビートが実際に栽培化されたのは15世紀であり、その栽培が増加し始めたのは18世紀に入ってからであった (OECD, 2001)。

1747年にはビートにショ糖が含まれていることが発見され、ビートから砂糖を精製する試みが始まった。その後、育種により糖度の高いホワイトシレジア品種が育成され、これが現在の全てのテンサイ栽培種の礎となった。テンサイは18世紀末に初めて栽培化された (OECD, 2001)。

我が国では砂糖製造用原料作物として1870年頃に北海道でテンサイの栽培が始まった。その後、1950年代に東北から九州にかけての地域へテンサイの導入が試みられたこともあるが、暖地では病害の発生が多く、収量が少ない等採算性が取れずに栽培が断念された (田辺, 1981)。現在の栽培は北海道 (主に十勝及

² フダンソウ、スイスチャード、食用根菜ビート、飼料用ビート、テンサイ等が含まれる。

びオホーツク地方)に限られている(北海道農政事務所, 2024; 農林水産省, 2024)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

5 主たる栽培地域

現在、テンサイは世界中の温帯から亜寒帯の地域で栽培される主要な砂糖製造原料作物である。2022年における全世界での生産量は約2.6億トンで、ロシア(約4,900万トン)について、フランス(約3,100万トン)、米国(約3,000万トン)、ドイツ(約2,800万トン)及びトルコ(約1,900万トン)が主要生産国になっている(FAOSTAT, 2024)。

我が国においてテンサイは北海道(主に十勝及びオホーツク地方)でのみ栽培されており、2023年の作付面積は約5.1万ha、生産量は約340万トンであった(北海道農政事務所, 2024; 農林水産省, 2024)。

15

栽培方法

テンサイは諸外国では直播栽培であるが、我が国における栽培ではペーパーポット育苗による機械移植栽培が主体であり、3月に播種、4~5月に移植、10~11月に収穫する(田中, 2004)。テンサイは二年生作物であり、一年目は栄養成長期間で根が肥大して砂糖の原料となるショ糖を蓄積し、二年目に冬期間の低温で花芽分化し、夏の長日条件下で抽苔³・開花、結実する(田中, 2004)。したがって、砂糖原料である根の収穫を目的とした我が国での商業栽培において、テンサイは一年目に収穫されるため、種子生産目的以外では二年目の生殖成長を行うことはなく、開花及び結実する可能性は低い。また、栄養成長期の途中で低温にさらされることにより、生殖成長に転換して抽苔することがあるものの、抽苔したテンサイは収量及び糖度が低下するため(田辺, 1981)、近年の育種により一年目に抽苔しにくい品種が育成されている(OECD, 2001)。日本におけるテンサイの生活環を図1(p6)に示した。

30

³ 温度や日長などの影響によって栄養成長から生殖成長へ移り花茎が伸びること。

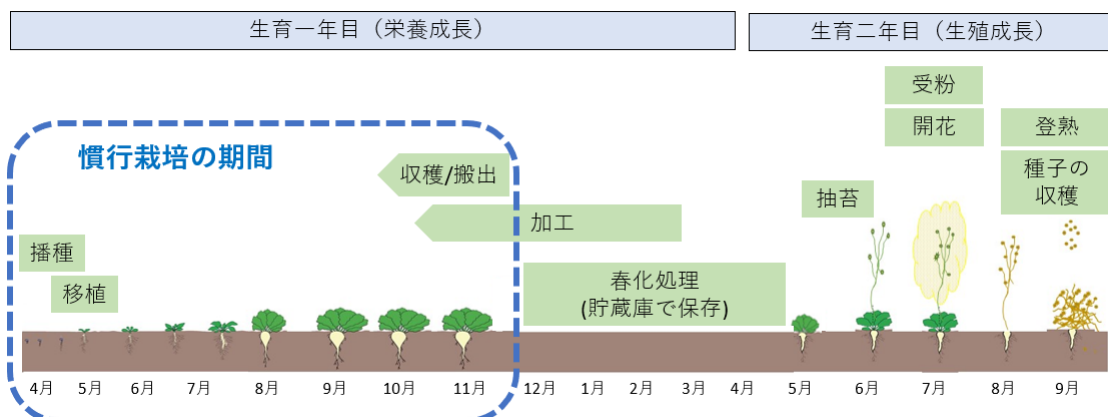


図1 日本におけるテンサイの生活環⁴

流通実態及び用途

5

テンサイは地上部(茎葉部)と地下部(根)に大別され、その全てを利用することができる。テンサイは生鮮食品としてはほとんど使用されず、砂糖、ビートパルプ及び糖蜜に加工される。テンサイを糖に加工する際に副産物として生産されるビートパルプは、食物繊維が豊富に含まれているため、家畜等の飼料として使用される(Cattanach et al., 1991)。もう1つの重要な副産物は糖蜜であり、これは結晶化できない約50%のショ糖を含む粘性のある液体である(OECD, 2002)。糖蜜は、酵母、クエン酸、医薬品、アルコール、混合飼料等の製造に使用される(Cattanach et al., 1991; OECD, 2002)。ビートトップと呼ばれる茎葉部は、通常栽培国での収穫の際に土壤に鋤き込まれるが、まれにサイレージとして又は直接飼料として利用されることもある(OECD, 2002)。なお、テンサイの茎葉部が我が国に輸入されることはない。

10

15

20

我が国では2023年に、テンサイ糖として約25トン、ビートパルプ⁵として約22万トンを輸入しており、主に米国(18万トン)及びエジプト(1.9万トン)から輸入されている(財務省, 2024)。また、2023年に我が国に輸入されたテンサイの種子は約77トンであり、主にフランス(約63トン)、イタリア(約5.1トン)、米国(約4.6トン)から輸入されている(財務省, 2024)。

⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

⁵ 財務省貿易統計においては、バガスその他の砂糖製造の際に生ずるかすを含む。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

5

テンサイが属するフダンソウ属の植物は、種子繁殖する二年生植物で、基本染色体数は $x=9$ であり、二倍体、三倍体、四倍体が存在する (OECD, 2001)。宿主である育成系統 04E05B1DH05 は、二倍体の倍加半数体⁶系統である。

10 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

テンサイの栽培地域は、温帯から亜寒帯に広く分布している。テンサイは一年目にショ糖を蓄積した根を、二年目に花序を発達させる二年生植物である。春に播種され、根は一年目の秋又は初冬に収穫される。テンサイは播種後
15 70~90 日かけて、葉が畑の土壌表面を完全に覆うまで成長する。播種後 90 日間における最適気温は 16~27°C である。日長が長い地域はテンサイの成長に最も適している。播種後 90 日から収穫までにおける最適気温は、日中 18~27°C、夜間 4~10°C である (Cattanach et al., 1991)。テンサイは寒さに敏感であり、-5°C 以下での降霜で枯死する (CFIA, 2023)。

20 テンサイはさまざまな種類の土壌によく適応する。乾燥地におけるテンサイの生産は、一般に降雨量が 20 インチ (約 50 cm) 以上ある地域の保水力の高い土壌に限定され、降雨量が非常に少ない地域では灌漑施設を用いて生産される (Cattanach et al., 1991)。

25 テンサイの種子には発芽や初期成長に必要な外胚乳がほとんど含まれていないため、生育初期において、雑草との競合や病気、草食動物から受けるダメージに対して非常に脆弱である (OECD, 2001)。実際に、テンサイは我が国に 1870 年頃に導入され、これまでに西南暖地、東北地方、北海道等において栽培されてきたが、我が国においてテンサイが自生しているという報告はない。

30 ハ 捕食性又は寄生性

—

⁶ 花粉等の配偶子 (半数体) の染色体を倍加することで得られた個体。

ニ 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 テンサイの種子は、野生種であるハマフダンソウよりも脱粒しにくい、成熟すると脱粒することがある。地面に落下したテンサイの種子は、その種子中に含まれるシュウ酸ナトリウムや硝酸カリウム等の発芽阻害物質の存在 (井上ら, 1974) や、種子と土壌の接触が悪いことから、通常は同じシーズンに発芽することはない (OECD, 2001)。テンサイの種子の寿命は長く、土壌中に 10 年以上
10 生存することが可能である。一般的に、収穫後六年目の多胚性種子及び収穫後四年目の単胚性種子ではどちらも 70%の発芽率があるとされている。また、実験室の条件では、八年目の種子で 59%の発芽率が確認されている (OECD, 2001)。

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

20 テンサイは通常、種子により繁殖する。種子は直径約 1~2 mm の円形である。その一方で、収穫後のほ場に残された根や冠部から植物体を再生することもある (OECD, 2001)。

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

25 テンサイは主に風媒によって受粉し、強い自家不和合性を有する他殖性植物とされているが (OECD, 2001)、自家和合性系統の存在も知られている (Kuranouchi et al., 2000)。

30 テンサイとフダンソウ、スイスチャード、食用根菜ビート、飼料用ビート等の *vulgaris* 種に属する変種の栽培作物との交雑において生殖隔離機構は存在せず、容易に交雑可能である。

35 また、テンサイが属するフダンソウ属は *Beta* 節、*Corollinae* 節、*Procumbentes* 節及び *Nanae* 節の 4 つの節に分かれており、テンサイはいずれも野生種であるハマフダンソウ、*B. vulgaris* ssp. *adanensis*、*B. macrocarpa* 及び *B. patula* と共に *Beta* 節に属している。*Beta* 節に属するこれら全ての種は交雑可能であり、形成された雑種は稔性がある上、染色体レベルでの不和合性は見受けられない。しかし、テンサイと *B. macrocarpa* の間の雑種は、開花時期が異なるためにまれである。

また、*B. macrocarpa* と *B. vulgaris* の雑種では、いくらか花粉不稔や胚の死滅が見られる (OECD, 2001)。

フダンソウ属 *Corollinae* 節には、テンサイと人工雑種を作成可能な種がある。しかし、これらの雑種は不稔性が高く、テンサイとの戻し交配ではほとんど種子を生じない。また、テンサイと *Procumbentes* 節に属する種との人工雑種は、通常幼苗期に死滅するが、テンサイに接ぎ木をすることで生存、さらに良好な生育が可能となる。これらの雑種はほぼ不稔であり、戻し交配ではほとんど種子を生じない。なお、テンサイと *Nanae* 節の間の雑種は報告されていない (OECD, 2001)。

10 結論として、テンサイはフダンソウ属 *Beta* 節に属する野生種とのみ雑種後代を得ることが可能である。しかし、我が国にはフダンソウ属植物は自生していないため、我が国においてテンサイが近縁野生種と自然交雑することはない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

15

花粉粒は球形で表面に多数の凹凸がある。1 葯当たりの花粉数は約 17,000 粒である。これは、1 花当たり約 85,000 粒、1 個体当たり約 10 億粒の花粉産生に相当する。花粉の寿命は環境条件、特に湿度によるが最大 24 時間である (OECD, 2001)。二倍体に生じる花粉のサイズは直径約 21 μm である (Hecker, 20 1988)。

テンサイは主に風媒によって受粉し、虫媒による受粉も行われる場合があるが、その頻度は風媒に比べると低い (OECD, 2001)。

25 風で運ばれる花粉は、水平方向に少なくとも 4,500 m 飛散する可能性があり、高度 5,000 m においても観察されている (OECD, 2001)。また、風で運ばれる花粉の移動距離が、最大 8,000 m に達する可能性があるとする報告もある (OECD, 2001)。

30 OECD 種子スキームにおいて、テンサイの種子生産地として承認されるのは *Beta* 属が自生していないことが確認された場所のみである。また、同制度において、交配育種や商業種子生産を行う際の隔離距離は、通常の子孫生産では他の *Beta* 属からは 1,000 m を、認証種子の生産では意図する花粉親の染色体数と近隣の花粉源であるテンサイの染色体数によって 300 m から 1,000 m を設定するよう定められている (OECD, 2021)。

35

ホ 病原性

—

5

へ 有害物質の産生性

他感作用物質等のような野生動植物等の生息又は生育に影響を及ぼす有害物質の産生性は知られていない。

10

ト その他の情報

—

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

5 バイエルグループ及びKWS SAAT SE & Co. KGaA (ドイツ) は、両社の共同開発により、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバに対する耐性が付与された除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ (改変*cp4 epsps*, *pat*, 改変*dmo*, *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) (KWS20-1, OECD UI: KB-KWS201-6) (以下「本組換えテンサイ」とする。) を作出した。

10 本組換えテンサイには、*Agrobacterium* sp. CP4株由来の*cp4 epsps*遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes*由来の*pat*遺伝子及び*Stenotrophomonas maltophilia* DI-6株由来の*dmo*遺伝子が導入されている。*cp4 epsps*遺伝子から発現する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) (以下 *cp4 epsps*遺伝子から発現するEPSPS蛋白質を「CP4 EPSPS蛋白質」とする。) により除草剤グリ
15 ホサートに対する耐性が、また、*pat*遺伝子から発現するホスフィノスリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (phosphinothricin N-acetyltransferase。以下「PAT蛋白質」とする。) により除草剤グルホシネートに対する耐性が、さらに、*dmo* 遺伝子から発現するジカンバモノオキシゲナーゼ (*dicamba mono-oxygenase*。以下「DMO蛋白質」とする。) により除草剤ジカンバに対する耐性が本組換えテ
20 ンサイに付与されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

25

本組換えテンサイの作出に用いた供与核酸の構成及び構成要素の由来を図 2 (p13) 及び表 1 (p14~17) に示した。

30 本組換えテンサイに導入された *cp4 epsps* 遺伝子から発現する CP4 EPSPS 蛋白質は、同遺伝子のクローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の野生型 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに改変されている。よって、本組換えテンサイに導入された *cp4 epsps* 遺伝子を「改変 *cp4 epsps* 遺伝子」、本組換えテンサイで発現する CP4 EPSPS 蛋白質を「改変 CP4 EPSPS 蛋白質」とする。
35

本組換えテンサイに導入された *pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質のアミノ酸配列は、プロセッシングにより N 末端のメチオニンが取り除かれている以外、*Str. viridochromogenes* 由来の野生型 PAT 蛋白質と同一のものである。N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くの蛋白質で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。

本組換えテンサイに導入された *dmo* 遺伝子から発現する DMO 蛋白質のアミノ酸配列は、同遺伝子のクローニングの過程で制限酵素切断部位を挿入したことにより、*Ste. maltophilia* 由来の野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端のメチオニンの直後にロイシンが挿入されている。また、前駆蛋白質がプロセッシングを受けることにより、Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit (*RbcS*) に由来する 27 アミノ酸が切り離されずに N 末端に残存している。よって、本組換えテンサイに導入された *dmo* 遺伝子を「改変 *dmo* 遺伝子」、本組換えテンサイ中で発現する DMO 蛋白質を「改変 KWS20-1 DMO 蛋白質⁷」とする。

本組換えテンサイにおいて発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質の推定アミノ酸配列を別添資料 1 に示した。

20 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

25 本組換えテンサイの作出に用いた供与核酸の構成要素の機能を表 1 (p14~17) に示した。

⁷ 別添資料において改変 KWS20-1 DMO 蛋白質は DMO+27.1 protein と記載されている。

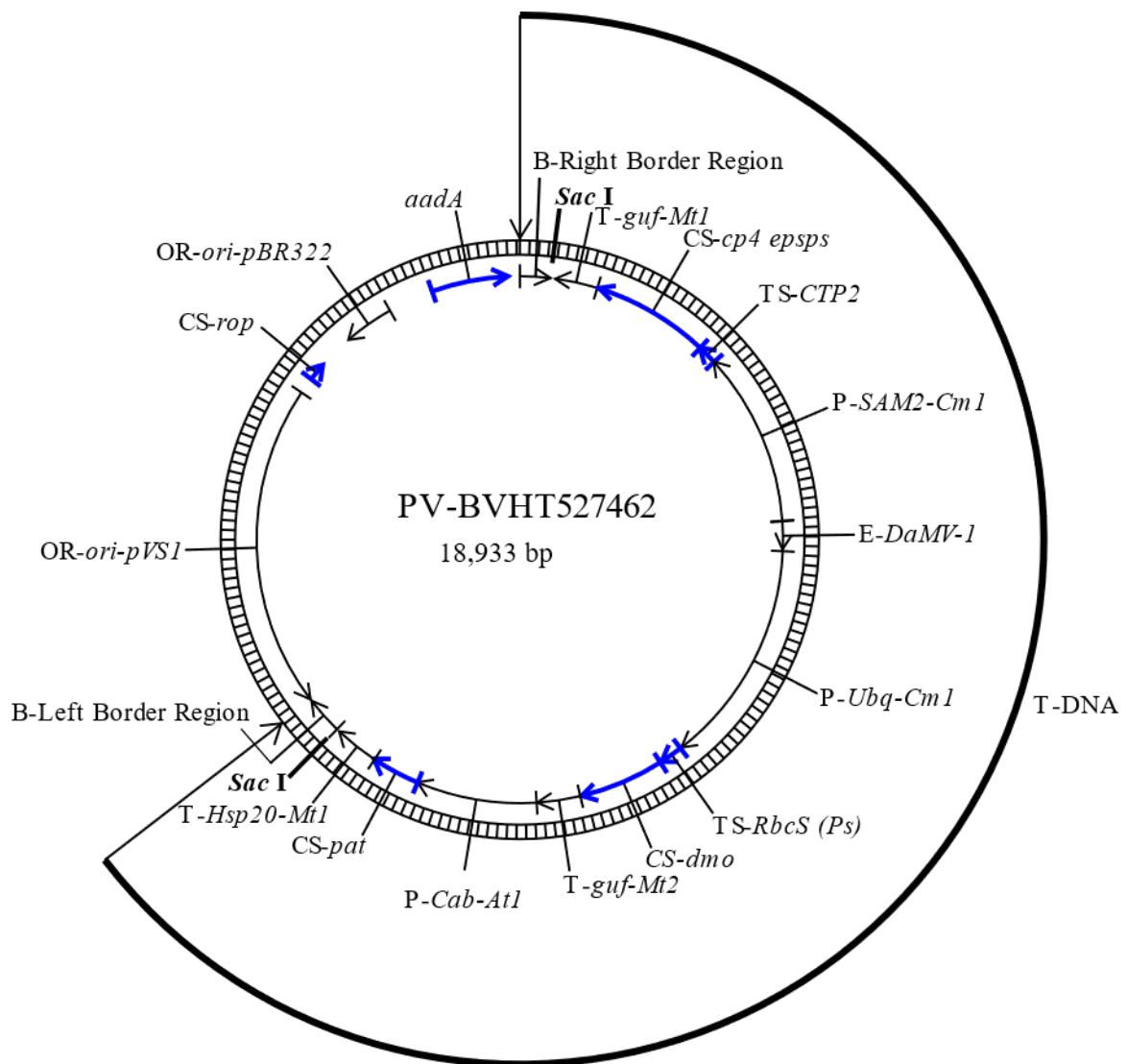


図2 本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 のプラスミドマップ⁸

5

⁸ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能⁹

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T ² - <i>guf-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3' 末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931406)、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS ³ -改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS 蛋白質) をコードしている <i>aroA</i> (<i>epsps</i>) 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
TS ⁴ - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の 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) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列 (Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P ⁵ - <i>SAM2-Cml</i>	メロン (<i>Cucumis melo</i>) の S-アデノシル-L-メチオニン合成酵素をコードする <i>SAM2</i> 遺伝子のイントロン、5' 末端非翻訳領域及びプロモーター配列 (GenBank Accession: OK149194) で、恒常的に転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表1 本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
E ⁶ -DaMV-1*	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P-Ubq-Cml	メロン (<i>C. melo</i>) 由来の推定ユビキチン蛋白質の遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン配列 (GenBank Accession: OK149193) で、恒常的に転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS-RbcS (Ps)**	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列とコード領域の最初の 27 アミノ酸。目的蛋白質を葉緑体へと輸送する (Fluhr et al., 1986)。
CS-改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T- <i>guf</i> -Mt2	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: OK149195) で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

* 本配列はダリアモザイクウイルス (DaMV) の推定 ORF の一部を含むが、本組換えテンサイにおける改変 KWS20-1 DMO 蛋白質及び改変 CP4 EPSPS 蛋白質が安定して発現していることから、本配列は意図したとおり改変 KWS20-1 DMO 蛋白質を発現させるためのエンハンサーとして機能し、DaMV 由来の蛋白質が生成される可能性はないと考えられる。

** 改変 *dmo* 遺伝子発現カセットからは、ターゲティング配列である *RbcS* と改変 *dmo* 遺伝子が融合した前駆蛋白質が発現する。その後、前駆蛋白質はプロセッシングにより *RbcS* に由来するペプチドの大部分が切り離され、残りのペプチド (27 アミノ酸) が N 末端に残存した改変 KWS20-1 DMO 蛋白質が生じる。

表1 本組換えテンサイの作出に用いたPV-BVHT527462の各構成要素の由来及び機能(つづき)

構成要素	由来及び機能
P-Cab-At1	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のクロロフィル a/b 結合蛋白質 (CAB) のプロモーター及びリーダー配列 (GenBank Accession: OK149192) で、主に緑色組織での転写を誘導する (Ha and An, 1988)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS-pat	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T-Hsp20-Mt1	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の熱ショック蛋白質をコードする推定 Hsp20 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: OK149196) で、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (本組換えテンサイには存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR ⁷ -ori-pVS1	プラスミド pVS1 に由来する複製開始領域 (Itoh et al., 1984)。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS-rop	ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

表 1 本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来及び機能
OR-ori-pBR322	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)- <i>O</i> -ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

¹ B-Border (境界配列)

² T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

5 ³ CS-Coding Sequence (コード配列)

⁴ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)

⁵ P-Promoter (プロモーター)

⁶ E-Enhancer (エンハンサー)

⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

- 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

5

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

本組換えテンサイには、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されており、改変 CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変 CP4 EPSPS 蛋白質は除草剤グリホサートへの耐性を付与する。除草剤グリホサートは植物内在性の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸合成経路中の酵素の 1 つである 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) を阻害し、細胞死を引き起こす (Franz et al., 1997)。一方で、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸合成経路が正常に機能して生育することができる。

なお、これまでに改変 *cp4 epsps* 遺伝子が発現する除草剤グリホサート耐性テンサイ (H7-1、OECD UI: KM-000H71-4) (以下「H7-1 系統」とする。) がカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けており (承認日: 2007 年 4 月 24 日)、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。本組換えテンサイで発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列は、H7-1 系統で発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質のアミノ酸配列と同一である。

25 【PAT 蛋白質】

本組換えテンサイには、*Str. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されており、PAT 蛋白質を発現する。PAT 蛋白質は除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988)。

除草剤グルホシネートは、グルタミン合成酵素と結合することにより除草活性を発揮する。グルタミン合成酵素は光呼吸により生成されたアンモニアを植物に同化させる主要酵素である。グルホシネートがグルタミン合成酵素と結合することにより、グルタミン合成酵素が阻害されて、植物体内にアンモニアが蓄積し、枯死する (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986)。

本組換えテンサイから産生される PAT 蛋白質はグルホシネートをアセチル化するアセチルトランスフェラーゼである。グルホシネートは、この酵素の働き

でアセチル化されると、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートとなる。*N*-アセチルグルホシネートはグルタミン合成酵素と結合できないため、光呼吸を阻害せず、アンモニア蓄積が回避される。本組換えテンサイは、PAT 蛋白質の産生により、除草剤グルホシネートが散布されても枯死しない。

- 5 なお、同じ作用機序を示す PAT 蛋白質を発現し、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている遺伝子組換え農作物は、トウモロコシ、ダイズ、ワタ、セイヨウナタネ等を宿主とするものが複数あり、いずれの系統も、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。

10

【改変 KWS20-1 DMO 蛋白質】

- 15 本組換えテンサイには、*Ste. maltophilia* DI-6株由来の改変 *dmo* 遺伝子が導入されており、改変 KWS20-1 DMO 蛋白質を発現する。改変 KWS20-1 DMO 蛋白質は、本組換えテンサイに除草剤ジカンバ耐性を付与する。

除草剤ジカンバは合成オーキシンの系の除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。

- 20 本組換えテンサイで産生される改変 KWS20-1 DMO 蛋白質は、ジカンバを脱メチル化する酵素である。ジカンバはこの酵素の働きで脱メチル化されると、除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA) とホルムアルデヒドとなる (Chakraborty et al., 2005)。

- 25 なお、*dmo* 遺伝子が発現する遺伝子組換え農作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統 (スタック系統は除く) は、2024 年 10 月 24 日 (調査時点) までに 6 系統 (トウモロコシ 2 系統、ダイズ 2 系統、ワタ及びセイヨウナタネ) あり、いずれの系統も、承認された第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国における生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断されている。また、改変 KWS20-1 DMO 蛋白質のアミノ酸配列については、2013 年 10 月 31 日にカルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けた除草剤ジカンバ耐性ダイズ (MON87708, OECD UI: MON-87708-9) で発現する改変
30 MON87708 DMO+27 蛋白質のアミノ酸配列と、N 末端から 2 番目及び 112 番目のアミノ酸以外は同一である。

<既知のアレルゲンとの相同性検索>

- 35 改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質が既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、

AD_2022¹⁰に登録されている既知のアレルゲンについて、FASTA 型アルゴリズム及び連続する 8 アミノ酸残基の相同性検索を行った。その結果、既知のアレルゲンと類似の配列は認められなかった。

5 ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質】

10 改変 CP4 EPSPS 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ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。また、EPSPS 蛋白質は基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩(以下「S3P」という。)と特異的に反応することが知られており (Gruys et al.,
15 1992)、これら以外に唯一 EPSPS 蛋白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸である。しかし、EPSPS 蛋白質のシキミ酸及び S3P との反応について、反応の起こりやす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、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)、シ
20 キミ酸が EPSPS 蛋白質の基質として反応する可能性は極めて低い。よって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

【PAT 蛋白質】

25 PAT 蛋白質は、アセチル CoA 存在下において、グルホシネートに高い特異性を示す。グルホシネートは L-アミノ酸に分類されるが、PAT 蛋白質が他の L-アミノ酸をアセチル化することはない。また、高濃度の各種アミノ酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのアセチル化が阻害されないことが競合アッセイにおいて示されている。さらに、グルホシネートの類似体である L-グルタミン酸の存在下においても、PAT 蛋白質によるグルホシネートのア
30 セチル化が阻害されないことが報告されている (Wehrmann et al., 1996)。

以上のことから、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ており、PAT 蛋白質がグルホシネート以外の化合物を代謝して宿主の代謝系

¹⁰AD_2022: COMPARE (COMprehensive Protein Allergen REsource) から2022年2月2日にダウンロードしたアレルゲン配列のデータベースで、2,463配列を含む。

に影響を及ぼすことはないと考えられる。

【改変 KWS20-1 DMO 蛋白質】

5 DMO 蛋白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。DMO 蛋白質の触媒部位に関する研究 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009) から、構造的にジカンバに類似した化合物 (カルボキシル基 (-COOH)、メトキシ基 (-OCH₃) 及びクロロ基 (-Cl) を含むフェニル環をもつ化合物) は、DMO 蛋白質の
10 フェニル環をもつ化合物は報告されていない。また、クロロ基を含むフェニル環をもつ化合物は、植物及び他の真核生物において、その存在は限定的であることが知られている (Gribble, 2010)。さらに、クロロ基はないが、カルボキシル基及びメトキシ基を含むフェニル環をもつ化合物のうち、植物に存在している化合物の中で最も構造的にジカンバに類似している *o*-アニス酸 (2-メトキシ安息香酸) についても、DMO 蛋白質によって代謝されないことが確認されている
15 (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。

また、前述のとおり、本組換えテンサイ中で発現している改変 KWS20-1 DMO 蛋白質は、野生型 DMO 蛋白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端側から 2 番目にロイシンが挿入されるとともに、*RbcS* 由来の 27 アミノ酸が N
20 末端に残存している。しかしながら、N 末端側から 2 番目のアミノ酸の位置及び *RbcS* 由来の 27 アミノ酸は、野生型 DMO 蛋白質の触媒部位から立体構造的に離れているため、これらのアミノ酸配列の違いは DMO 蛋白質の基質特異性に影響しないと考えられた。

以上のことから、改変 KWS20-1 DMO 蛋白質は、ジカンバに対して高い基質
25 特異性を有しており、内在性化合物を代謝して宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

【改変 CP4 EPSPS 蛋白質+PAT 蛋白質+改変 KWS20-1 DMO 蛋白質】

30 改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質はいずれも基質特異性が高く、各蛋白質の基質は異なり、関与する代謝経路も互いに独立している。よって、本組換えテンサイで発現しているこれら蛋白質が植物体において相互に影響するとは考えにくい。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5

本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来の pVS1 (Itoh et al., 1984) 及び *Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 (Sutcliffe, 1979) 等をもとに構築した。詳細を表 1 (p14~17) に記載した。

10 ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15 本組換えテンサイの作出に用いた PV-BVHT527462 の全塩基数は 18,933 bp である。なお、PV-BVHT527462 の塩基配列を別添資料 2 に記載した。

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 *E. coli* における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

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

25

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

30 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された PV-BVHT527462 の構成要素を表 1 (p14~17) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置を図 2 (p13) に示した。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

5 PV-BVHT527462 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非遺伝子組換えテンサイ（以下「非組換えテンサイ」とする。）の育成系統 04E05B1DH05 のシュート断片に導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

10 ① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

非組換えテンサイの育成系統 04E05B1DH05 のシュート断片と PV-BVHT527462 を含む *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1 株を共存培養した後、DL-ホスフィノスリシンを含有する選択培地に移し、形質転換されていない植物細胞の増殖を阻害して形質転換された細胞の選抜を行った。

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

20

チメンチン (滅菌チカルシン二ナトリウム及びクラブラン酸カリウムの混合物) 及びセフォタキシムを添加した組織培養培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。本組換えテンサイにアグロバクテリウムの菌体が残存しないことは、アグロバクテリウムの VirD2 蛋白質をコードする *virD2* 遺伝子を標的とする KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) 解析¹¹ (Semagn et al., 2014) によって確認した¹²。この結果、供試したサンプル (形質転換当代 (T₀ 世代) 及び T₂ 世代の葉) からは *virD2* 遺伝子配列は検出されなかった (別添資料 3 の Table 6, p11 及び別添資料 4 の Table 7, p13)。また、本組換えテンサイの T₂ 世代の葉から DNA を抽出し、PV-BVHT527462 の外側骨格領域をカバーするように設計した 4 つのプロープによるサザンブロットィングを行った結果、い

30

¹¹ KASP 解析は蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用した二対立遺伝子のジェノタイプング技術である。この解析では、対立遺伝子特異的な 2 種類のフォワードプライマー及び共通の 1 種類のリバースプライマーを使用する。また、各フォワードプライマーに FRET カセットに対応するテールシーケンスをもたせることで、増幅産物が発する蛍光の種類により、どちらのフォワードプライマーに由来する増幅産物であるかを見分けることができる。

¹² T₀ 世代からクローン増殖させた 10 個体及び T-DNA 領域をホモで有する T₂ 世代 30 個体において、各個体の葉から DNA を抽出し、*virD2* 遺伝子の検出に用いた。

ずれのプローブを用いた場合も外側骨格領域由来のバンドは検出されなかった(別添資料 5 の Figure 16~17, p62~63; 別添資料 5 の補足資料)。

このことから、本組換えテンサイには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存しないことを確認した。

5

- 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

- 10 形質転換された 1 個体の再分化個体 (T₀) に袋掛けを行って自殖し、T₁ 世代の種子を作出した。T₁ 世代の種子において、T-DNA 領域を有し、外側骨格領域をもたない 12 個体を KASP 解析及びサザンブロットィングにより選抜した。これら T₁ 世代の 12 個体を隔離ほ場において集団内で放任受粉させ、T₂ 世代の種子を作出した。T₂ 世代において、T-DNA 領域をホモで有し、外側骨格領域をもたない個体を選抜した。
- 15

本組換えテンサイの育成図を図 3 (p25) に示した。なお、本申請の対象は、T₂ 世代及び T₂ 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

【社外秘につき非開示】

10

15

図3 本組換えテンサイの育成図

20

【社外秘につき非開示】

(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

5

本組換えテンサイの導入遺伝子が染色体上に存在するか否かを調べるため、本組換えテンサイの BC₀S₁ 世代 (図 3, p25) において、導入遺伝子の分離比をカイ二乗検定で分析した (別添資料 5 の Table 11~12, p70~71)。

10 T-DNA 領域をホモで有する T₂ 世代を種子親として、非組換えテンサイの育成系統 07R027B108DH06 と温室において人工授粉させ種子を得た後、KASP 解析により T-DNA 領域をヘミで有する BC₀F₁ 世代の個体を同定し、これを自殖させて作出した BC₀S₁ 世代において、KASP 解析により T-DNA 領域の有無及び分離様式を確認した。

15 T-DNA 領域が核ゲノム上の 1 か所に 1 コピーで導入されている場合、BC₀S₁ 世代において T-DNA 領域を有する個体と有さない個体との比率は、メンデルの法則に従い 3 : 1 となることが、また、ホモ陽性 : ヘミ陽性 : 陰性の比率は 1 : 2 : 1 となることが予測された。

20 その結果、T-DNA 領域の有無及び分離様式ともに実測値とメンデルの分離法則に基づく期待値の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかったことから、導入遺伝子は同法則に矛盾せずに遺伝していることを確認した (表 2 及び表 3, p27)。したがって、本組換えテンサイの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

表 2 本組換えテンサイの育成過程における T-DNA 領域の有無¹³

世代	実測値 ¹		メンデルの分離法則に基づく期待値		χ^2	p 値 ²
	T-DNA 陽性	T-DNA 陰性	T-DNA 陽性	T-DNA 陰性		
BC ₀ S ₁	154	46	150	50	0.427	0.514

¹ KASP 解析により、T-DNA 領域の有無を確認した。

² BC₀S₁ 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

5

表 3 本組換えテンサイの育成過程における T-DNA 領域の分離様式¹⁴

世代	実測値 ¹			メンデルの分離法則に基づく期待値			χ^2	p 値 ²
	ホモ 陽性	ヘミ 陽性	陰性	ホモ 陽性	ヘミ 陽性	陰性		
BC ₀ S ₁	50	104	46	50	100	50	0.480	0.787

¹ KASP 解析により、T-DNA 領域の分離様式を確認した。

² BC₀S₁ 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した (有意水準 $\alpha = 0.05$)。

10

¹³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

¹⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

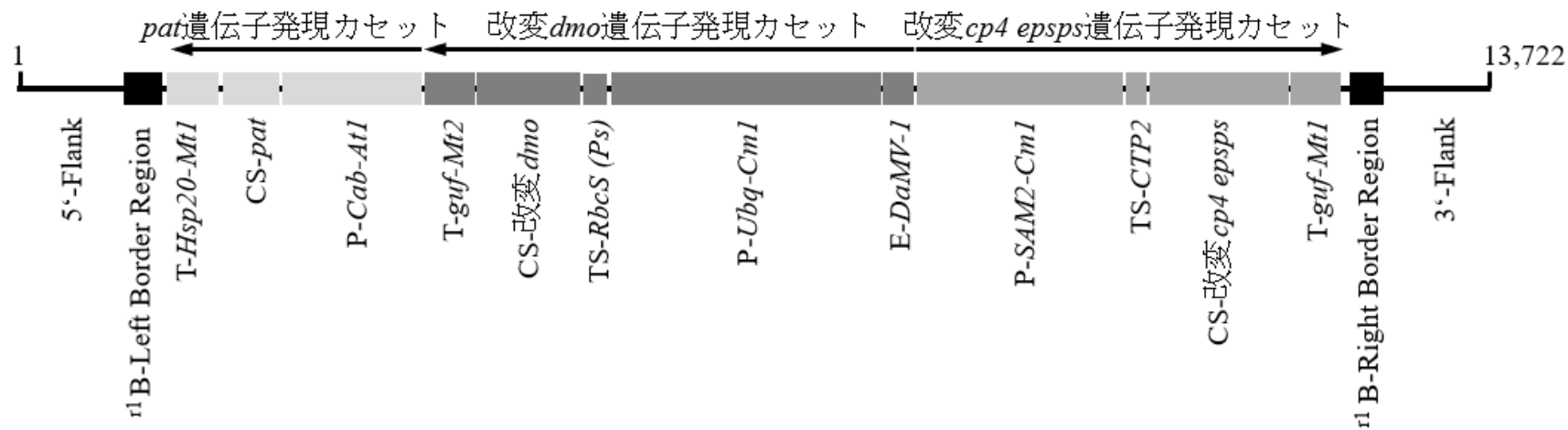
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代における伝達の安定性

5 本組換えテンサイ (T₂ 世代) におけるサザンブロットィングによる導入遺伝子の解析の結果、本組換えテンサイの核ゲノム中 1 か所に 1 コピーの T-DNA 領域が組み込まれており (別添資料 5 の Figure 12~15, p58~61)、外側骨格領域は導入されていないこと (別添資料 5 の Figure 16~17, p62~63) を確認した。

10 また、本組換えテンサイ (F₁ 世代) における導入遺伝子領域及び近傍配列に対し、部位特異的 PCR 及び塩基配列解析を行った結果、本組換えテンサイ中の導入遺伝子及びその近傍配列が決定され、導入遺伝子と PV-BVHT527462 の T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることを確認した (別添資料 5 の Figure 7~10, p29~56, いずれも末尾の confidential attachment に収録)。なお、本組換えテンサイにおける導入遺伝子の模式図を図 4 (p29) に示した。

15

さらに、複数世代 (T₂~T₄ 世代) の本組換えテンサイを対象にしたサザンブロットィングにおいて、導入遺伝子が安定して後代に遺伝していることを確認した (別添資料 5 の Figure 18~19, p64~65)。



5 図4 本組換えテンサイにおける導入遺伝子の模式図¹⁵

本組換えテンサイの導入遺伝子及び近傍配列の模式図である。図は本組換えテンサイ中の構成要素の大まかな位置と配列の方向を示している。なお、本組換えテンサイにおいて目的の導入遺伝子は PV-BVHT527462 と一致した配列で導入されている。図中の「r1」の表記は、本組換えテンサイに導入された B-Left Border Region 及び B-Right Border Region が PV-BVHT527462 と比較して短くなっていることを意味する。

10

¹⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーのため該当しない (別添資料 5 の Figure 12~15, p58~61)。

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

10 本組換えテンサイの複数世代 (T₂、T₃ 及び T₄ 世代) の葉において、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質が安定して発現していることを、ウエスタンブロッティングにより確認した (別添資料 6 の Figure 2~4, p18~20)。

15 また、2020年に米国の5か所(ミシガン州、ミネソタ州、アイダホ州(2か所)及びノースダコタ州)で行ったほ場試験において本組換えテンサイの葉、根及び地上部のサンプル(F₁世代)を複数の生育段階で採取し、改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質の発現量を ELISA 法により分析した (別添資料 7 の Table 1~3, p19~22)。その結果、本組換えテンサイの葉、根
20 及び地上部における改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質の発現を確認した (表 4~表 6, p31~33)。なお、PAT 蛋白質については、根 (OSR3) の全供試サンプル (n=20) において発現量は定量限界以下 (<LOQ) であった。

表 4 本組換えテンサイの組織中における改変 CP4 EPSPS 蛋白質の発現量 (2020 年、米国)¹⁶

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SE) 範囲(μg/g FW) ³	平均値 (SE) 範囲 (μg/g DW) ⁴	LOQ/LOD (μg/g DW) ⁵
葉 (OSL1)	BBCH ⁶ 17-18	60 (3.3) 33 - 87	590 (33) 320 - 850	1.250/0.776
根 (OSR1)	BBCH 17-18	52 (3.4) 32 - 81	430 (28) 270 - 680	1.250/0.460
葉 (OSL2)	BBCH 32-39	56 (3.0) 40 - 87	510 (27) 370 - 790	1.250/0.776
根 (OSR2)	BBCH 32-39	46 (3.1) 24 - 71	270 (19) 140 - 420	1.250/0.460
地上部	BBCH 49	49 (1.9) 37 - 63	310 (12) 230 - 400	1.250/0.776
根 (OSR3)	BBCH 49	24 (1.3) 16 - 35	100 (5.9) 68 - 150	1.250/0.460

¹OSL=over season leaf (葉)、OSR=over season root (根)、地上部: 葉及び露肩部分。

²各組織の採取時における生育段階。

5 ³蛋白質の発現量は組織の新鮮重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値-最大値) は全てのは場で採取された各組織の値を基に計算している (n=20)。SE=標準誤差、FW=新鮮重。

⁴蛋白質の発現量は組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。DW=乾燥重。

10 ⁵LOQ=limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)。

⁶BBCH スケールは植物の成長段階を示す基準 (Meier, 2001)。BBCH 17-18 = 7-8 葉期、BBCH 32-39 = ロゼット葉が地表の 20-90%を覆う生育時期、BBCH 49 = 収穫可能な根部が発達した生育時期。

¹⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表5 本組換えテンサイの組織中における PAT 蛋白質の発現量 (2020 年、米国)¹⁷

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SE) 範囲 ($\mu\text{g/g FW}$) ³	平均値 (SE) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ⁴	LOQ/LOD ($\mu\text{g/g DW}$) ⁵
葉 (OSL1)	BBCH ⁶ 17-18	2.6 (0.13) 1.7 - 3.7	25 (1.2) 16 - 36	0.313/0.113
根 (OSR1)	BBCH 17-18	0.029 (0.0033) 0.016 - 0.049	0.25 (0.028) 0.13 - 0.41	0.125/0.004
葉 (OSL2)	BBCH 32-39	2.2 (0.20) 1.0 - 3.6	20 (1.8) 9.4 - 33	0.313/0.113
根 (OSR2)	BBCH 32-39	<LOQ (NA) ⁷ NA - NA	<LOQ (NA) NA - NA	0.125/0.004
地上部	BBCH 49	0.80 (0.071) 0.41 - 1.3	5.1 (0.45) 2.6 - 8.3	0.313/0.113
根 (OSR3)	BBCH 49	<LOQ (NA) NA - NA	<LOQ (NA) NA - NA	0.125/0.004

¹OSL=over season leaf (葉)、OSR=over season root (根)、地上部: 葉及び露肩部分。

²各組織の採取時における生育段階。

5 ³蛋白質の発現量は組織の新鮮重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値-最大値) は全てのほ場 (5 か所) で採取された各組織の値を基に計算している (n=20)。ただし、OSR1 における発現量については定量可能な範囲内にあったサンプル (n=12) から求めており、定量限界未満となったサンプル (n=8) は発現量の算出に用いていない。OSR2 における発現量について、定量限界未満となったサンプル (n=18) 及び定量可能な範囲内のサンプル (n=2) から新鮮重及び乾燥重 1 g 当たりの発現量の平均値を求めたところ、それぞれ 0.026 $\mu\text{g/g FW}$ 、0.16 $\mu\text{g/g DW}$ となった。定量限界未満と定量可能な範囲内の両方を示すサンプルを含む組織については、50%以上のサンプルが定量限界未満である場合、表では<LOQ と表示される。SE=標準誤差、FW=新鮮重。

15 ⁴蛋白質の発現量は組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。DW=乾燥重。

⁵LOQ=limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)。

20 ⁶BBCH スケールは植物の成長段階を示す基準 (Meier, 2001)。BBCH 17-18 = 7-8 葉期、BBCH 32-39 = ロゼット葉が地表の 20-90%を覆う生育時期、BBCH 49 = 収穫可能な根部分が発達した生育時期。

⁷NA=not applicable。

¹⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

表 6 本組換えテンサイの組織中における改変 KWS20-1 DMO 蛋白質の発現量 (2020 年、米国)¹⁸

組織 ¹	生育段階 ²	平均値 (SE) 範囲 ($\mu\text{g/g FW}$) ³	平均値 (SE) 範囲 ($\mu\text{g/g DW}$) ⁴	LOQ/LOD ($\mu\text{g/g DW}$) ⁵
葉 (OSL1)	BBCH ⁶ 17-18	14 (0.66) 9.6 - 20	140 (6.5) 95 - 200	0.100/0.028
根 (OSR1)	BBCH 17-18	3.4 (0.096) 2.7 - 4.0	28 (0.80) 22 - 34	0.100/0.012
葉 (OSL2)	BBCH 32-39	13 (0.52) 9.1 - 18	120 (4.7) 83 - 160	0.100/0.028
根 (OSR2)	BBCH 32-39	3.7 (0.23) 1.9 - 5.7	22 (1.4) 11 - 34	0.100/0.012
地上部	BBCH 49	9.3 (0.56) 4.1 - 14	59 (3.5) 26 - 88	0.100/0.028
根 (OSR3)	BBCH 49	2.7 (0.12) 1.7 - 3.8	12 (0.53) 7.6 - 17	0.100/0.012

¹OSL=over season leaf (葉)、OSR=over season root (根)、地上部: 葉及び露肩部分。

²各組織の採取時における生育段階。

5 ³蛋白質の発現量は組織の新鮮重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。各組織の平均値、標準誤差及び範囲 (最小値-最大値) は全てのは場で採取された各組織の値を基に計算している (n=20)。SE=標準誤差、FW=新鮮重。

⁴蛋白質の発現量は組織の乾燥重 1 g 当たり重量 (μg) の平均値及び標準誤差として表示している。DW=乾燥重。

10 ⁵LOQ=limit of quantitation (定量限界)、LOD=limit of detection (検出限界)。

⁶BBCH スケールは植物の成長段階を示す基準 (Meier, 2001)。BBCH 17-18 = 7-8 葉期、BBCH 32-39 = ロゼット葉が地表の 20-90%を覆う生育時期、BBCH 49 = 収穫可能な根が到達した生育時期。

15

¹⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

- 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播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して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 本組換えテンサイは、本組換えテンサイに特異的に結合可能なプライマーセットを利用して、リアルタイム定量 PCR による検出及び識別が可能である (別添資料 8; 別添資料 9)。本 PCR の検出限界は 20 コピーであり、このコピー数は供試 DNA 量を 100 ng とする条件においてゲノム DNA 量比で 0.015%に相当する (別添資料 9 の Table 4, p9 及び p31)。

15 本 PCR の信頼性については、KWS、Eurofins GeneScan USA Inc.、Eurofins GeneScan GmbH 及び Gold Standard Diagnostics Freiburg GmbH において検証され、確認されている (別添資料 9)。

- (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

25 本組換えテンサイに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺伝子は、それぞれ改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質を発現することにより、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバに対する耐性を付与する。

30 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¹⁹

本組換えテンサイの宿主は、非組換えテンサイの育成系統 04E05B1DH05 で

¹⁹ 本項目中の以下に続く a~g に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

あり、改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺伝子が導入されている。

宿主であるテンサイについて、我が国に交雑可能な近縁野生種の自生は報告されていない(第一の 1-(3)-ニ-③, p8~9)。

5

2023 年~2024 年に、バイエルクロップサイエンス株式会社隔離ほ場 (以下「本隔離ほ場」とする。) において、本組換えテンサイの隔離ほ場試験を行った。本隔離ほ場試験では慣行栽培を想定した生育一年目に調査が可能である項目(第一の 2-(6)-②-a 形態及び生育の特性 (p35~36)、c 成体の越冬性 (p36) 及び
10 g 有害物質の産生性 (p39)) について調査を行った。生育二年目に調査が必要な生殖特性に関わる項目(第一の 2-(6)-②-d 花粉の稔性及びサイズ (p36~37) 及び
e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 (p37~38)) については、隔離ほ場試験の承認申請時に提出した生物多様性影響評価書及び隔離ほ場試験計画書に記載したとおり、既に第一種使用規程の承認を受けた H7-1 系統と同様に海外で調
15 査を行うこととし、2019 年及び 2022 年に、米国のほ場において栽培した個体又は収穫した種子を調査した。発芽試験については 2020 年に米国において実施した。また、第一の 2-(6)-②-b 生育初期における低温耐性 (p36) については、2023 年にバイエルグループ (米国) の人工気象室において試験を実施した。

隔離ほ場試験には、本組換えテンサイの F₁ 世代 (CMS-F₁ × 04E05B1DH05) を
20 供試した (図 3, p25)。対照の非組換えテンサイとしては、本組換えテンサイと同様の遺伝的背景をもつ CMS-F₁ × 04E05B1DH05 を用いた (以下「対照の非組換えテンサイ」とする。)

a 形態及び生育の特性

25

2023 年に本隔離ほ場において、本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイ及び非組換えテンサイの参照品種 2 品種を 4 反復で栽培し、14 項目 (葉数、葉長 (cm)、根長 (cm)、根周 (cm)、全重 (g)、トップ重 (g)、根重 (g)、T/R 比²⁰、糖度 (%)、葉姿、葉色、葉形、露肩、抽苔性) を調査した。このうち、葉数、葉長
30 (cm)、根長 (cm)、根周 (cm)、全重 (g)、トップ重 (g)、根重 (g)、T/R 比及び糖度 (%) については統計解析を行った。葉姿、葉色、葉形、露肩及び抽苔性に関しては、量的なばらつきがない項目であるため統計解析を行わなかった。

統計解析の結果、根重及び T/R 比において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた (別添資料 10 の表 2, p10)。

²⁰ トップ (最下葉根跡より上の地上部) 重 (g) を根重 (g) で割った値。

根重の平均値は、本組換えテンサイが 731.95 g、対照の非組換えテンサイが 864.33 g であり、本組換えテンサイの方が低い値を示した。T/R 比の平均値は、本組換えテンサイが 0.34、対照の非組換えテンサイが 0.30 であり、本組換えテンサイの方が高い値を示した。なお、本組換えテンサイの根重の平均値 (731.95 g) 及び T/R 比の平均値 (0.34) は、それぞれ本隔離ほ場において同時期に栽培した参照品種 2 品種の根重及び T/R 比の平均値の範囲 (627.40 g ~ 805.03 g 及び 0.24 ~ 0.37) に収まっていた。統計解析を行わなかった 5 項目 (葉姿、葉色、葉形、露肩及び抽苔性) においては、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に違いは認められなかった (別添資料 10 の表 2, p10)。

10

b 生育初期における低温耐性

2023 年に米国のバイエルグループの人工気象室において、生育初期における低温耐性試験を実施した。生育初期における低温耐性を比較するために、生育段階が BBCH14 ~ BBCH16 にある本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイ及び非組換えテンサイの参照品種 4 品種の幼苗を日中 10°C/夜間 6°C に設定した人工気象室で栽培した。低温処理開始後 14 日目及び 28 日目に草丈を調査するとともに、低温処理開始後 28 日目の個体を乾燥させて乾燥重を測定し、草丈及び乾燥重について統計解析を行った。

その結果、草丈及び乾燥重のいずれにおいても本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の Table 5~6, p18~19)。

15

20

c 成体の越冬性

2023 年 5 月に本隔離ほ場に移植した個体を、生育一年目の収穫期 (2023 年 10~11 月) 以降も引き続き生育させ、越冬し再生した個体数を 2024 年 3 月 12 日に調査した。生存個体は成長点に近い若い葉が枯れていない個体と定義し、生存率 (%) を求めた。その結果、本組換えテンサイの生存率と対照の非組換えテンサイの生存率との間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 10 の表 3, p11)。

25

30

d 花粉の稔性及びサイズ

2022 年に米国の 1 か所 (ユタ州) のほ場において、本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイ及び非組換えテンサイの参照品種 4 品種を 3 反復で栽培し、

35

花粉の稔性 (充実度)、サイズ及び形態を調査した。その結果、花粉の稔性及びサイズのいずれにおいても本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 12 の Table 2, p13)。花粉の形態は量的なばらつきがない項目であるため統計解析を行わなかったが、本組換え
5 テンサイと対照の非組換えテンサイとの間に違いは認められなかった (別添資料 12 の Figure 1, p14)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

10 生産量 :

2022年に米国の4か所(ミネソタ州3か所及びユタ州)のほ場において、本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイ及び非組換えテンサイの参照品種6品種を3反復(32株/プロット/反復)で栽培し、種子の生産量に関する3項目(プロット当たりの種子生産量(g)、個体当たりの種子生産量及び千粒重(g))を調査し
15 た。なお、参照品種6品種については、米国の4か所のほ場から2~3か所を選び、栽培を行った。統計解析の結果、千粒重において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた(別添資料13の Table 4, p17)。千粒重の平均値は、本組換えテンサイが10.2g、対照の非組換え
20 テンサイが14.1gであり、本組換えテンサイの方が低い値を示した。本組換えテンサイの千粒重の平均値(10.2g)は、参照品種6品種の千粒重の平均値の範囲(12.1g~19.3g)には収まっていなかったものの、文献により報告されている非組換えテンサイの従来品種(以下「非組換え従来品種」という。)における千粒重の範囲(6.5g~18.0g)²¹(Heimbach, 2018)に収まっていた。また、個体当たりの
25 種子生産量については、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料13の Table 4, p17)。

なお、生殖成長に関わる特性として、播種日から開花日(10%の花が開花した日)及び播種日から成熟日(種子の50%が完全に熟し、種子が緑色から赤褐色又は紫色に変わった日)までの日数についてもそれぞれ調査を行ったが、
30 いずれの項目においても本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料13の Table 4, p17)。

脱粒性 :

上記の種子生産量の調査を行ったほ場において、脱粒性を調査した。各プロットにおける種子生産量と脱粒量から脱粒率(%)を求め、統計解析を行った。

²¹ 3,164個体の非組換え従来品種の調査結果。

その結果、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料 13 の Table 4, p17)。

休眠性及び発芽率：

- 5 2020年に、米国(ユタ州のそれぞれ1か所)のほ場において収穫された本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイの種子及び非組換えテンサイの参照品種4品種の種子を、それぞれ4反復、反復当たり100粒シャーレ上に静置し、Association of Official Seed Analysts (AOSA)が標準試験法とする至適条件(20°C 16時間/30°C 8時間、10日間)及びAOSAの標準試験法を参考に設定した準至適
- 10 条件(6°C 24時間、14日間)において、種子の発芽試験を実施した。なお、米国のほ場における種子の収穫は2019年に行った。発芽試験においては、発芽率(%)、死亡種子率(%)、吸水膨潤状態種子²²率(%)及び硬実種子²³率(%)を調査した(別添資料14)。

- 試験の結果、至適条件では、発芽率及び硬実種子率の平均値において、本組
- 15 換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料14のTable 3, p17)。他方、死亡種子率及び吸水膨潤状態種子率の平均値において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められ、それぞれの平均値は本組換えテンサイが0.75%及び1.00%、対照の非組換えテンサイが4.25%及び4.75%であり、いずれも本組換え
- 20 テンサイの方が低い値を示した(別添資料14のTable 3, p17)。準至適条件では、発芽率、死亡種子率及び硬実種子率の平均値において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料14のTable 3, p17)。他方、吸水膨潤状態種子率の平均値において、本組換えテ
- 25 ンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められ、本組換えテンサイの方が高い値を示した(別添資料14のTable 3, p17)。本試験で、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められたいずれの項目(至適条件における死亡種子率及び吸水膨潤状態種子率並びに準至適条件における吸水膨潤状態種子率)においても、本組換えテンサイの平均値(それ
- 30 ぞれ0.75%、1.00%、15.25%)は非組換えテンサイの参照品種4品種の平均値の範囲(それぞれ0~7%、0~10%、3~22%)に収まっていた。

²² 未発芽の生存種子のうち吸水膨潤状態にある種子。

²³ 未発芽の生存種子のうち水を吸収せず硬い状態にある種子。

f 交雑率

我が国にはテンサイと交雑可能な近縁野生種の自生は報告されていないため、交雑率の試験は行わなかった。

5

g 有害物質の産生性

本組換えテンサイから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。鋤込み試験には、2023年に本隔離ほ場において栽培した本組換えテンサイ、対照の非組換えテンサイ及び非組換えテンサイの参照品種2品種を用いた。また、土壤微生物相試験及び後作試験には、本隔離ほ場において各系統を栽培した後の土壤を用いた。

その結果、土壤微生物相試験における糸状菌数においてのみ、本組換えテンサイ区の土壤と対照の非組換えテンサイ区の土壤との間に統計学的有意差が認められた(別添資料10の表4~6, p13)。糸状菌数の平均値は、本組換えテンサイ区の土壤が 5.20×10^4 CFU/g、対照の非組換えテンサイ区の土壤が 3.50×10^4 CFU/g であり、本組換えテンサイ区の土壤の方が高い値を示した(別添資料10の表4, p13)。

なお、後作試験におけるハツカダイコンの発芽率については、本組換えテンサイ区の土壤と対照の非組換えテンサイ区の土壤との間に統計学的有意差は認められなかったものの、ハツカダイコンの発芽率の平均値は総じて低かった(本組換えテンサイ区の土壤: 55.8%、非組換えテンサイ区の土壤: 53.3%、非組換えの参照品種(2品種)区の土壤: 69.2%及び73.1%)。このように非組換えテンサイ区も含めた全ての試験区の土壤において一定数の発芽不良が認められた要因としては、本後作試験に用いた土質の影響があると考えられた。後作試験用の土壤を採取した形態及び生育特性調査区には、病虫害防除を含めた栽培管理のために通常よりも頻繁に立ち入っており、その踏圧により土壤の圧縮、硬化及び通気性の低下が起こった可能性がある。このような土壤条件下では、種子の発芽率が低下することが知られている(Nawaz et al., 2013)。

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

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、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

10

—

(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

15

—

(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

20

申請書に添付した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

25

—

(6) 国外における使用等に関する情報

30

本組換えテンサイ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 7 (p41) のとおりである。

表 7 本組換えテンサイの主要栽培予定国及び輸入予定国における申請予定²⁴

2025年1月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2022年5月	2023年12月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2022年5月	2023年12月
米国農務省 (USDA)	環境	2022年8月	2024年4月 ²⁵
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2023年6月	—
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2024年3月	—

5

なお、本組換えテンサイの我が国における申請状況は以下のとおりである(表 8, p41)。

10 表 8 本組換えテンサイの我が国における申請及び認可状況²⁶

2025年1月現在

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
厚生労働省	食品 ²⁷	2024年1月	—
農林水産省	飼料 ²⁸	2024年2月	—
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程：隔離ほ場)	2022年8月	2023年5月
農林水産省・環境省	環境(第一種使用規程：一般使用)	2024年10月	—

²⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²⁵ 米国農務省 (USDA) による規制ステータス評価 (Regulatory Status Review) の第一段階 (RSR ステップ1) の結果、規制対象にあたらないと判断された。

²⁶ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

²⁷ 食品衛生法に基づく。

²⁸ 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。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価²⁹

1 競合における優位性

5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

テンサイは我が国に1870年頃に導入され、これまでに西南暖地、東北地方、北海道等において栽培されてきたが、我が国においてテンサイが自生しているという報告はない。この理由として、1) テンサイの種子には発芽や初期成長に必要な外胚乳がほとんど含まれていないため、生育初期において、雑草との競合や病気、草食動物から受けるダメージに対して非常に脆弱であること (OECD, 2001)、2) テンサイは春に播種し、同年の秋に収穫されるため (CFIA, 2023)、一般に翌年の開花・結実まで至らないこと、3) 仮に播種と同年の秋に収穫が行われなかったとしても、テンサイは寒さに敏感であり-5°C以下の降霜により枯死すること (CFIA, 2023) 等が挙げられる。

本組換えテンサイには、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺伝子からそれぞれ発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質により除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバに対する耐性が付与されているが、これらの除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

競合における優位性に関わる諸形質として、本組換えテンサイの形態及び生育の特性並びに成体の越冬性を、国内に設置した本隔離ほ場において調査した (第一の 2-(6)-②-a 及び c, p35~36)。また、生育初期における低温耐性については、バイエルグループ (米国) の人工気象室において (第一の 2-(6)-②-b, p36)、花粉の稔性及びサイズ並びに種子の生産量及び脱粒性については、米国のほ場において (第一の 2-(6)-②-d 及び e, p36~38)、種子の休眠性及び発芽率については、米国のほ場で収穫された種子を用い、米国において調査した (第一の 2-(6)-②-e, p38)。

その結果、以下のとおり、いくつかの項目において本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められたものの、それぞれの項目に記載した理由から、本組換えテンサイの競合における優位性が高まっていることを示すものではないと考えられた。

²⁹ 本項目中で、第一の2-(6)-②のa~gに記載された試験結果に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社に帰属する。

本隔離ほ場において調査した項目では、根重及び T/R 比においてのみ、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた。しかしながら、根重については、本組換えテンサイの平均値 (731.95 g) は対照の非組換えテンサイの平均値 (864.33 g) に比べて低い値を示すとともに、本隔離ほ場において同時期に栽培した参照品種 2 品種の根重の平均値の範囲 (627.40 g ~ 805.03 g) に収まっていた。また、T/R 比については、本組換えテンサイの平均値が 0.34、対照の非組換えテンサイの平均値が 0.30 であり、本組換えテンサイの方が高い値を示した。しかしながら、T/R 比は根重と負の相関関係にあることから、T/R 比において認められた統計学的有意差は、根重の平均値が本組換えテンサイよりも対照の非組換えテンサイで高い一方、トップ重が同等であったことから生じたと考えられるとともに、本組換えテンサイの T/R 比の平均値 (0.34) は本隔離ほ場において同時期に栽培した参照品種 2 品種の T/R 比の平均値の範囲 (0.24 ~ 0.37) に収まっていた。

以上のことから、我が国の隔離ほ場試験において認められた本組換えテンサイの根重及び T/R 比は、非組換えテンサイの品種間変動の範囲内であり、本組換えテンサイの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

米国のほ場において調査し統計解析を行った項目では、千粒重において本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた。しかしながら、本組換えテンサイの平均値 (10.2 g) は、対照の非組換えテンサイの平均値 (14.1 g) に比べて低い値を示すとともに、参照品種 6 品種の千粒重の平均値の範囲 (12.1 g ~ 19.3 g) には収まっていなかったものの、文献により報告されている非組換え従来品種の範囲 (6.5 g ~ 18.0 g) (Heimbach, 2018) に収まっていた。

以上のことから、米国のほ場において認められた本組換えテンサイの千粒重は、非組換えテンサイの品種間変動の範囲内であり、本組換えテンサイの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

米国のほ場で収穫された種子を用いて調査した発芽率については、至適条件及び準至適条件の 2 つの温度条件下において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった。他方、発芽率と同時に調査を行った死亡種子率、吸水膨潤状態種子率及び硬実種子率について、至適条件下では死亡種子率及び吸水膨潤状態種子率において、準至適条件下では吸水膨潤状態種子率において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた。

しかしながら、至適条件下における死亡種子率 (0.75%) 及び吸水膨潤状態種

子率 (1.00%) 並びに準至適条件下における吸水膨潤状態種子率 (15.25%) の平均値については、いずれも参照品種 4 品種の範囲 (それぞれ 0 ~ 7%、0 ~ 10%及び 3 ~ 22%) に収まっていた。また、休眠性獲得の指標である硬実種子率は、両温度条件下において、本組換えテンサイ及び対照の非組換えテンサイともに 0% であった。よって、本試験で認められた死亡種子率及び吸水膨潤状態種子率における統計学的有意差は、本組換えテンサイの競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

よって、本隔離ほ場試験、米国でのほ場試験及び人工気象室の調査において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に、本組換えテンサイの競合における優位性を高めるような差異は確認されなかった。

以上のことから、競合における優位性に起因する影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えテンサイは、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。

2 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

これまでに、テンサイが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という報告はされていない。

本組換えテンサイでは、除草剤グリホサート耐性を付与する改変CP4 EPSPS

5 蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質及び除草剤ジカンバ耐性を付与する改変KWS20-1 DMO蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これらの蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことを確認した (第一の2-(1)-ロ-②, p18~20)。

10 第一の2-(1)-ロ-③ (p20~21) に示したように、改変 CP4 EPSPS 蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 蛋白質の活性が増大しても、本経路の
15 最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。さらに、EPSPS 蛋白質の基質特異性は非常に高く、植物内の他の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。したがって、改変 CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本組換えテンサイ中に有害物質が産生されることは考えにくい。また、PAT 蛋白質及び DMO 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する内
20 在性化合物を基質とすることがないため、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

20 本組換えテンサイ及び対照の非組換えテンサイについて、有害物質の産生性の有無を比較検討するため、国内に設置した本隔離ほ場で採取したサンプルを用いて、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った (第一の2-(6)-②-g, p39)。その結果、土壌微生物相試験における糸状菌数においてのみ、本組換えテンサイ区の土壌と対照の非組換えテンサイ区の土壌との間に統計学的有意差が認められた。

25 しかしながら、糸状菌数の平均値は、本組換えテンサイ区の土壌が 5.20×10^4 CFU/g、対照の非組換えテンサイ区の土壌が 3.50×10^4 CFU/g であり、本組換えテンサイ区の土壌の方が高い値を示した。このことから、ここで認められた統計学的有意差は本組換えテンサイから糸状菌に対する有害物質が産生されていることを示すものではないと考えられた。また、糸状菌数以外の土壌微生物数 (細菌数、放線菌数) では、本組換えテンサイ区の土壌と対照の非組換えテンサイ
30 区の土壌との間に統計学的有意差は認められなかった。

したがって、本隔離ほ場試験においては、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に、本組換えテンサイの有害物質の産生性を示唆するような差異は確認されなかった。

35 以上のことから、有害物質の産生性に起因する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

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10

以上のことから、本組換えテンサイは、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。

15 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

我が国では本組換えテンサイと交雑可能な近縁野生種の自生は報告されていないことから、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

20

(2) 影響の具体的内容の評価

25

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

30

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えテンサイは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

35

4 その他の性質

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

- 5 テンサイは我が国に1870年頃に導入され、これまでに西南暖地、東北地方、北海道等において栽培されてきたが、我が国においてテンサイが自生しているという報告はない。

10 本組換えテンサイには、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺伝子からそれぞれ発現する改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質により、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバに対する耐性が付与されているが、これらの除草剤の散布が想定されにくい自然条件下において、本形質が競合における優位性を高めるとは考えにくい。

15

国内に設置した本隔離ほ場や米国のほ場又は人工気象室において、競合における優位性に関わる諸形質（形態及び生育の特性、生育初期における低温耐性、成体の越冬性、花粉の稔性（充実度）及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率）を調査した結果、根重、T/R 比、千粒重並びに発芽試験で調査を行った死亡種子率及び吸水膨潤状態種子率において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差が認められた。

20 検討の結果、いずれの項目についても、本組換えテンサイの平均値は、同一ほ場において同時期に栽培した参照品種の平均値の範囲又は文献で報告されている非組換え従来品種の平均値の範囲に収まっていた。このことから、本組換えテンサイで認められた各測定値は、非組換えテンサイの品種間変動の範囲内であると考えられた。

30 よって、本隔離ほ場試験、米国でのほ場試験及び人工気象室の調査において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に、本組換えテンサイの競合における優位性を高めるような差異は確認されなかった。

以上のことから、本組換えテンサイは、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。

35

有害物質の産生性：

これまでに、テンサイが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という報告はされていない。

5

本組換えテンサイでは除草剤グリホサート耐性を付与する改変CP4 EPSPS蛋白質、除草剤グルホシネート耐性を付与するPAT蛋白質、及び除草剤ジカンバ耐性を付与する改変KWS20-1 DMO蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質は有害物質としては知られていない。また、これらの蛋白質は、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有しないことを確認した。

10

改変CP4 EPSPS蛋白質は、芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS蛋白質の活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。さらに、EPSPS蛋白質の基質特異性は非常に高く、植物の他の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。したがって、改変CP4 EPSPS蛋白質が原因で、本組換えテンサイ中に有害物質が産生されることは考えにくい。また、PAT蛋白質及びDMO蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する内在性化合物を基質とすることがないため、PAT蛋白質及び改変KWS20-1 DMO蛋白質が宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考えにくい。

15

20

本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイの間で、有害物質の産生性の有無を、土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した結果、土壌微生物相試験の糸状菌数を除く全ての項目において、本組換えテンサイと対照の非組換えテンサイとの間に統計学的有意差は認められなかった。土壌微生物相試験の糸状菌数で認められた統計学的有意差についても、本組換えテンサイ区の土壌の糸状菌数は対照の非組換えテンサイ区の土壌の糸状菌数よりも高い値を示したことから、本組換えテンサイから糸状菌に対する有害物質が産生されていることを示すものではないと考えられた。

25

30

以上のことから、本組換えテンサイは、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。

35 交雑性：

我が国において、テンサイと交雑可能な近縁野生種の自生について報告はな

いことから、本組換えテンサイは、交雑性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

- 5 以上のことから、本組換えテンサイを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと総合的に判断された。

参考文献

Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.

Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.

Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Cattanach, A.W., A.G. Dexter and E.S. Oplinger. 1991. Sugarbeets. Alternative field crops manual. University of Wisconsin, University of Minnesota. <https://hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sugarbeet.html> [Accessed September 9, 2021].

CFIA. 2023. The biology of *Beta vulgaris* L. (Sugar beet). Canadian Food Inspection Agency, Ottawa, Ontario. <https://inspection.canada.ca/en/plant-varieties/plants-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/beta-vulgaris> [Accessed June 25, 2024].

Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.

D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiniski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.

Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied*

Genetics 1: 561-573.

Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.

FAOSTAT. 2024. Food and Agriculture Organization statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> [Accessed June 7, 2024].

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

Fluhr, R., P. Moses, G. Morelli, G. Coruzzi and N.-H. Chua. 1986. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *The EMBO Journal* 5: 2063-2071.

Franz, J.E., M.K. Mao and J.A. Sikorski. 1997. Glyphosate's molecular mode of action. Pages 521-535 in *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. American Chemical Society, Washington, D.C.

Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.

Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.

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

Ha, S.-B. and G. An. 1988. Identification of upstream regulatory elements involved in the developmental expression of the *Arabidopsis thaliana cab1* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8017-8021.

Hecker, R.J. 1988. Pollen characteristics of diploid and tetraploid sugarbeet. *Journal of Sugar Beet Research* 25: 55-62.

Heimbach, U. 2018. Variability of thousand grain weights of seed batches of important arable and some horticultural crops. *Journal für Kulturpflanzen* 70: 250-254.

Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.

Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.

Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

Itoh, Y., J.M. Watson, D. Haas and T. Leisinger. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. *Plasmid* 11: 206-220.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.

Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. *Russian Journal of Genetics* 43: 1413-1414.

Kuranouchi, T., K. Kawaguchi and M. Tanaka. 2000. Male sterility in sugar beet induced by cooling treatment and its application to cross-pollination for breeding. *Breeding Science* 50: 283-289.

Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. *Journal of Plant Physiology* 123: 135-142.

Meier, U. 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. Second Edition. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Grossbeeren, Germany.

Meinzel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. *Proteomics* 8: 626-649.

Nawaz, M.F., G. Bourrié and F. Trolard. 2013. Soil compaction impact and modelling. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 33: 291-309.

OECD. 2001. Consensus document on the biology of *Beta vulgaris* L. (Sugar beet). ENV/JM/MONO(2001)11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2002. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. ENV/JM/MONO(2002)4. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2021. OECD Seed Schemes: Rules and Regulations 2021. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Semagn, K., R. Babu, S. Hearne and M. Olsen. 2014. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the technology and its application in crop improvement. *Molecular Breeding* 33: 1-14.

Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid

pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.

The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 399-436.

Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.

Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. Zeitschrift für Naturforschung C 39: 500-504.

Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. Gene 70: 25-37.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 361-370.

財務省. 2024. 財務省貿易統計. 財務省. <https://www.customs.go.jp/toukei/info/> [Accessed May 21, 2024].

井上和雄・山本良三 1974 テンサイ種球中の発芽阻害物質について 日本作物学会東海支部研究発表梗概 日本作物学会東海支部 日本 69: 27-30

田中征勝 2004 17. 特用作物 糖料作物 テンサイ (甜菜) 新編 農学大辞典 養賢堂 東京 pp. 619-620

田辺秀男 1981 VII 糖料 B. テンサイ 工芸作物学 農山漁村文化協会 東京 pp.

208-232

農林水産省 2024 令和 5 年産てんさいの作付面積及び収穫量（北海道） 農林水産省 作物統計
https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/sakkyou_kome/kougei/r5/tensai/index.html [Accessed May 20, 2024]

北海道農政事務所 2024 令和 5 年産 てんさいの市町村別作付け面積及び収穫量（北海道） <https://www.maff.go.jp/hokkaido/toukei/kikaku/sokuho/index.html>
[Accessed May 20, 2024]

緊急措置計画書

2024年10月24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 大島 美紀
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、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ (改変 *cp4 epsps, pat*, 改変 *dmo, Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. altissima*) (KWS20-1, OECD UI: KB-KWS201-6) (以下「本組換えテンサイ」という。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると、科学的に判断された場合、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は以下に示すとおりである。

2024年10月現在

社内委員	
【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 レギュラトリーアフェアーズ S&T 部長 東京都千代田区丸の内一丁目6番5号 (電話番号 03-6266-7384)
【個人情報につき非開示】	バイエルホールディング株式会社 広報本部 社外広報マネジャー
【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 レギュラトリーアフェアーズ S&T
【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 レギュラトリーアフェアーズ S&T 河内試験圃場 サイトリーダー

*：管理責任者

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は、バイエルグループと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者等使用の可能性がある関

係各者から情報収集を行う。

3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

弊社は、バイエルグループと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えテンサイの適切な管理、取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

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

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、弊社は、バイエルグループの協力のもと、本組換えテンサイが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えテンサイに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は信頼性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずるおそれが示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

別添資料リスト

- 別添資料 1 本組換えテンサイの作出に用いた改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺伝子から推定した改変 CP4 EPSPS 蛋白質、PAT 蛋白質及び改変 KWS20-1 DMO 蛋白質のアミノ酸配列 (社外秘)
- 別添資料 2 Sequence of Genetic Elements in PV-BVHT527462 (社外秘)
- 別添資料 3 Determination of absence of *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 in herbicide-tolerant KWS20-1 sugar beet (KWS20002) (社外秘)
- 別添資料 4 Amended report: Determination of Presence or Absence of *Agrobacterium tumefaciens* in T2 Generation of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 (KWS21006_V2) (社外秘)
- 別添資料 5 Summary of Molecular Characterization of T-DNA Insertion in Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 by Southern Blot Analysis (KWS22003) (社外秘)
- 別添資料 6 Amended Report for TRR0001005: Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, DMO+27.1 and PAT Proteins Across 3 Generations of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 (TRR0001055) (社外秘)
- 別添資料 7 Amended Report for M-821856-01-1: Assessment of CP4 EPSPS, DMO, and PAT Protein Levels in Tissues Collected from Treated Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Produced in United States Field Trials During 2020 (M-821856-02-1) (社外秘)
- 別添資料 8 KWS20-1 Sugar Beet Quantitative Detection Method: PCR Methods description (社外秘)
- 別添資料 9 Report on the Validation of a Quantitative Event-specific, Real-time PCR System for the Detection of KWS20-1 Sugar beet (社外秘)
- 別添資料 10 除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ (改変 *cp4 epsps*, *pat*, 改変 *dmo*, *Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) (KWS20-1, OECD UI: KB-KWS201-6) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験報告書 (社外秘)
- 別添資料 11 Amended Report for M-853516-01-1: Assessment of the Effect of Cold

Stress on Growth of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 in 2023 under Controlled Environmental Conditions (M-853516-02-1) (社外秘)

別添資料 12 Pollen Viability and Morphology Evaluation of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Grown in a 2022 U.S. Field Trial (M-828330-01-1) (社外秘)

別添資料 13 Phenotypic Evaluation and Observation of Crop Stressors in Reproductive Phase of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 in 2022 USA Field Trial (M-849315-01-1) (社外秘)

別添資料 14 Dormancy and Germination Evaluation of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 in 2020 (M-830526-01-1) (社外秘)