

## 組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

平成 26 年 3 月 12 日付け 25 消安第 5755 号をもって諮問された組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認について「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続を定める件」（平成 14 年 11 月 26 日付け農林水産省告示第 1780 号。以下「確認手続」という。）に基づき確認を行った。その結果は次のとおりである。

## 1. 申請品目

- 飼料名：除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ 44406 系統  
性質：除草剤（アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート）耐性  
申請者：ダウ・ケミカル日本株式会社  
開発者：ダウ・アグロサイエンス社

## 2. 経過

- 平成 26 年 3 月 12 日 諮問  
26 年 7 月 30 日 第 13 回遺伝子組換え飼料部会

## 3. 遺伝子組換え飼料部会の審議結果

安全性確認（案）のとおり。

参考：飼料に係る食品健康影響評価（畜産物の安全性）

平成 26 年 3 月 12 日 農林水産省より、食品安全委員会に評価依頼し、  
継続審議中

**組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認  
(案)**

**除草剤アリルオキシアルカノエート系、  
グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ  
44406 系統**

**平成 26 年 8 月 27 日  
農林水産省消費・安全局  
畜水産安全管理課**

## 目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	4
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	4
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	4
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
10	3 宿主に関する事項	5
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	5
	(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
	(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
15	(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
	(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	6
	(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
	(8) 飼料に利用された歴史に関する事項	6
	(9) 飼料の安全な利用に関する事項	6
20	(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
	(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
	4 ベクターに関する事項	6
	(1) 名称及び由来に関する事項	6
	(2) 性質に関する事項	7
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	7
	(4) 伝達性に関する事項	7
	(5) 宿主依存性に関する事項	7
	(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	7
	(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	7
30	5 挿入遺伝子に関する事項	7

	(1) 供与体に関する事項.....	7
	(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項.....	8
	(3) 構造に関する事項.....	8
	(4) 性質に関する事項.....	9
35	(5) 純度に関する事項.....	1 1
	(6) コピー数に関する事項.....	1 1
	(7) 安定性に関する事項.....	1 2
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	1 2
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	1 2
40	(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項.....	1 2
	6 組換え体に関する事項.....	1 3
	(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項.....	1 3
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 3
45	(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項.....	1 3
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	1 5
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	1 6
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	1 7
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	1 8
50	(8) 不活化法に関する事項.....	1 8
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	1 8
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	1 8
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 8
55	7 2から6までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項.....	1 8
	IV 審議結果.....	1 8
	V 参考文献及び参考資料.....	1 9

「除草剤アリルオキシアルカノエート系、  
グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ 44406 系統」  
に係る安全性確認

60

## I はじめに

65 除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ 44406 系統（以下「44406 ダイズ」という。）について、平成 26 年 3 月 4 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

## II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ 44406 系統  
性 質 : 除草剤（アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグルホシネート）耐性  
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社  
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社

70

44406ダイズは、グラム陰性桿菌である *Delftia acidovorans* MC1株に由来する改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12遺伝子（以下「改変 *aad-12* 遺伝子」という。）を導入したダイズである。改変 *aad-12* 遺伝子から改変アリルオキシアルカノエート・ジオキシゲナーゼ-12たん白質（以下「改変 AAD-12たん白質」という。）が発現され、改変 AAD-12たん白質がアリルオキシアルカノエート系除草剤を除草活性のない化合物に変換することにより、44406ダイズはアリルオキシアルカノエート系除草剤の影響を受けずに生育できる。

75

また、44406ダイズには、トウモロコシに由来する改変5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（以下「*2mepsps* 遺伝子」という。）が導入されている。

80

*2mepsps* 遺伝子から改変5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下、「*2mEPSPS*たん白質」という。）が発現され、除草剤グリホサートによる阻害を受けずにシキミ酸合成を機能させることにより、除草剤グリホサートの耐性を付与する。

85

さらに、44406ダイズには、選択マーカーとして *Streptomyces viridochromogenes* に由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（以下「改変 *pat* 遺伝子」という。）が導入されている。改変 *pat* 遺伝子からホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼたん白質（以下「PATたん白質」という。）が発現され、PATたん白質が除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することにより、除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。

90

44406ダイズと非組換えダイズを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上の性質を除き、差異は認められなかった。このため、44406ダイズに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として安全

上の問題となる点は認められなかった。したがって、44406ダイズは、飼料として摂取する家畜等の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

95       なお、ダイズは主に大豆油かすの形態で家畜等の飼料として使用されている。

### III 審議内容

#### 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

##### (1) 遺伝的素材に関する事項

100       44406 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr. の商業品種 Maverick である。

44406 ダイズには *D. acidovorans* MC1 株に由来する改変 *aad-12* 遺伝子、トウモロコシに由来する *2mepsps* 遺伝子及び *S. viridochromogenes* に由来する改変 *pat* 遺伝子が導入されている。

105       改変 *aad-12* 遺伝子は、改変 AAD-12 たん白質を発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性を付与する。

*2mepsps* 遺伝子は、2mEPSPS たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

110       改変 *pat* 遺伝子は、PAT たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。この性質は、44406 ダイズ作出時の選抜マーカーとして利用されている。

##### (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

115       ダイズは、優れたたん白質の供給源であり、主に大豆油かすの形態で育すう・成鶏用、ブロイラー用、養豚用、乳牛用及び肉牛用飼料の原料として用いられている。

##### (3) 飼料の構成成分等に関する事項

120       44406 ダイズ及び非組換えダイズの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である (OECD, 2012、ILSI, 2010a、参考資料 18)。

##### (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

125       44406 ダイズは、改変 AAD-12 たん白質、2mEPSPS たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、アリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。この点を除けば、44406 ダイズは非組換えダイズと差異はなく、①収穫時期 (成熟程度)、②家畜等の摂取 (可食) 部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法についても非組換えダイズと変わりはない。

130       (1) ~ (4) により、44406 ダイズの飼料としての安全性評価においては、非組換えダイズとの比較が可能であると判断された。

## 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

135 44406 ダイズは、アリルオキシアルカノエート系除草剤、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。44406 ダイズが非組換えダイズと異なる点は、上の除草剤に対する耐性をもつことのみであり、その飼料としての利用目的及び利用方法に関して非組換えダイズとの差異はない。なお、栽培時に使用が想定されている除草剤はアリルオキシアルカノエート系除草剤の2,4-ジクロロフェノキシ酢酸（以下「2,4-D」という。）及びグリホサートであり、グルホシネートは形質転換体を選抜するためのみに使用される。

140

## 3 宿主に関する事項

### (1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

145 44406 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr.の商業品種 Maverick である。

### (2) 遺伝的先祖に関する事項

150 ダイズは一般に中国北部を原産とする最も古い栽培作物のひとつであると見なされ、野生種であるツルマメ(*Glycine soja*)と同じ *Soja* 亜属に属している。細胞学的、形態学的、分子生物学的な証拠から、ツルマメがダイズの祖先野生種であると考えられている (OECD, 2000)。

### (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

155 ダイズに含まれる有害生理活性物質として、トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が知られている (OECD, 2001)。

160 トリプシンインヒビターはたん白質分解酵素阻害物質であり、消化酵素であるトリプシンを不活化し、結果として摂取したたん白質の消化を阻害する。レクチンは炭水化物含有化合物に結合するたん白質で、血液凝集の原因となる赤血球凝集素として作用することが知られている。トリプシンインヒビター及びレクチンは、加熱により失活され (OECD, 2001)、実際に摂取するダイズ製品中に含まれるトリプシンインヒビター及びレクチンの量はごくわずかであると考えられる。

165 ダイズは長い食経験の中で、これまでに内在性の有害生理活性物質によりヒトや家畜等の健康に影響を及ぼしたという報告はない (OECD, 2001)。

### (4) 寄生性及び定着性に関する事項

ダイズは種子植物であり、ダイズが家畜等に寄生又は定着することはない。

### (5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

170 ダイズには、ウイルス、細菌及び糸状菌等の微生物により各種の病害が発生する。可食部である種子でも同様の微生物により、数種類の病害（ダイズモザイクウイルス病、茎疫病及び紫斑病など）が発生する (OECD, 2000)。しかし、これらの

病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

175 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項  
ダイズは栽培作物であり、雑草化する能力は極めて低い (OECD, 2000)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

180 ダイズは、一年生の自殖性植物である。ダイズと交雑可能な近縁野生種として、  
我が国にはツルマメが自生している (OECD, 2000)。しかし、ダイズは自殖率が高く、  
一般的にダイズとツルマメの開花期が重なりにくいいため、ツルマメとダイズ  
との間の自然交雑率は、極めて低いことが報告されている (OECD, 2000、  
Nakayama and Yamaguchi, 2002、Mizuguti *et al.*, 2009)。

185 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

ダイズの飼料としての利用形態は、大豆油かす、大豆皮、きな粉及びエクスト  
ルーダー処理大豆等が挙げられる。ダイズ由来の飼料原料として最も多く使用さ  
れているのは大豆油かすであり、植物性油かす類のうち最も代表的なものである。  
大豆油かすは総ての家畜に対して嗜好性が優れ、消化利用性も高く、配合飼料原  
190 料として、各家畜の飼料に古くから使用されている (伊藤ら, 2010、松木ら, 2010)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

ダイズ種子にはトリプシンインヒビター、レクチン等の有害生理活性物質が含  
まれているが、これらは加工段階で適切な加熱処理を施すことにより、不活性化  
195 することができるため、ダイズは飼料として安全に使用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

ダイズ種子に休眠性はなく、寒さに弱いため、ほ場に種子が残っていたとして  
も、次の生育期まで越冬して生存する可能性は低い。仮に、自生したとしても、  
200 物理的あるいは化学的な従来の方法で自生ダイズを防除することができる (OECD,  
2000)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

205 ダイズの近縁種であるツルマメは、ダイズと同様に、トリプシンインヒビター、  
ラフィノース、スタキオース、フィチン酸等の有害生理活性物質を含むことが報  
告されている (Hymowitz and Collins, 1974、Raboy and Dickinson, 1993、  
Natarajan *et al.*, 2007)。

4 ベクターに関する事項

210 (1) 名称及び由来に関する事項

44406 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド pDAB8264 は、プラスミド  
pDAB2407 を基に作製された。なお、プラスミド pDAB2407 に含まれる T-DNA



領域は *Agrobacterium tumefaciens* に、外側骨格配列は *Escherichia coli* にそれぞれ由来する。

215

## (2) 性質に関する事項

プラスミド pDAB2407 の塩基数は 5,817 bp である。また、プラスミド pDAB2407 の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

220

## (3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pDAB2407 及び pDAB8264 にはスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼを産生しスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が含まれており、各プラスミドの選択に用いられた。44406 ダイズへの導入に用いられたプラスミド pDAB8264 において、*specR* 遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置するため、44406 ダイズ中には含まれていない。

225

なお、44406 ダイズ中に *specR* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている (参考資料 1)。

230

## (4) 伝達性に関する事項

プラスミド pDAB2407 は、プラスミドの伝達を可能とする配列を含まない。

## (5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pDAB2407 に含まれるすべての遺伝子の性質は明らかにされており、植物・家畜等で増殖を可能とする配列は含まれていない。

235

## (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

挿入DNAである改変 *aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 及び改変 *pat* 遺伝子を、プラスミド pDAB2407 を基に構築した中間プラスミドに組み込み、導入用プラスミド pDAB8264 を作成している。

240

## (7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

導入用プラスミド pDAB8264 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によりダイズに導入している。

245

## 5 挿入遺伝子に関する事項

### (1) 供与体に関する事項

#### ① 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *aad-12* 遺伝子は、土壌や淡水中などに存在するグラム陰性桿菌である *D. acidovorans* MC1 株に由来する。

250

また、*2mepsps* 遺伝子は、トウモロコシに由来する。

さらに、改変 *pat* 遺伝子は、土壌中に存在するグラム陽性放線菌である *S.*

*viridochromogenes* (OECD, 1999) に由来する。

255 ② 安全性に関する事項

260 改変 *aad-12* 遺伝子の供与体である *D. acidovorans* は、食品産業において、フェルラ酸を香料成分であるバニリンに変換する際に利用されている (Toms and Wood, 1970、Labuda *et al.*, 1994)。また、医療用の生体材料として応用可能であるポリヒドロキシアルカノエート (プラスチックの一種) を生成することが報告されている (Sudesh, 2004)。

265 なお、*D. acidovorans* による日和見感染や角膜感染についての報告がこれまでに数例ある (Horowitz *et al.*, 1990、Brinser and Torczynski, 1977) が、健康なヒトや家畜等に対して病原性を示すことは稀である。

265 *2mepsps* 遺伝子の供与体であるトウモロコシは、長い食経験及び飼料利用としての歴史があり、毒素の産生性は知られていない。

また、改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* が、ヒトや家畜等に対して病原性を有するという報告はない (OECD, 1999)。

270 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

270 挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド pDAB8264 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主である Maverick の種子を基本培地上で発芽させ、単離した子葉節に、pDAB8264 を有する *A. tumefaciens* EHA101 株を感染させ、5 日間共培養した。不定芽誘導培地、不定芽伸長培地、発根培地に抗生物質 (セフトキサシム、バンコマイシン、チカルシリン・クラブラン酸合剤) を添加することにより、*A. tumefaciens* の除菌を行った。また、各選抜培地にグルホシネートを添加することにより、形質転換個体の選抜を行った。

280 その後、選抜した個体を発根培地に移植し、発根後に植物体を鉢上げして馴化した。再分化後の植物体において、グルホシネート塗布及び導入遺伝子解析を行い、目的の遺伝子が導入されていることを確認した。さらに、一般的なダイズの育成プロセスに従って、自家受粉を行うことで、ダイズ 44406 系統を育成した。

(3) 構造に関する事項

285 ① プロモーターに関する事項

285 44406 ダイズに導入された改変 *aad-12* 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のポリユビキチン 10 プロモーター (*AtUbi10*) により発現が制御されている。

*2mepsps* 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のヒストン *H4A748* プロモーター (*histone H4A748*) により発現が制御されている。

290 改変 *pat* 遺伝子は、キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来の *CsVMV* プロモーター (*CsVMV*) によりその発現が制御されている。

② ターミネーターに関する事項

295

改変 *aad-12* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF23 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF23 3' UTR*) により転写が終結する。

*2mepsps* 遺伝子は、シロイヌナズナに由来するヒストン *H4A748* 遺伝子の転写終結点とポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*histone H4A748 3' UTR*) によって転写が終結する。

300

改変 *pat* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF1 3' UTR*) により転写が終結する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

305

導入用プラスミド pDAB8264 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

310

挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>RB7 MAR</i>	タバコ ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) 由来の核マトリックス結合領域 (Hall <i>et al.</i> , 1991)。改変 <i>AAD-12</i> たん白質の発現を安定させる。
<i>2mepsps</i> カセット	
<i>histone H4A748 3' UTR</i>	シロイヌナズナ由来のヒストン <i>H4A748</i> 遺伝子の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子の転写を終結させる。
<i>2mepsps</i> 遺伝子	トウモロコシ由来の <i>epsps</i> 遺伝子に部位特異的に突然変異を起こした遺伝子で、 <i>2mEPSPS</i> たん白質を発現する。アミノ酸配列に関しては、102 番目のトレオニンがイソロイシンに、106 番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している (Lebrun <i>et al.</i> , 1996; Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
<i>TPotp C</i>	トウモロコシ及びヒマワリ ( <i>Helianthus annuus</i> ) のリブローズ-ビスリン酸カルボキシラーゼ (RuBisCO) 由来の葉緑体輸送ペプチドの翻訳領域をもとに作製された。細胞質において合成された <i>2mEPSPS</i> たん白質の葉緑体への輸送のため、 <i>2mepsps</i> 遺伝子に連結されている (Lebrun <i>et al.</i> , 1996; Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
<i>histone H4A748</i> プロ	シロイヌナズナ由来のプロモーター。ヒストン <i>H4A748</i> 遺伝子

モーター	の 5' 末端非翻訳領域及びヒストン H3 遺伝子のイントロン部位を含む(Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。遺伝子を植物体全体で発現させる。
改変 <i>aad-12</i> 遺伝子発現カセット	
<i>AtUbi10</i> プロモーター	シロイヌナズナ由来のポリユビキチン 10 ( <i>UBQ10</i> ) プロモーター。イントロン及び 5' 末端非翻訳領域を含む (Norris <i>et al.</i> , 1993)。遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>aad-12</i> 遺伝子	グラム陰性桿菌である <i>D. acidovorans</i> MC1 株由来の <i>aad-12</i> 遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、改変 AAD-12 たん白質を発現させる。クローニングサイト導入のため、アミノ酸配列の N-末端から 2 番目にアラニンが追加されている (Wright <i>et al.</i> , 2007)。
<i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。
改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット	
<i>CsVMV</i> プロモーター	キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。遺伝子の転写を開始させる。
改変 <i>pat</i> 遺伝子	グラム陽性放線菌である <i>S. viridochromogenes</i> 由来の <i>pat</i> 遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT たん白質を発現させる。アミノ酸配列は改変されていない。
<i>AtuORF1</i> 3' UTR ターミネーター	アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。

① 改変 *aad-12* 遺伝子の機能

315

改変 *aad-12* 遺伝子によって発現する改変 AAD-12 たん白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である (Wright *et al.*, 2007)。

320

ダイズ 44406 系統は、改変 AAD-12 たん白質の作用により、光学異性体をもたないアリルオキシアルカノエート系除草剤に酸素を導入することにより、除草活性のない化合物に変換し、除草剤耐性を示す。例えば、改変 AAD-12 たん白質は除草剤 2,4-D に酸素を導入し、除草活性のない 2,4-ジクロロフェノールとグリオキシル酸に変換する。

325

なお、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、除草活性をもつ化合物は光学異性体のないもの及び光学異性体である R 体のみであり、光学異性体である S 体の化合物は除草活性を持たない。改変 AAD-12 たん白

質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的であるため、ダイズ 44406 系統が耐性を示すのは、光学異性体のないアリルオキシアルカノエート系除草剤である。

330 改変 AAD-12 たん白質が活性を示す除草剤のうち、現在、播種前散布以外では、ダイズへの除草剤登録がされているものはない。そのため、44406 ダイズへの使用が想定される 2,4-D について、現在米国において登録申請中である。

335 ② *2mepsps* 遺伝子の機能

340 *2mepsps* 遺伝子によって発現する 2mEPSPS たん白質では、野生型の EPSPS たん白質のアミノ酸の 102 番目のトレオニンがイソロイシンに、また 106 番目のプロリンがセリンにそれぞれ変化している。本来、野生型の EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸を縮合して 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸を生成させる。この反応は芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路における反応の 1 つであり、ホスホエノールピルビン酸に対する EPSPS たん白質の可逆的競合阻害剤であるグリホサートにより阻害されることがよく知られている。これに対して、2mEPSPS 345 たん白質はグリホサートに対して非感受性となっており、グリホサートによる競合阻害を受けずシキミ酸合成が機能するため、ダイズ 44406 系統はグリホサートの存在下でも生育することができる(Lebrun *et al.*, 2003)。

350 ③ 改変 *pat* 遺伝子の機能

改変 *pat* 遺伝子によって発現する PAT たん白質は、グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない代謝物である N-アセチル-L-グルホシネート (2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコブタン酸) に迅速に変換する。

355 グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量の毒性アンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、N-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないため、PAT たん白質を発現する遺伝子組換え植物では植物毒素の生理学的影響を受けず、除草剤グルホシネートへの耐性を示す(OECD, 360 2002)。

(5) 純度に関する事項

365 導入用プラスミド pDAB8264 に含まれる遺伝子は、その性質が明らかになっており、塩基配列解析により、挿入領域に目的以外の遺伝子は含まれていないことを確認している。

(6) コピー数に関する事項

370 44406 ダイズに導入された遺伝子のコピー数を決定し、T-DNA 領域及び導入用  
プラスミド由来の外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行  
った。その結果、44406 ダイズはゲノム中に 1 コピーの T-DNA 領域を持ち、導入  
用プラスミドの外側骨格配列が存在しないことが確認された（参考資料 1、2）。

375 また、導入遺伝子の構成を確認し、導入遺伝子とその近傍配列の塩基配列を決  
定するため、塩基配列解析を行った。その結果、導入遺伝子領域は完全な形でダ  
イズゲノム中に挿入されており、その近傍配列はダイズゲノム由来であることが  
確認された。一方で、導入遺伝子領域の 5' 末端において 3bp が新たに挿入されて  
いること、ダイズゲノムから 4383bp が欠失していることが明らかになった。（参  
考資料 3）。しかし、近傍配列の BLASTx 及び BLASTp 解析の結果、導入遺伝子  
による既知の内在性の遺伝子の破壊はないことが確認された（参考資料 4）。

#### 380 (7) 安定性に関する事項

44406 ダイズに導入された改変 *aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子及び改変 *pat*  
遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の 44406 ダイズから得  
られた DNA を用いて、サザンブロット分析を実施したところ、導入された改変  
*aad-12* 遺伝子、*2mepsps* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子が複数世代にわたり安定し  
て遺伝していることが確認された（参考資料 1）。

#### 385 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

44406 ダイズにおける改変 AAD-12 たん白質、2mEPSPS たん白質及び PAT た  
ん白質の発現量を ELISA 法により測定した（参考資料 5）。試験には米国の 10 ヶ  
390 所のは場から異なる生育時期に採取した 44406 ダイズの葉、茎葉、根及び種子を  
供試した。測定の結果、供試したすべての組織サンプルから改変 AAD-12 たん白  
質、2mEPSPS たん白質及び PAT たん白質の発現が確認された。

#### 395 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド pDAB8264 にはスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺  
伝子が T-DNA 領域の外側に含まれているが、44406 ダイズ中に *specR* 遺伝子が  
導入されていないことは、サザンブロット分析によって確認されている（参考資料  
1）。

#### 400 (10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性 に関する事項

405 挿入遺伝子領域の 5' 末端及び 3' 末端の近傍配列について、オープンリーディ  
ングフレーム(ORF)検索を行った。30 アミノ酸以上からなる ORF の存在を、6 つ  
の読み枠について、ストップコドンからストップコドンで検索した結果、6 個の  
ORF が検出された。この 6 個の ORF が既知の毒素たん白質と相同性を有するか確  
認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん  
白質を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて相

同姓検索を行った。その結果、既知の毒素たん白質との相同性は確認されなかった (参考資料 4)。

410

## 6 組換え体に関する事項

### (1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

44406 ダイズは、改変 *aad-12* 遺伝子が導入されており、改変 AAD-12 たん白質が発現することによりアリルオキシアルカノエート系除草剤に対する耐性が付与されている。また、*2mepsps* 遺伝子が導入されており、2mEPSPS たん白質が発現することにより除草剤グルホサート耐性が付与されている。さらに、改変 *pat* 遺伝子が導入されており、PAT たん白質が発現することにより除草剤グルホシネート耐性が付与されている。これらの点を除けば、44406 ダイズは非組換えダイズとその形態及び生育特性において差異は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

415

420

### (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

44406 ダイズで発現する改変 AAD-12 たん白質、2mEPSPS たん白質及び PAT たん白質が既知の毒素たん白質と相同性を有するか確認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん白質を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて相同性検索を行った。その結果、改変 AAD-12 たん白質、2mEPSPS たん白質及び PAT たん白質と既知の毒素たん白質との間に相同性は認められなかった (参考資料 6、7、8)。

425

430

### (3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

#### ① 改変 AAD-12 たん白質

改変 AAD-12 たん白質及び 2mEPSPS たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、*Pseudomonas fluorescens* で発現させた改変 AAD-12 たん白質及び 2mEPSPS たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*P. fluorescens* で発現させた改変 AAD-12 たん白質及び 2mEPSPS たん白質と 44406 ダイズ中で発現する同たん白質は、SDS-PAGE 分析、ウエスタンブロット分析、グリコシル化の有無、MALDI-TOF MS 及び ESI-LC/MS によるアミノ酸配列解析、N-末端及び C-末端配列の解析により同等性が確認されている (参考資料 9)。

435

440

#### ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

改変 AAD-12 たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人工胃液中で反応開始 30 秒後には改変 AAD-12 たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、改変 AAD-12 たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認された (参考資料 10)。

445

イ 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

450 改変 AAD-12 たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウ  
エスタブロット分析により評価した。その結果、SDS-PAGE 分析では、反  
応開始 240 分後においても改変 AAD-12 たん白質の分子量（約 32kDa）とほ  
455 ぼ同じ位置にバンドの存在が認められた。一方、ウエスタブロット分析に  
おいては、反応開始 5 分以降、改変 AAD-12 たん白質のバンドは検出されな  
かったため、SDS-PAGE 分析で検出されたバンドは改変 AAD-12 たん白質と  
ほぼ同じ分子量の異なるたん白質であると考えられた。よって、改変 AAD-12  
たん白質は、人工腸液中で速やかに消化されると考えられた（参考資料 12）。

ウ 加熱処理

460 改変 AAD-12 たん白質の加熱処理に対する安定性を、SDS-PAGE 法、  
ELISA 法及び酵素活性測定により評価した。その結果、95℃、30 分の加熱に  
対しても分子量の変化は生じないものの、免疫反応性及び酵素活性は 50℃、  
30 分の加熱により失われたことから、改変 AAD-12 たん白質は熱に不安定で  
あると考えられた（参考資料 14）。

465 ② 2mEPSPS たん白質

2mEPSPS たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、  
*Pseudomonas fluorescens* で発現させた 2mEPSPS たん白質を供試し、以下の  
ア～ウを検討した。なお、*P. fluorescens* で発現させた 2mEPSPS たん白質と  
470 44406 ダイズ中で発現する 2mEPSPS たん白質は、SDS-PAGE 分析、ウエスタ  
ブロット分析、グリコシル化の有無、MALDI-TOF MS 及び ESI-LC/MS によ  
るアミノ酸配列解析、N-末端及び C-末端配列の解析により同等性が確認されて  
いる（参考資料 9）。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

475 2mEPSPS たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエ  
スタブロット分析により評価した。その結果、人工胃液中で反応開始 1 分  
後には 2mEPSPS たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、  
2mEPSPS たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認された（参  
考資料 11）。

480

イ 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素（パンクレアチン）処理

2mEPSPS たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウエ  
スタブロット分析により評価した。その結果、人工腸液中で反応開始 30 分  
485 以降には 2mEPSPS たん白質のバンドは検出されなかった。このことから、  
2mEPSPS たん白質は、人工腸液中で 30 分以内に消化されることが確認され  
た（参考資料 13）。



ウ 加熱処理

490 2mEPSPS たん白質の加熱処理に対する安定性を、SDS-PAGE 法、ELISA 法及び酵素活性測定により評価した。その結果、95℃、30 分の加熱に対しても分子量の変化は生じないものの、免疫反応性及び酵素活性は 75℃、30 分の加熱により失われた(参考資料 15)。

③ PAT たん白質

495 PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、以下のア～ウについて検討した結果が報告されている。なお、試験には 44406 ダイズで産生される PAT たん白質と同一のアミノ酸配列である *E.coli* より産生した PAT たん白質が用いられている。

500 ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

PAT たん白質は人工胃液中で 30 秒以内に消化されることが SDS-PAGE 分析によって確認されている (Hérouet *et al.*, 2005)。

イ 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

505 PAT たん白質は人工腸液中で 30 秒以内に消化されることがウエスタンブロット分析によって確認されている (Hérouet *et al.*, 2005)。

ウ 加熱処理

510 PAT たん白質を用いた加熱処理による変性試験において、SDS-PAGE 分析の結果、90℃、60 分の加熱処理でも分子量に変化がなかったことが報告されているが (Hérouet *et al.*, 2005)、50℃、10 分の加熱処理により酵素活性が失われることが確認されている (Wehrmann *et al.*, 1996)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

515 ① 改変 AAD-12 たん白質の代謝経路への影響

改変 AAD-12 たん白質は、アリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物のうち、光学異性体のないもの及び光学異性体である S 体に特異的に酸素を導入する反応を触媒する酵素である (Wright *et al.*, 2007)。植物の代謝経路においてアリルオキシアルカノエート基をもつ化合物の存在は知られていないが、植物体中に存在するアリルオキシアルカノエート構造をもつ化合物と構造的、生理機能的に似通った化合物 (インドール-3-酢酸、アブシジン酸、ジベレリン酸、アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(エチレン前駆体)、桂皮酸、クマル酸及びシナピン酸) 及び植物の代謝経路において重要な役割を果たしているアミノ酸について、改変 AAD-12 たん白質の作用の有無を確認した (参考資料 16)。その結果、高濃度の改変 AAD-12 たん白質を作用させた場合に、インドール-3-酢酸と桂皮酸から基質の酸化を示す酸化物が検出されたが、その反応速度は非常に遅いことが確認された。また、桂皮酸を前駆物質とするイソフラボン類組成の分

520

525

析の結果、非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても文献値 (OECD, 2012) の範囲内であった。

530 以上のことから、改変 AAD-12 たん白質が宿主の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。

#### ② 2mEPSPS たん白質の代謝経路への影響

535 EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸及びシキミ酸-3-リン酸と特異的に反応する酵素である。これらの基質以外にシキミ酸が EPSPS たん白質と反応することが知られているが、その反応性はシキミ酸-3-リン酸との反応性の約 200 万分の 1 であり、シキミ酸が生体内で基質として反応する可能性は極めて低い (Gruys *et al.*, 1992)。

540 一方、2mEPSPS たん白質と同じ 2 ヶ所の変異を有する大腸菌由来の EPSPS たん白質では、野生型の EPSPS たん白質と同様にホスホエノールピルビン酸と 3-ホスホシキミ酸に対して高い親和性を示したことが報告されている (Funke *et al.*, 2009)。また、2mEPSPS たん白質は、グリホサートに非感受性である以外は、構造的にも機能的にも EPSPS たん白質と類似しており、同一の作用機作をもつ (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009)。したがって、2mEPSPS たん白質は  
545 EPSPS たん白質と同様に基質特異性が高く、他の代謝系を変化させることはないと考えられた。

#### ③ PAT たん白質の代謝経路への影響

550 PAT たん白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他の L 型アミノ酸や D-グルホシネートをアセチル化することはない。また、PAT たん白質は L 型アミノ酸が過剰に存在する場合においても、L-グルホシネートをアセチル化するそれ自身の活性に影響を受けることはない (OECD, 1999)。したがって、PAT  
555 たん白質が植物体の他の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられた。

### (5) 宿主との差異に関する事項

44406 ダイズ及び対照の非組換えダイズとの構成成分の同等性を評価するため、米国の 10 ヶ所のほ場において栽培した 44406 ダイズ及び対照の非組換えダイズの種子について、①主要構成成分、②脂肪酸、③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミン及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 17)。また、参考品種として、44406 ダイズ及び対照の非組換えダイズと成熟期が同程度である 6 種の非組換え自社商業品種を供試した。44406 ダイズに関しては、除草剤無散布区及び除草剤 2,4-D 散布区、グルホシネート散布区、グリホサート散布区及び除草剤 3 種(2,4-D、グルホシネート及びグリホサート)散布区を設定した。除草剤 2,4-D は発芽前、4  
560 葉期及び開花期に、登録時に想定される最大散布薬量である 1,120g ae/ha で 3 回散布した。2,4-D は発芽前、3 葉期及び開花盛期に、登録時に想定される最大散布薬量である 1120g ae/ha を 3 回散布した。グルホシネートは 5 葉期、開花始期にそれぞれ 374g ai/ha、454g ai/ha を 2 回散布した。グリホサートは発芽前、3 葉期  
565

570 及び開花盛期に登録時に想定される最大散布葉量である 1260g ae/ha で 3 回散布した。除草剤 3 種を散布した場合、まず 2,4-D (1120g ae/ha) とグリホサート (1260g ae/ha) を混合し発芽前、3 葉期及び開花盛期にそれぞれ 3 回散布した。加えて、グルホシネートは 5 葉期、開花始期にそれぞれ 374g ai/ha、454g ai/ha を 2 回散布した。

575 ① 主要構成成分

地上部及び種子中の水分、たん白質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF) 及び総食物繊維について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えダイズと同等又は文献に記載された分析値 (OECD, 2012) の範囲内であった。

580

② 脂肪酸

種子中の各脂肪酸について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えダイズと同等又は文献に記載された分析値 (ILSI, 2010a) の範囲内であった。

585

③ アミノ酸

種子中の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えダイズと同等又は文献に記載された分析値 (OECD, 2012) の範囲内であった。

590

④ ミネラル

種子中の各ミネラルについて分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えダイズと同等又は自社商業品種の分析値の範囲内であった。

⑤ ビタミン

595

種子中の各ビタミンについて分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えダイズと同等、文献に記載された分析値 (OECD, 2012) の範囲内又は自社商業品種の分析値の範囲内であった。

⑥ 有害生理活性物質

600

有害生理活性物質として、レクチン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、トリプシンインヒビター及びイソフラボン (総ダイゼイン、総ゲニス테인及び総グリシテイン) について分析した結果、いずれの有害生理活性物質も対照の非組換えダイズと同等又は文献に記載された分析値 (OECD, 2001、OECD, 2012) の範囲内であった。

605

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国及びカナダで行われたほ場試験の結果、44406 ダイズの外界における生存及び増殖能力は、非組換えダイズと同等であることが確認されている。

610 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項  
44406 ダイズの生存・増殖能力は非組換えダイズと同等であり、生存・増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

615 (8) 不活化法に関する事項  
44406 ダイズは、物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の使用）など、ダイズを枯死させる従来の方法で不活化される。

620 (9) 外国における認可等に関する事項  
2012年2月に欧州食品安全機関（EFSA）に食品及び飼料としての安全性確認の申請が行われた。

2013年6月にカナダ保健省（Health Canada）及びカナダ食品検査庁（CFIA）において食品としての安全性確認及び飼料・環境に対する安全性確認が終了した。

2013年4月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において食品としての安全性確認が終了した。

625 2013年12月に米国食品医薬局（FDA）において食品及び飼料としての安全性確認が終了した。

#### (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

630 44406 ダイズの栽培方法は、生育期の雑草防除にアリルオキシアルカノエート系除草剤、もしくはグリホサートを使用できることを除いて、非組換えダイズと同様である。なお、44406 ダイズには除草剤グリホシネート耐性の形質も付与されているが、その目的は形質転換体選抜の際にマーカーとして利用することであり、栽培時に使用が規定されるのはアリルオキシアルカノエート系除草剤の2,4-D及びグリホサートのみである。

635 そこで、2,4-D及びその代謝物について、ダイズ44406系統と同様にアリルオキシアルカノエート系除草剤耐性を有するダイズ系統(DAS68416, OECD UI : DAS-68416-4)への残留及びそれらの摂取が家畜等の健康に及ぼす影響を検証した結果、安全上の問題は認められなかった(参考資料18、19、20)。

#### 640 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

44406 ダイズの種子の製法及び管理方法は非組換えダイズと同様である。

### 7 2から6までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

645 該当しない。

## IV 審議結果

除草剤アリルオキシアルカノエート系、グリホサート及びグリホシネート耐性ダイズ44406系統について、「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確

650 「認の手続」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜への安全上の問題はないと判断された。

## V 参考文献及び参考資料

### 参考文献

1. Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 2(6), p.335-350.
2. Brinser, J.H.; Torczynski, E. 1977. Unusual Pseudomonas corneal ulcers. *American Journal of Ophthalmology*. 84(4), p. 462-466.
3. Chaboute, Marie-Edith; Chaubet, Nicole; Philipps, Gabriel; Ehling, Martine; Gigot, Claude. 1987. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. 8(2), p. 179-191.
4. Funke, Todd; Yang, Yan; Han, Huijong; Healy-Fried, Martha; Olesen, Sanne; Becker, Andreas; Schönbrunn, Ernst. 2009. Structural Basis of Glyphosate Resistance Resulting from the Double Mutation Thr97→Ile and Pro101→Ser in 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*. 284(15), p. 9854-9860.
5. Gruys, K. J.; Walker, M. C.; Sikorski, J. A. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 31(24), p. 5534-5544.
6. Hall, G., Jr.; Allen, G. C.; Loer, D. S.; Thompson, W. F.; Spiker, S. 1991. Nuclear Scaffolds and Scaffold-Attachment Regions in Higher-Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88(20), p. 9320-9324.
7. Herouet-Guicheney, C.; Rouquié, D.; Freyssinet, M.; Currier, T.; Martone, A.; Zhou, J.; Bates, E.E.; Ferullo, J.M.; Hendrickx, K.; Rouan, D. 2009. Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 54(2), p. 143-153.
8. Horowitz, H.; Gilroy, S.; Feinstein, S.; Gilardi, G. 1990. Endocarditis Associated with *Comamonas acidovorans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(1), p. 143-145.
9. ILSI. 2010a. Summary Report for Soybean Forage and Seed “International Life Sciences Institute Crop Composition Database Version 4.2”. [www.cropcomposition.org](http://www.cropcomposition.org), (参照 2011-8-4).
10. Labuda, Ivaca M.; Goers, Steven K.; Keon, Kathleen A. 1994. Bioconversion Process for the Production of Vanillin. United States Patent 5,279,950.
11. Lebrun, M.; Leroux, B.; Sailland, A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. United States Patent 5,510,471.
12. Lebrun, M.; Sailland, A.; Freyssinet, M.; Degryse, E. 2003. Mutated 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene coding for said protein and transformed plants containing said gene. United States Patent 6,566,587.
13. Mizuguti, Aki; Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito. 2009. Flowering phenologies and

- natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management*. 9(1), p.93–96.
14. Nakayama, Yuichiro; Yamaguchi, Hirofumi. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*. 2(1), p. 25–30.
  15. Natarajan, Savithiry; Xu, Chenping; Bae, Hanhong; Bailey, Bryan A. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *Journal of Plant Physiology*. 164(6), p. 756-763.
  16. Norris, S. R.; Meyer, S. E.; Callis, J. 1993. The Intron of *Arabidopsis thaliana* Polyubiquitin Genes Is Conserved in Location and Is A Quantitative Determinant of Chimeric Gene Expression. *Plant Molecular Biology*. 21(5), p. 895-906.
  17. OECD. 1999. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11.
  18. OECD. 2000. Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15.
  19. OECD. 2001. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds.
  20. OECD. 2002. Module II: Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin)-Tolerant Transgenic Plants.
  21. OECD. 2012. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of SOYBEAN [*Glycine max* (L.) Merr]: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients, Toxicants and Allergens.
  22. Raboy, Victor; Dickinson, David B. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Science*. 33(6), p.1300-1305.
  23. Sudesh, K. 2004. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): an emerging biomaterial for tissue engineering and therapeutic applications. *Medical Journal of Malaysia*. 59(Suppl B), p. 55-56.
  24. Toms, A.; Wood, J. M. 1970. The degradation of trans-ferulic acid by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemistry*. 9(2), p. 337-343.
  25. Verdaguer, B.; de Kochko, A.; Beachy, R. N.; Fauquet, C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 31(6), p. 1129-1139.
  26. Wehrmann, Axel; Vliet, Adri Van; Opsomer, Chris; Botterman Johan, Schulz, Arno. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 14(10), p. 1274-1278.
  27. Wen, A.; Fegan, M.; Hayward, C.; Chakraborty, S.; Sly, L. I. 1999. Phylogenetic relationships among members of the Comamonadaceae, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov.

International Journal of Systematic Bacteriology. 49(2), p. 567-576.

28. Wright, Terry R.; Lira, Justin M.; Walsh, Terrance A.; Merlo, Donald J.; Jayakumar, Pon S.; Lin, Gaofeng. 2007. Novel Herbicide Resistance Genes. International Patent WO 2007/053482 A2.
29. 伊藤 博史. 松木 順子. 石橋 晃. 2010. 飼料学(66) - II マメ類 1 大豆- . 畜産の研究. 64(6), p. 650-656.
30. 松木 順子. 伊藤 博史. 熊倉 克元. 石橋 晃. 2010. 飼料学(65) - II マメ類 1 大豆- . 畜産の研究. 64(5), p. 541-546.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Poorbaugh, J. 2011. Molecular Characterization of DAS-44406-6 Soybean. Dow AgroSciences LLC, Study ID:101947, 51p.
2. Zhuang, M. 2012. Supplemental Molecular Characterization of DAS-44406-6 Soybean. Dow AgroSciences LLC, Study ID:120649, 30p.
3. Guttikonda, S. K. 2011. Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-44406-6 Soybean. Dow AgroSciences LLC, Study ID:102117, 4539p.
4. Song, P. 2012. Bioinformatics Analysis of the Insert and its Flanking Border Sequences in Soybean Event DAS-44406-6. Dow AgroSciences LLC, Study ID:120550, 9997p.
5. Lepping, M.D.; Maldonado, P. 2011. Field Expression of a Transformed Soybean Cultivar Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase (AAD-12), Double Mutant Maize EPSPS Gene (2mEPSPS), and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-44406-6. Dow AgroSciences LLC, Study ID:101104.02, 272p.
6. Song, P. 2011. Sequence Similarity Assessment of AAD-12 Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis (Updated February, 2011). Dow AgroSciences LLC, Study ID:110327, 934p.
7. Guttikonda, S. 2011. Similarity Assessment of 2mEPSPS Protein to known Toxins by Bioinformatics Analysis (Update March, 2011). Dow AgroSciences LLC, Study ID:110329, 2101p.
8. Song, P. 2011. Sequence Similarity Assessment of PAT Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110331,
9. Schafer, B. W.; Juba, A. N.; Harpham, N. J.; Mayes, M. R. 2011. Characterization of the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) and double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) proteins derived from transgenic soybean event DAS-44406-6. Dow AgroSciences LLC, Study ID:101707, 168p.
10. Schafer, B. W.; Embrey, S. K. 2008. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12. Dow AgroSciences LLC, Study ID:080064, 23p.
11. Embrey, S. K. 2011. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Double Mutant 5-enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (2mEPSPS) Protein. Dow AgroSciences LLC, Study ID:102106, 23p.
12. Embrey, S.K.; Cruse, J.K.; Korjagin, V.A. 2008. In Vitro Simulated Intestinal Fluid Study

- of Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID:080065, 24p.
13. Embrey, Shawna; LaFavers, Kaice. 2012. In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Double Mutant 5-Enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (2mEPSPS) Protein. Dow AgroSciences LLC, Study ID:102107, 25p.
  14. Schafer, B.W. 2012. Summary of the Effect of Heat Treatment on a Recombinant Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 Protein. Dow AgroSciences LLC, Study ID:120595, 22p.
  15. Embrey, Shawna. 2012. Heat Lability of Double Mutant 5-Enol Pyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase (2mEPSPS) Protein. Dow AgroSciences LLC, Study ID:120596, 25p.
  16. Cicchillo, R. M.; Godbey, J.; Wright, T. R. 2010. Substrate Specificity of Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12). Dow AgroSciences LLC, Study ID:101617, 28p.
  17. Lepping, M. D. 2011. Nutrient Composition of a Transformed Soybean Cultivar Containing Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12), Double Mutant Maize EPSPS Gene (2mEPSPS), and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-44406-6. Dow AgroSciences LLC, Study ID:101104.03, 891p.
  18. Graper, L. K.; Balcer, J. L.; Smith, K. P.; Hogan, P. S. 2011. A nature of the residue Study with [14C]-2,4-D DMA applied to AAD-12 soybeans. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 090051, 191p.
  19. Culligan, John F. 2011. Magnitude of the residue of 2,4-D in/on herbicide tolerant soybeans containing the Aryloxyalkanoate Dioxygenase-12 (AAD-12) gene. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 090053, 337p.
  20. Cleveland, C. B.; Blewett, T. C. 2011. A risk assessment overview of 2,4-D treated soybean containing the DAS AAD-12 trait. Dow AgroSciences LLC, Study ID: 110297, 42p.