

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認 (案)

線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピル
ビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性
ダイズ GMB151

令和 3 年 3 月 17 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.....	3
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項.....	3
5	(1) 遺伝的素材に関する事項.....	3
	(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.....	4
10	3 宿主に関する事項.....	4
	(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.....	4
	(2) 遺伝的先祖に関する事項.....	4
	(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.....	5
	(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項.....	5
	(8) 飼料に利用された歴史に関する事項.....	5
	(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.....	6
25	(3) 薬剤耐性に関する事項.....	6
	(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.....	9
	(4) 性質に関する事項.....	9
35	(5) 純度に関する事項.....	10
	(6) コピー数に関する事項.....	10
	(7) 安定性に関する事項.....	10
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	10
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	10
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.....	11
	6 組換え体に関する事項.....	11
	(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.....	11
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	11
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.....	11
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	12
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	12
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	12
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	13
50	(8) 不活化法に関する事項.....	13
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	13
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	13
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	13
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.....	13
	IV 審議結果.....	13
	V 参考文献及び参考資料.....	14

「線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性 ダイズ GMB151」に係る安全性確認

I はじめに

60 線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性
ダイズ GMB151（以下「GMB151」という。）について、令和 2 年 8 月 25 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。

65

II 確認対象飼料の概要

飼料名：線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除
草剤耐性ダイズ GMB151

70 性 質：ダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対する抵抗性、
4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤へ
の耐性を持つ。

申請者：BASF ジャパン株式会社（日本）

開発者：BASF Agricultural Solutions Seed US LLC（米国）

75 GMB151 は、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の商業品種 Thorne を宿主とし、
cry14Ab-1.b 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子を導入し作成された。

導入された遺伝子により殺線虫活性を示す Cry14Ab-1 たん白質を発現しており、ダ
イズに寄生するダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対する抵抗性を持
つ。また、改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼたん白質（以下、
80 「HPPD-4 たん白質」とする）を発現しており、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオ
キシゲナーゼ（以下、「HPPD」とする。）阻害型除草剤耐性を持つ。

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

85 (1) 遺伝的素材に関する事項

GMB151 の宿主は、マメ科 (Leguminosae)、ダイズ属 (*Glycine*) *Soja* 亜属
に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の商業品種 Thorne である。

90 GMB151 には、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び
Pseudomonas fluorescens 由来の *hppdPf-4Pa* 遺伝子が導入されており、ダイズ
に寄生する線虫であるダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対す
る抵抗性及び HPPD 阻害型除草剤耐性が付与されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

95

ダイズは優れたたん白質の供給源であり、主にその油かすを初めとし、エクストルーダー処理大豆等が、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広く用いられている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

100

GMB151 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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

105

GMB151 は、導入された *cry14Ab-1.b* 遺伝子によりダイズに寄生するダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対する抵抗性が付与されている。また、*hppdPf-4Pa* 遺伝子により、HPPD 阻害型除草剤への耐性が付与されているため、HPPD 阻害型除草剤の使用が可能である。このことを除いては従来のダイズと使用方法に相違はない。

110

(1) ～ (4) により、GMB151 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

115

GMB151 は、Cry14Ab-1 たん白質により、ダイズに寄生するダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対して抵抗性を示すため、当該線虫による被害を抑えることが期待される。

また、HPPD-4 たん白質により、HPPD 阻害型除草剤に抵抗性を持つため、栽培の過程で効率的な雑草防除が可能になる。

3 宿主に関する事項

120

(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

宿主は、マメ科 (Leguminosae)、ダイズ属 (*Glycine*) に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の商業品種 Thorne である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

125

ダイズは一般に中国中北部を原産とする最も古い栽培作物のひとつと考えられている。野生種のツルマメ (*Glycine soja*) と同じ *Soja* 亜属に属しており、ツルマメは、中国、北朝鮮、韓国、日本、台湾、ロシア等に広く自生している。細胞

学的、形態学的、分子生物学的な証拠から、ツルマメはダイズの祖先野生種であると考えられている（OECD, 2000）。

130

（3）有害生理活性物質の生産に関する事項

135

ダイズに含まれる栄養阻害物質及び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、フィチン酸、スタキオース、ラフィノース及びイソフラボン類が知られている（OECD, 2012）。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するため、実際に摂取するダイズ製品中に含まれる量はごくわずかであると考えられる。フィチン酸は、反芻胃動物以外の動物において、ミネラルの吸収を阻害することが知られている。スタキオース及びラフィノースは腹部を膨満させる原因物質である。イソフラボンは、植物エストロゲンの一種であり、哺乳動物に対してエストロゲン、抗エストロゲン及びコレステロール低下や、動物が多量に摂取した場合の生殖への悪影響が知られている。

140

145

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、家畜に対する寄生及び定着性は知られていない。

150

（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

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（ダイズモザイクウイルス病、茎疫病及び紫斑病等）が知られているが（OECD, 2000）、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。

155

（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、雑草性はないと考えられる。

160

（7）有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ダイズは、一年生の自殖性植物である（OECD, 2000）。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が、ダイズは自殖率が高く、さらに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

165 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）。

（8）飼料に利用された歴史に関する事項

170 ダイズは、長い間飼料利用されてきた歴史がある。そのうち大豆油かすは飼料原料として最も多く使用されており、各家畜の飼料に広く使用されている（伊藤ら, 2010; 松木ら, 2010）。

（9）飼料の安全な利用に関する事項

 ダイズは飼料として安全に利用されている。

175 （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、越冬して次の生育期まで生存する可能性は低い（OECD, 2000）。仮に、自生したとしても、物理的あるいは化学的な方法で自生ダイズを防除することができる（OECD, 2000）

180 （11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

 ダイズの近縁種であるツルマメは、ダイズと同様に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、イソフラボン類、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸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

（1）名称及び由来に関する事項

190 GMB151 の作出のために用いられた導入用プラスミド pSZ8832 は、*Escherichia. coli* 由来のプラスミド pGSC1700 を基に作成された。

（2）性質に関する事項

195 pSZ8832 の塩基数は、14361bp であり、pSZ8832 の全塩基配列、制限酵素切断部位及び構成要素の性質は明らかになっている。また、導入用プラスミドの外側骨格領域に存在する全ての構成要素は、その特性が各々明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

（3）薬剤耐性に関する事項

 導入用プラスミド pSZ8832 には、その外側骨格領域にアミノグリコシド系抗生

200 物質耐性を付与するアミノグリコシドアダニル基転移酵素 (*aadA*) 遺伝子が存在する。*aadA* 遺伝子は、プラスミド pSZ8832 を構築する際に選抜マーカーとして用いられた。なお、GMB151 のゲノム中に *aadA* 遺伝子が挿入されていないことを次世代シーケンス (NGS) 解析及びシーケンス解析により確認している。

205 (4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 は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

210 導入用プラスミド pSZ8832 には、*E. coli* に由来する複製開始領域 ORI ColE1 と *Pseudomonas aeruginosa* に由来する複製開始領域 ORI pVS1 が組み込まれている。しかし、これらの領域により導入用プラスミド pSZ8832 が植物や家畜等で複製されることはない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

215 GMB151の作出に用いられた導入用プラスミドpSZ8832は、*E. coli*由来のプラスミドpGSC1700を基に作成した。

(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

220 導入用プラスミド pSZ8832 を用いて、アグロバクテリウム法により従来ダイズ品種 Thorne に導入することにより作出された。

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

225 以下の表に、導入された遺伝子の名称及びその由来を示す。

表 1

遺伝子名	由来	機能
<i>cry14Ab-1.b</i> 遺伝子発現カセット		
T35S	カリフラワーモザイクウイルス	35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列。この配列により <i>cry14Ab-1.b</i> 遺伝子の転写が終結される。
<i>cry14Ab-1.b</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cry14Ab-1 たん白質を発現させる。Cry14Ab-1 たん白質は線虫の消化管内で δ-エンドトキシンとなり、線虫抵抗性を付与する。

Pubi10At	シロイヌナズナ	ユビキチン 10 遺伝子のプロモーター。この配列により <i>cry14Ab-1.b</i> 遺伝子が植物体内で構成的に発現される。
<i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子発現カセット		
T35S	カリフラワーモザイクウイルス	35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列。この配列により <i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子の転写が終結される。
<i>hppdPf-4Pa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	HPPD 遺伝子に 4 箇所のアミノ酸置換を導入した HPPD-4 たん白質をコードする配列。このアミノ酸置換により HPPD 阻害型除草剤への耐性を付与する。
<i>TPotp Y-1Pf</i>	ヒマワリ及びトウモロコシの RuBisCo 小サブユニット遺伝子	輸送ペプチドのコード領域。HPPD-4 たん白質を色素体へ輸送する。
Ltev	Tobacco Etch Virus	ゲノム RNA のリーダー配列で、 <i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子の翻訳効率上げるために導入された。
P2x35S	カリフラワーモザイクウイルス	35S ゲノム RNA を反復して配列させ、機能を強化したプロモーター。この配列により <i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子が植物体内で構成的に発現される。

② 安全性に関する事項

230

・ *cry14Ab-1.b* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は、ヒト及び家畜による直接的な食経験はないが、生物農薬として、穀物、飼料、果実、野菜、繊維作物等に長期にわたり安全に利用されており（OECD, 2007）、ヒト及び家畜等に対する病原体としては知られていない。

235

・ *hppdPf-4Pa* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* は、水中、土壌、植物の根圏に存在するだけでなく、肉や野菜の腐敗物などから単離される等、自然界に広く存在し、ウマ、ニワトリ、ウミガメ、多くの魚類及び無脊椎動物に感染する。しかし、*P. fluorescens* の至適生育温度は 25~30℃であり、これより高い体温を維持する家畜の体内では日和見病原体を越えるほどの病原性を持たない（OECD, 1997）。また、*P. fluorescens* は米国において生物農薬として 1992 年より認可・販売されており、幅広く安全に使用されている。

240

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

宿主への導入は、導入用プラスミド pSZ8832 を用いてアグロバクテリウム法により行った。

245

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

導入された *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子には、それぞれシロイヌナズナ及びカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターが使用されている。

250

② ターミネーターに関する事項

導入された *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子には、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーターが使用されている。

255

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

pSZ8832 のすべての遺伝要素は純化されていて、その塩基配列、由来及び機能は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

260

(4) 性質に関する事項

以下に導入遺伝子の機能を示す。

・ *cry14Ab-1.b* 遺伝子

植物体内で Cry14Ab-1 たん白質を発現させる。Cry14Ab-1 たん白質は、それを摂食したダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類の消化管内で δ-エンドトキシンとなり、中腸上皮の特異的受容体と結合して消化管を壊す。ただし、同じクキセンチュウ目に属するネコブセンチュウ、ナミラセンセンチュウ類及びニセフクロセンチュウには抑制効果を示さなかったことから、Cry14Ab-1 たん白質への感受性が異なることが確認された。さらに、標的としないチョウ目を含む他の主な害虫や病原菌についても、自由生活性線虫(*C. elegans*)を除き活性を示さないことが確認された。

265

270

なお、この特異的受容体は、ダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類のみが持つ受容体で、家畜や鳥類を含む他の哺乳類には存在しないため、Cry14Ab-1 たん白質が他の生物に悪影響を及ぼすことはないと考えられる。さらに、Cry14Ab-1 たん白質は胃液で分解されること、また、飼料となるダイズ油かすでは Cry14Ab-1 たん白質が検出されなかったことから、家畜の腸管内に存在するセンチュウに対しては、影響を与えないと推定された。

275

・ *hppdPf-4Pa* 遺伝子

植物体内で HPPD-4 たん白質を発現させる。HPPD 阻害型除草剤は、植物体の色素の生合成に関与する酵素 (HPPD) の活性を阻害することで、白化症状を

280

経て枯死させる。しかし、*hppdPf-4Pa* 遺伝子により発現する HPPD-4 たん白質は、HPPD たん白質に 4 箇所のアミノ酸置換を導入して作成されており、これにより除草剤との結合親和性が低下しているため、除草剤の阻害を受けずに正常に色素生成を行える。

285

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の塩基配列に目的外の遺伝子が混入していないことを NGS 解析により確認している。

290

(6) コピー数に関する事項

NGS 解析の結果、GMB151 のゲノム中には、導入用プラスミド pSZ8832 の T-DNA 領域が 1 ヲ所に 1 コピー導入されていることが確認された。

295

また、シーケンス解析により GMB151 のゲノム DNA の配列を解析した結果、21bp のベクターの外側骨格領域が含まれていることが確認された。そのためこの 21bp を含めた配列を用いて新たに作られる可能性のある ORF を検出し、毒性たん白質との相同性検索を行ったが、毒性たん白質との一致は認められなかった。さらに、ダイズ内在性の遺伝子への影響を検討したところ、挿入箇所と毒性たん白質の相同性は検出されず、GMB151 と非組換えダイズの間に於いて植物体及び種子の構成成分組成に有意差がないことから、遺伝子導入によりダイズ内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられた。

300

(7) 安定性に関する事項

GMB151 に導入された遺伝子の後代における安定性を確認するため、4 世代から抽出したゲノム DNA を用いて NGS 解析及び JSA 解析を行った。その結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 箇所検出され、かつそれぞれが世代間で一致したことから、導入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。

305

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

310

導入した Cry14Ab-1 たん白質及び HPPD-4 たん白質の発現量を、葉、根、花序、根を除いた植物体、根を含む植物体及び種子を用いて、ELISA により測定した。その結果、Cry14Ab-1 たん白質及び HPPD-4 たん白質は、全ての組織で発現していることが確認された。

315

(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 pSZ8832 の外側骨格領域にはアミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれている。*aadA* 遺伝子は、導入用プラスミド

pSZ8832 を構築する際に選抜マーカーとして用いられた。

なお、GMB151 のゲノム中に *aadA* 遺伝子が挿入されていないことは、NGS 解析により確認されている。

(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

GMB151 に挿入された DNA 配列及びその両近傍配列の接合部において ORF を検索した。その結果 115 個の ORF が確認されたが、これらの ORF において、既知の毒性たん白質の配列との相同性は確認されなかった。

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

GMB151 には、導入された *cry14Ab-1.b* 遺伝子によりダイズに寄生するダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に対する抵抗性が付与されている。また、*hppdPf-4Pa* 遺伝子により HPPD 阻害型除草剤耐性が付与されている。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

導入した Cry14Ab-1 たん白質及び HPPD-4 たん白質が、既知の毒性たん白質と相同性を示すか確認するため、アミノ酸配列に基づき、FASTA アルゴリズム (version35.04) を用いて、たん白質データベース (NCBI, non-redundant protein database, version 2016.0506) 及び毒性たん白質データベース (Bayer toxin database, version 16.1) に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行った。検索の結果、これらのたん白質に関連する毒性は報告されておらず、既知の毒素たん白質との相同性も認められなかった。

(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

挿入遺伝子により発現するたん白質に対し、消化性試験 (人工胃液及び腸液)、加熱処理試験を行った。その結果、Cry14Ab-1 たん白質、HPPD-4 たん白質ともに、37℃の条件下において、人工胃液中で 0.5 分以内にそのほとんどが分解され、55℃以上の熱処理で不安定となり失活することを確認した。また、人工腸液中においては、37℃の条件下で、Cry14Ab-1 たん白質は反応開始から 60 分間で部分的に消化され、HPPD-4 たん白質は反応開始後 10 分以内に完全に消化されることを確認した。

なお、本試験には、*B. thuringiensis* で生産した Cry14Ab-1 たん白質及び *E. coli* で生産した HPPD-4 たん白質を用いた。それぞれ、*B. thuringiensis* 由来の Cry14Ab-1 たん白質と GMB151 で発現している Cry14Ab-1 たん白質との同一性

355 及び、*E. coli* 由来の HPPD-4 たん白質と GMB151 で発現している HPPD-4 たん
白質の同一性については確認済みである。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

360 Cry たん白質は、標的とする昆虫体内で δ -エンドトキシンへと変換され、殺虫
活性を示すたん白質であり、酵素活性を有するとの報告はこれまでないことから、
Cry14Ab-1 たん白質が発現することによって、植物の代謝系に何らかの影響を及
ぼす可能性はないと考えられた。

365 HPPD-4 たん白質は、HPPD 阻害型除草剤によって阻害されるダイズ内在性の
HPPD たん白質に代わり、色素生成に関わる代謝経路の反応を触媒する酵素であ
る。HPPD たん白質の触媒する反応は、植物体内における代謝の律速段階ではな
いことが文献によって報告されており (Mène-Saffrané and Dellapenna, 2010)、
ナタネ、イネ、タバコ及びシロイヌナズナにおいて HPPD たん白質を単独で過剰
発現させてもその代謝産物量はほとんど変化しないことが報告されている
(Tsegaye *et al.*, 2002; Falk *et al.*, 2003; Raclaru *et al.*, 2006; Farré *et al.*,
2012)。実際に、HPPD たん白質が反応を触媒する、代謝経路の上流に位置する
370 化合物の含有量は、GMB151 と宿主品種 Thorne との間に統計学的有意差は認め
られなかった。

375 また、HPPD たん白質の基質である 4-HPP の他に、潜在的な基質が存在する可
能性を文献検索にて検討したところ、4 つが基質候補として示唆された。しかし、
4-HPP に対する反応率に比べ、極めて活性が低く、これらが HPPD たん白質の基
質となる可能性は考えられなかった。

以上のことから、導入された 2 つのたん白質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼ
す可能性は極めて低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

380 GMB151 及び宿主品種 Thorne の種子を用いて、一般成分組成、アミノ酸組成、
脂肪酸組成、ビタミン類及びホモゲンチジン酸組成、無機塩類組成、有害生理活
性物質組成を分析した。その結果、GMB151 と宿主品種 Thorne の間に有意差が
認められたものもあったが、有意差が認められた項目の分析値の平均はいずれも
同条件で栽培した商業品種の許容区間内であったことから、従来品種の変動の範
385 囲内であることが確認された。従って、これらの相違が安全性に影響を与えてい
るとは考え難い。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに実施した圃場試験において、GMB151 と非組換えダイズとの間に、

390 外界における生存及び増殖能力の差異は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

GMB151 と非組換えダイズにおいて、生存・増殖能力の制限要因に関しても変わりはない。

395

(8) 不活化法に関する事項

GMB151 も従来品種のダイズと同様に、物理的防除（耕起）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。

400 (9) 外国における認可等に関する事項

表 2 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
米国	FDA 申請中 (2019 年 2 月)	FDA 申請中 (2019 年 2 月)	USDA 申請中 (2019 年 11 月)
カナダ	CFIA 申請中 (2019 年 5 月)	HC 申請中 (2019 年 5 月)	CFIA 申請中 (2019 年 5 月)
オーストラリア・ ニュージーランド	—	FSANZ 承認 (2020 年 12 月)	—

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

405 GMB151 では雑草防除のために HPPD 阻害型除草剤を使用できる。このことを除いて、栽培方法は従来ダイズと相違ない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

410 従来ダイズと相違ない。なお、GMB151 に挿入された DNA の周辺配列を利用したプライマー及び TaqMan プローブを用いた PCR 法により、GMB151 を特異的に識別する方法を確立している。

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該当しない。

415

IV 審議結果

線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ GMB151 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

関する確認の手續」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題は無いと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. K. Peeters, 2016: Description of Vector pSZ8832 [M-455339-04-1]
2. K. Peeters, 2017: Sequence determination of plasmid pSZ8832 [16-RSVLT117]
3. E. Schilling and L. Windhager, 2018: Molecular characterization of GMB151 soybean by means of next-generation sequencing and junction sequence analysis. [GEN 170607_H]
4. R. Ranjan, 2018: Cry14Ab-1 protein Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins [TXKIS002]
5. R. Ranjan, 2018: HPPD-4 protein Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins [TXFAS015]
6. R. Ranjan, 2018: GMB151 soybean Identification of Open Reading Frames and homology search of sequences ≥ 30 amino acids to known allergens and toxins [TXVLT032]
7. P. Back, 2017: DNA sequence determination of the transgenic and insertion loci of GMB151 soybean [17-RSVLT137-A]
8. K. Peeters, 2018: Bioinformatics analysis of the GMB151 soybean insertion locus [18-RSVLS011]
9. S. Sathischandra, 2018: GMB151 Soybean-Expression of Cry14Ab-1 and HPPD-4 Proteins in Field Samples Grown in the USA during 2016 [M-601077-02-1]
10. N. Vandemarliere, 2018: Characterization of Cry14Ab-1 protein purified from GBM151 soybean and comparability with the bacterially-produced Cry14Ab-1 protein batch 1514_Cry14Ab-1 [M-621885-01-1]

11. N. Vandermarliere, 2018: Characterization of HPPD-4 protein purified from GMB151 soybean and comparability with the bacterially-produced HPPD-4 protein batch 1338_HPPD-4 [17-RSVLN028-A]
12. S. Knight, 2018. Functional characterization of HPPD-4 protein extracted from GMB151 soybean leaf and comparability with the bacterially-produced HPPD-4 protein (batch 1338_HPPD-4). [SEL/6495/3]
13. M. Totis, 2014: Cry14Ab-1 protein *In vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid at pH 1.2 [M-478215-01-1]
14. M. Totis, 2014: Cry14Ab-1 protein *In vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid [M-478845-01-1]
15. H. Serrano, 2015: The Effect of Temperature on Cry14Ab-1 as Assessed by ELISA [M-513656-01-1]
16. H. Serrano, 2016: The Effect of Temperature on Cry14Ab-1 as Assessed by the *Caenorhabditis elegans* Fluorescence Bioassay [M-563741-01-1]
17. M. Totis, 2014: HPPD-4 protein *In vitro* digestibility study in human stimulated gastric fluid at pH 1.2 [M-476249-01-1]
18. M. Totis, 2014: HPPD-4 protein *In vitro* digestibility study in human stimulated intestinal fluid [M-476906-01-1]
19. H. Serrano, 2015: The Effect of Temperature on HPPD-4 as Assessed by ELISA [M-509584-01-1]
20. K. D. Miller, 2015: The Effect of Temperature on HPPD-4, Assessed by the HPPD-4 Quantitative Activity Assay [M-510666-02-1]
21. R. Dreesen, 2015: Literature survey on potential alternative substrates for HPPD. [M-412397-03-1]

22. R. Dreesen, 2018: Substrate specificity of the HPPD-4 protein in comparison to the wild type *Pseudomonas fluorescens* HPPD protein HPPD Pf [17-RSFAS022-E]
23. J. Gottula, N. Gillikin and Y. Yao, 2018: GMB151 Soybean – Composition Assessment of GMB151 Soybean Grown in the USA during 2017. [17-RSSB0044-C]
24. J. Gottula, N. Gillikin and Y. Yao, 2018: GMB151 Soybean – Composition Assessment of Tyrosine Pathway Metabolites in GMB151 Soybean Grown in the USA during 2017. [17-RSSB0044-TPM]
25. D. R. Fischer and E. Jerkins, 2018: Balance Pro (Isoxaflutole) - Magnitude of the Residue in GMB151 Soybeans [NAVLN006]
26. M. Buyse, 2015: End-Point Taqman [M-621353-01-1]
27. Cry14Ab-1 feeding study
28. F. Jia, 2018: Environmental safety assessment of the Cry14Ab-1 protein expressed in event GMB151 soybean [RS18EACRY14]
29. A. Muhamedi, 2016: Cry14Ab-1 protein Acute toxicity study by oral gavage in mice [SA15055]
30. J. Bultman, 2018: GMB151 soybean 90-day toxicity study in the rat by dietary administration [00021233]
31. D. W. Fletcher, 2019: Broiler chicken feeding study with GMB151 soybean meal [TXVLT062]
32. J. Daum, 2018: Five nematode results for GMB151 (Soybean cyst nematode, *Pratylenchus*, Root-knot nematode, Spiral nematode and Reniform nematode).
33. S. Helleboid, 2016: Description of the Cry14Ab-1 protein.

参考文献

1. Adlington, R. M., Baldwin, J. E., Crouch, N. P., Lee, M. H., MacKinnon, C. H. (1996). Identification and stereochemistry of the product of 4-HPPD catalyzed oxidation of the ketoacid of methionine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6: 2003-2006.
2. Allison, RF., Dougherty, WG., Parks, TD., Willis, L., Johnston, RE., Kelly, M., Armstrong, FB. (1985). Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface. *Virology* 147: 309-316.
3. Baldwin, J. E., Crouch, N. P., Fujishima, Y., Lee, M. H., MacKinnon, C. H., Pitt, J. P. N., Willis, A. C. (1995). 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase appears to display α -ketoisocaproate dioxygenase activity in rat liver. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 5: 1255-1260.
4. 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.
5. 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 herbicide. US Patent US 6245968B1 (12-JUN-2001) Aventis CropScience S.A. (FR).
6. 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.
7. Clarke, J. D., Alexander, D. C., Ward, D. P., Ryals, J. A., Mitchell, M. W., Wulff, J. E., Guo, L. (2013). Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. *Scientific Reports* 3 3082 1-6. Supplemental Material: 12.
8. Crouch, N. P., Adlington, R. M., Baldwin, J. E., Lee, M. H., MacKinnon, C. H. (1997). A mechanistic rationalization for the substrate specificity of recombinant

mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD). Tetrahedron 53: 6993-7010.

9. EPA. (2009). *Pseudomonas fluorescens* ; Registration Review Final Decision; Notice of Availability [EPA-HQ-OPP-2007-0567].
10. Falk, J., Andersen, G., Kernebeck, B., Krupinska, K. (2003). Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. FEBS Letters 540: 35-40.
11. 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 research 21: 1093-1097.
12. Fellman, J. H., Fujita, T. S., Roth, E. S. (1972). Substrate specificity of p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase. Biochimica et Biophysica Acta 268: 601-604.
13. 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.
14. Forbes, B. J. R., Hamilton, G. A. (1994). Mechanism and mechanism-based inactivation of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. Bioorganic Chemistry 22: 343-361.
15. Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., Blatt, M. R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. The Plant journal 64: 355-365.
16. Heeb, S., Itoh, Y., Nishijyo, T., Schnider, U., Keel, C, Wade, J., Walsh, U., O'Gara, F., Haas, D. (2000). Small, stable shuttle vectors based on the minimal pVS1 replicon for use in gram-negative, plant-associated bacteria. Molecular plant-microbe interactions 13: 232-237.

17. Hymowitz, T. and F.I. Collins. (1974). Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merr and *G. soja* Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal*, 66: 239-240.
18. Kay, R., Chan, A., Daly, M., McPherson, J. (1987). Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236: 1299-1302.
19. Kovalic, D., Garnaat, C., Guo, L., Yan, Y., Groat, J., Silvanovich, A., Ralston, L., Huang, M., Tian, Q., Christian, A. (2012). The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of crops improved through modern biotechnology. *Plant Genome* 5, 149-163.
20. Lebrun, M., Leroux, B., Sailland, A. (1996). Chimeric gene for the transformation of plants. US Patent US5510471 (23-APRIL-1996) Rhone-Poulenc Agrochimie (FR).
21. Lindblad, B., Lindstedt, G., Lindstedt, S., Rundgren, M. (1977). Purification and some properties of human 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (I). *Journal of Biological Chemistry* 252: 5073-5084.
22. Lindstedt, S., Odelhög, B., Rundgren, M. (1977). Purification and some properties of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. P.J. 874. *Biochemistry* 16: 3369-3377.
23. Mène-Saffrané, L., DellaPenna, D. (2010). Biosynthesis, regulation and functions of tocochromanols in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 301-309.
24. Mizuguti, A., Yoshimura, Y., Matsuo, K. (2009). Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
25. Nakayama, Y. and Yamaguchi, H. (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: 25-30.

26. Natarajan, S., Xu, C., Bae, H and Bailey, B. A. (2007). Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotype. *Plant Physiol* 164: 756-763.
27. OECD. (1997). Consensus document on information used in the assessment of environmental. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, No.6.
28. OECD. (2000). Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.15.
29. OECD. (2007). Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis* – derived insect control proteins. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology, No.42.
30. OECD. (2012). 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, No. 25 Revised.
31. Pallett, K. E., Little, J. P., Sheekey, M., Veerasekaran, P. (1998). The mode of action of isoxaflutole. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 62: 113-124.
32. Porée, F., Laber, B., Lange, G., Dubald, M., Armstrong, R. (2015). HPPD variants and methods of use. Patent application WO/2015/135881, Bayer CropScience LP (US), Bayer CropScience AG (DE).
33. Prisbylla, M. P., Onisko, B. C., Shribbs, J. M., Adams, D. O., Liu, Y., Ellis, M. K., Hawkes, T. R., Mutter, L. C. (1993). The novel mechanism of action of the herbicidal triketones. *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference Weeds* 731.
34. Raboy, V. and D.B. Dickinson. (1993). Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Science*, 33: 1300-1305.
35. Raclaru, M., Gruber, J., Kumar, R., Sadre, R., Lühs, W., Zarhloul, M. K., Friedt,

- W., Frentzen, M., Weier, D. (2006). Increase of the tocochromanol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Molecular Breeding* 18: 93-107.
36. Sanfaçon, H., Brodmann, P., Hohn, T. (1991). A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes & development* 5: 141-149.
37. Tsegaye, Y., Shintani, D. K., DellaPenna, D. (2002). Overexpression of the enzyme p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 913-920.
38. Wei, J., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S., Aroian, R. (2003) *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 100: 2760-2765.
39. Yang, H., Li, Y., Hua, J. (2006). The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 48: 238-248.
40. Zambryski, P. (1988). Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annual review of genetics* 22: 1-30.
41. 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.
42. Zhu, Y. L., Song, Q. J., Hyte, D. L., Van Tassell, C. P., Matukumalli, L. K., Grimm, D. R., Hyatt, S. M., Frickus, E. W., Young, N. D., Cregan, P. B. (2003) Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics* 163, 1123-1134.
43. 伊藤 博史, 松木 順子, 石橋 晃. (2010). 飼料学 (66). 畜産の研究 64: 650-656.
44. 食品安全委員会 (2015). 農薬評価書 イソキサフルトール(第 2 版), p.21-22. (<http://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20141021266>) (閲覧日: 2019 年 10 月 17 日).
45. 日本食品化学研究振興財団. 残留農薬基準値検索システム.

(<http://db.ffcr.or.jp/front/>) (閲覧日：2019 年 10 月 17 日)

46. 農林水産省 (2020a). 飼料月報 (概要) 令和元年度 4 月～3 月.

(http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryō/cyosa/kako.html) (閲覧日：2020 年 8 月 31 日)

47. 農林水産省. (2020b). 農林水産物輸出入概況.

(https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/attach/pdf/houkoku_gaikyou-22.pdf)
(閲覧日：2020 年 8 月 31 日).

48. 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.