

**組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認
(案)**

**除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリル
オキシアルカノエート系及びトリケトン系
耐性ダイズ MON94313 系統**

**令和 6 年 9 月 25 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	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	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.....	12
	(3) 構造に関する事項.....	12
	(4) 性質に関する事項.....	13
35	(5) 純度に関する事項.....	15
	(6) コピー数に関する事項.....	15
	(7) 安定性に関する事項.....	15
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	15
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	16
40	(10) 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.....	16
	6 組換え体に関する事項.....	17
	(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.....	17
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	17
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.....	17
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	19
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	20
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	21
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	21
50	(8) 不活化法に関する事項.....	21
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	21
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	21
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	21
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.....	21
	IV 審議結果.....	22
	V 参考文献及び参考資料.....	22

60 「除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系耐性ダイズ MON94313 系統」に係る安全性確認

I はじめに

65 除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系耐性ダイズ MON94313 系統（以下「MON94313 系統」という。）について、令和5年9月20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 : 除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系耐性ダイズ MON94313 系統
性 質 : 除草剤グルホシネート、除草剤ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤耐性
申請者 : バイエルクロップサイエンス株式会社（日本）
開発者 : バイエルグループ（米国）

70

MON94313 系統は、除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系に対する耐性を付与するために、*pat* 遺伝子、改変 *dmo* 遺伝子、*rdpA* 遺伝子を改変した *ft_t.1* 遺伝子及び *tdo* 遺伝子の4種類の遺伝子を導入したダイズである。

75

導入されたそれぞれの遺伝子により、ホスフィノスリシン N-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。）、ジカンバモノオキシゲナーゼたん白質（以下「改変 DMO たん白質」という。）、二価鉄/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼに属するたん白質（以下「FT_T.1 たん白質」という。）及びトリケトンジオキシゲナーゼたん白質（以下「TDO たん白質」という。）を発現しており、除草剤グルホシネート、除草剤ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤に対する耐性が付与されている。

80

複数の除草剤を様々な組み合わせで使用することにより、ダイズ栽培における雑草管理を効果的に行うことを目的としている。なお、アリルオキシアルカノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤のうち、MON94313 系統の販売の際に適用対象とする除草剤は、それぞれ 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) 及びメソトリオンである。

85

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

90

MON94313 系統の宿主は、マメ科ダイズ属 *Soja* 亜属に属するダイズ *Glycine max* (L.) Merr. の商業品種 A3555 系統である。

MON94313 系統には、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子、*Stenotrophomonas maltophilia* 由来の改変 *dmo* 遺伝子、*Sphingobium*

95 *herbicidovorans* 由来の R-2,4-ジクロロフェノキシプロピオン酸ジオキシゲナーゼ
(*rdpA*) 遺伝子を改変した *ft_t.1* 遺伝子、及びイネ (*Oryza sativa*) 由来の *tdo* 遺
伝子が導入されている。

MON94313 系統を作出する過程で使用する選抜マーカーとして、導入用プラス
ミドの T-DNA II 領域にトランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が存在している。
ただし、R₁ 世代において遺伝的分離により *aadA* 遺伝子を持たない個体を選抜して
100 いるため、MON94313 系統は *aadA* 遺伝子を持たない。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

105 宿主であるダイズは、優れたたん白質の供給源であり、大豆油かす等の形態で、
主に育すう・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

110 MON94313 系統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 (AFSI, 2020、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

115 MON94313 系統は、PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及
び TDO たん白質の発現により、除草剤グルホシネート、除草剤ジカンバ、アリル
オキシアルカノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤に対する耐性を持つため、
これらの除草剤が使用可能である。このことを除いては、MON94313 系統は既存
のダイズと使用方法に相違はない。

以上 (1) ~ (4) により、MON94313 系統の飼料としての安全性評価において
は、既存のダイズとの比較が可能であると判断された。

120

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

125 MON94313 系統は、除草剤グルホシネート、除草剤ジカンバ、アリルオキシアル
カノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤に対する耐性が付与されている。作用機
序の異なる複数の除草剤を様々に組み合わせて使用できることにより、難防除雑草や
除草剤抵抗性雑草のより効果的な管理を可能にする。

なお、アリルオキシアルカノエート系除草剤及びトリケトン系除草剤のうち、販
売の際に適用対象とする除草剤は、それぞれ 2,4-D 及びメソトリオンである。

3 宿主に関する事項

130 (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

MON94313 系統の宿主は、マメ科ダイズ属 *Soja* 亜属に属するダイズ *Glycine*
max (L.) Merr. の商業品種 A3555 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

135 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。ダイズ及びツルマメ (*Glycine soja*) は、Soja 亜属に属している。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おり、細胞学
 的、形態学的、分子生物学的な証拠から、ダイズの祖先野生種であると考えられ
 ている (OECD, 2000)。

140

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

 ダイズ種子に含有される抗栄養素として、トリプシンインヒビター、レクチン、
 フィチン酸、スタキオース及びラフィノースが知られている (OECD, 2012)。

145 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性化し、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、動物の成長を抑制する。ま
 た、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
150 リプシンインヒビター及びレクチンは、十分加熱することによって失活する。フ
 ィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄、亜鉛などとキレート化
 合物を形成し、反芻胃動物以外の動物において、これらの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低分子量の炭水化物
 で、腸内でガスを発生させ腹部を膨満させる原因物質である (OECD, 2012)。

 上記以外にもダイズには生理活性物質であるイソフラボン類が含まれているこ
 とが知られている (OECD, 2012) が、ダイズは長い食経験の中で、これまでに内
155 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、家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

160

(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、紫斑病等) が発生する (OECD, 2000)。しかし、これらの病原体の家畜等
165 に対する病原性は報告されていない。

 なお、組換え体の作出に、これらの外来因子に汚染された宿主を用いることは
 ない。加えて、組換え体の作出においては、培養過程での汚染防止策が確立され
 ており、再生中の植物や幼植物体は無菌的に維持されている。

170

(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 (OECD, 2000)。

(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)。

175 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、しかも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)。

180

(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、きなこ、エクストル
ーダー処理大豆等が挙げられる。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、各家畜等の飼料に広く使用されている (松木ら, 2010)。

185

(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。

190

(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、物理的又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)。

195

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

 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)。

200

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

 MON94313 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMHT529103 は、
205 *Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成された。

(2) 性質に関する事項

 導入用プラスミド PV-GMHT529103 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(参考資料 1)、既知の有害なたん白質
210 を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

 導入用プラスミド PV-GMHT529103 には、ネオマイシン及びカナマイシン耐性
を付与する *nptII* 遺伝子が、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーと

215 して外側骨格領域に存在している。また、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 *aadA* 遺伝子が形質転換後の選抜マーカーとして T-DNA II 領域に存在している。

(4) 伝達性に関する事項

220 導入用プラスミド PV-GMHT529103 には、伝達を可能とする配列は含まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

225 導入用プラスミド PV-GMHT529103 には、pBR322 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* と、pRi に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pRi* 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 PV-GMHT529103 が植物や家畜等で増殖することはできない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON94313 系統中には、これらの領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認されている。

230

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

235 MON94313 系統の作出には、導入用プラスミド PV-GMHT529103 を用いている。本導入用プラスミドは、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成されており、*pat* 遺伝子発現カセット、改変 *dmo* 遺伝子発現カセット、*ft_t.1* 遺伝子発現カセット及び *tdo* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域並びに *aadA* 遺伝子発現カセット及び *splA* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域を有している (参考資料1)。

235

(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

240 MON94313 系統は、導入用プラスミド PV-GMHT529103 を、アグロバクテリウム法により従来ダイズ品種 A3555 系統の分裂組織に導入することにより作出されている。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

245 ① 名称、由来及び分類に関する事項

以下の表 1 及び表 2 に、導入された遺伝子の名称、その由来及び機能を示す。

表 1 導入された主要な遺伝子の名称、供与体の名称及び分類

遺伝子名	供与体の名称及び分類
<i>pat</i> 遺伝子	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (細菌の一種)
改変 <i>dmo</i> 遺伝子	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株 (細菌の一種)
<i>ft_t.1</i> 遺伝子	<i>Sphingobium herbicidovorans</i> (細菌の一種)
<i>tdo</i> 遺伝子	イネ <i>Oryza sativa</i> ジャポニカ亜種

250 表2 MON94313 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来	機能
T-DNA I 領域		
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	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)。
P ² - <i>ubq3-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ポリユビキチン遺伝子 <i>ubq3</i> のプロモーター、リーダー及びイントロンで (Norris et al., 1993)、植物細胞における転写を誘導する。
TS ³ - <i>apg6-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	熱ショックたん白質 (Hsp101) ホモログをコードしている <i>Albino and pale green 6</i> (<i>ApG6</i>) 遺伝子のターゲティング配列。目的たん白質を葉緑体へと輸送する (Myouga et al., 2006)。
CS ⁴ -改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	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。
T ⁵ - <i>sali3-2-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>)	アルミニウム誘導性遺伝子 <i>sali3-2</i> の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: ON111455)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
P- <i>GSP579</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	複数のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列を基に作成されたプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: ON111456) で、植物細胞における転写を誘導する (To et al., 2021)。
I ⁶ - <i>GSI102</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	複数のイントロン配列を基に作成されたイントロン配列 (GenBank Accession: ON111457) で、遺伝子発現の調節に関与する (To et al., 2021)。
CS- <i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	ホスフィノスリシン N-アセチルトランスフェラーゼ (PAT たん白質) 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)。

表2 MON94313 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来	機能
T- <i>Hsp20-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>)	熱ショックたん白質をコードする推定 <i>Hsp20</i> 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 のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
P- <i>ubq10-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	ポリユビキチン遺伝子 <i>ubq10</i> のプロモーター、リーダー及びイントロンで (Norris et al., 1993)、植物細胞における転写を誘導する。
CS- <i>ft_t.1</i>	<i>Sphingobium herbicidovorans</i>	<i>rdpA</i> 遺伝子の改変型から発現する FOPs 及び 2,4-D ジオキシゲナーゼ (FT_T.1) で、ダイズにおいて除草剤 2,4-D に対する耐性を付与する (Larue et al., 2019)。
T- <i>guf-Mt2</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>)	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 のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
P- <i>GSP576</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	複数のプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列を基に作成されたプロモーター及び 5'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: ON111459) で、植物細胞における転写を誘導する (To et al., 2021)。
I- <i>GSI17</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	複数のイントロン配列を基に作成されたイントロン配列 (GenBank Accession: ON111460) で、遺伝子発現の調節に関与する (To et al., 2021)。
CS- <i>TDO</i>	イネ (<i>Oryza sativa</i>)	トリケトンジオキシゲナーゼ (TDO) のコード配列で、除草剤メソトリオンに対する耐性を付与する (Maeda et al., 2019)。
T- <i>GST7</i>	トウモロコシ (<i>Zea mays</i>)	複数の 3'末端非翻訳領域の配列を基に作成された 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: ON111462) で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (To et al., 2021)。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	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)。

表2 MON94313 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来	機能
外側骨格領域 (MON94313 系統には存在しない)		
CS- <i>ble1</i>	トランスポゾン Tn5	ブレオマイシン耐性遺伝子のコード配列の一部 (Mazodier et al., 1985)。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> の トランスポゾン Tn5	ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPT II) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
P- <i>rrn</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	リボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta et al., 2002)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
OR ⁷ - <i>ori</i> - <i>pBR322</i>	プラスミドベクター pBR322	複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
CS- <i>rop</i>	プラスミド ColE1	プライマーたん白質のリプレッサー (Repressor of primer (<i>rop</i>)) のコード配列であり、 <i>E. 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)。
OR- <i>ori-pRi</i>	プラスミド pRi	複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye et al., 2011)。
T-DNA II 領域 (MON94313 系統には存在しない)		
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	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)。
T- <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi	NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアダニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983)。
CS- <i>splA</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) C58 株	スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースフォスフォリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper et al., 1999)。
P- <i>Usp</i>	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>)	種子たん白質をコードする遺伝子の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列 (Baumlein et al., 1991)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。

表2 MON94313 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能
(つづき)

構成要素	由来	機能
T- <i>E9</i>	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>)	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>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域 (Coruzzi et al., 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
<i>aadA</i>	<i>Escherichia coli</i> の トランスポゾン Tn7	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) のコード配列 (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。
TS- <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 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)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
P- <i>EF-1a</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	伸長因子 <i>EF-1a</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に関与する (Axelos et al., 1989)。
E ⁸ - <i>FMV</i>	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA	エンハンサー (Richins et al., 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	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)。

- 1 B-Border (境界配列)
 2 P-Promoter (プロモーター)
 255 3 TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)
 4 CS-Coding Sequence (コード配列)
 5 T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)
 6 I-Intron (イントロン)
 7 OR-Origin of Replication (複製開始領域)
 260 8 E-Enhancer (エンハンサー)

② 安全性に関する事項

265 *pat* 遺伝子の供与体である *Str. viridochromogenes* は環境中に遍在する細菌
であり、この種が属するストレプトマイセス属の細菌は淡水域及び飲料水から
も検出されている (Goodfellow and Williams, 1983)。 *Str. viridochromogenes*
が、ヒトや家畜等に対する病原性等を示すという報告はない。

270 改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *Ste. maltophilia* は環境中に遍在するグラム
陰性細菌であり、土壌及び飲料水から検出されている (Echemendia, 2010;
Brooke, 2012)。 *Ste. maltophilia* は日和見病原菌であるが、健康なヒトからも
検出されており (Heller et al., 2016; Lira et al., 2017)、上記の免疫不全の患者
に対する日和見感染の可能性以外には、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す
報告はない。

275 *Sp. herbicidovorans* は土壌中に遍在するグラム陰性細菌である。この種が属
するスフィンゴビウム属の細菌は、土壌及び淡水から検出されており
(Chaudhary et al., 2017)、トウモロコシ、パパイヤ及びトマトからも検出され
ている (Enya et al., 2007; Rijavec et al., 2007; Thomas et al., 2007)。 *Sp.*
herbicidovorans が、ヒトや家畜等に対する病原性等を示すという報告はない。

280 イネ (*O. sativa*) は食品及び飼料としての長い使用の歴史を有し、世界人口
のおよそ半数以上に主食として供されている重要な作物である。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

285 挿入遺伝子の宿主への導入は、導入用プラスミド PV-GMHT529103 を用い、ア
グロバクテリウム法により行った。まず、従来ダイズ品種 A3555 系統の分裂組織
を、導入用プラスミド PV-GMHT529103 を含む *Rhizobium radiobacter*
(*Agrobacterium tumefaciens*) AB30 株と共存培養することにより、形質転換を
行った。形質転換後、形質転換された細胞の選抜を行い、正常な表現型を示した
再分化個体から、コピー数や連鎖解析により R₀ 個体を選抜した。

290 その後、R₀ 個体を自殖して作出した R₁ 世代において、*splA* 遺伝子の表現型解析
(種皮の委縮) 及び *aadA* 遺伝子の PCR、並びに定量的エンドポイント TaqMan
PCR により、T-DNA II 領域をもたず T-DNA I 領域をホモで有する個体を選抜し
た。こうして得られた R₁ 世代の 1 個体を自殖することで R₂ 世代を作出し、さらに
R₂ 世代の 1 個体を自殖して得られた R₃ 世代を詳細な導入遺伝子解析の対象とした。

295 (3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

T-DNA I 領域

300 *pat* 遺伝子発現カセットは *GSP579* プロモーターが、改変 *dmo* 遺伝子発現カ
セットは *ubq3-At1* プロモーターが、*ft_t.1* 遺伝子発現カセットは *ubq10-At1* プ
ロモーターが、*tdo* 遺伝子発現カセットは *GSP576* プロモーターが使用されて
おり、いずれのプロモーターもシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来
である。

外側骨格領域

305 *nptII* 遺伝子発現カセットは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来の *rrn* プロモーターが使用されている。

T-DNA II 領域

310 *splA* 遺伝子発現カセットはソラマメ (*Vicia faba*) 由来の *Usp* プロモーターが、*aadA* 遺伝子発現カセットはシロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の *EF-1 α* プロモーターが使用されている。

② ターミネーターに関する事項

T-DNA I 領域

315 *pat* 遺伝子発現カセットはタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) 由来の *Hsp20-Mt1* ターミネーターが、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットはタルウマゴヤシ (*M. truncatula*) 由来の *sali3-2-Mt1* ターミネーターが、*ft_t.1* 遺伝子発現カセットはタルウマゴヤシ (*M. truncatula*) 由来の *guf-Mt2* ターミネーターが、*tdo* 遺伝子発現カセットはトウモロコシ (*Zea mays*) 由来の *GST7* ターミネーターが使用されている。

320

T-DNA II 領域

325 *splA* 遺伝子発現カセットは *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) pTi 由来の *nos* ターミネーターが、*aadA* 遺伝子発現カセットはエンドウ (*Pisum sativum*) 由来の *E9* ターミネーターが使用されている。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド PV-GMHT529103 の各構成要素の機能は既に明らかになっており (表 2)、既知の有害塩基配列は含まない。

330

(4) 性質に関する事項

表 1 に示した各遺伝子の機能について、以下に示す。

① *pat* 遺伝子の機能

335 *pat* 遺伝子は、植物体内で PAT たん白質を発現する。PAT たん白質は、アセチルトランスフェラーゼに分類される酵素で、グルホシネートの除草剤成分である L-ホスフィノスリシンの遊離アミノ基をアセチル化し、除草活性のない N-アセチルグルホシネートを生成する。

340 MON94313 系統で発現する PAT たん白質のアミノ酸配列は、プロセッシングにより第一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 たん白質のアミノ酸配列と同一のものである。このたん白質は、分子量 22.4 kDa の 182 アミノ酸からなる一本鎖ポリペプチドである。以下、このたん白質を「PAT たん白質」とする。なお、N 末端のメチオニンの切断は一般的であり、多くのたん白質で起こるものである (Meinzel and Giglione, 2008)。

345

② 改変 *dmo* 遺伝子の機能

改変 *dmo* 遺伝子は、植物体内で改変 DMO たん白質を発現する。改変 DMO たん白質は、除草剤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作用によって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; 3,6-dichlorosalicylic acid) とホルムアルデヒド (HCHO) となる (Chakraborty et al., 2005)。

350

MON94313 系統で発現する改変 DMO たん白質のアミノ酸配列は、野生型 DMO たん白質の N 末端側から 2 番目へのロイシンの挿入を除き、*Ste. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO たん白質 (Herman et al., 2005) と同一である。加えて、野生型 DMO たん白質の結晶構造に基づけば、この差異は DMO たん白質の触媒部位から立体構造的に離れているため (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)、DMO たん白質の基質特異性に影響を及ぼすことは考え難い (Wang et al., 2016)。

355

360

③ *ft_t.1* 遺伝子の機能

ft_t.1 遺伝子は、植物体内で FT_T.1 たん白質を発現する。FT_T.1 たん白質は、 α -ケトグルタル酸及び酸素の存在下で除草剤 2,4-D を除草活性の無い 2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) 及びグリオキシル酸へ分解し、コハク酸及び二酸化炭素を生成する (Larue et al., 2019)。

365

FT_T.1 たん白質は、既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認されているトウモロコシ MON87429 系統で発現する FT_T たん白質を改変したものであり、アリルオキシアルカノエート系除草剤への活性を有する (HRAC, 2022)。FT_T.1 たん白質には、2,4-D に対する酵素活性を向上させる目的で、3 ヶ所のアミノ酸置換が導入されている。なお、MON94313 系統が適用対象とするアリルオキシアルカノエート系除草剤は 2,4-D のみであり、ダイズは、アリルオキシアルカノエート系除草剤のうち除草剤 2,4-D に対しては感受性を示す (Larue et al., 2019) ことから、MON94313 系統は、FT_T.1 たん白質が発現することにより除草剤 2,4-D に対する耐性を新たに獲得している。

370

375

④ *tdo* 遺伝子の機能

tdo 遺伝子は、植物体内で TDO たん白質を発現する。TDO たん白質は、二価鉄/ α -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼの一種で、トリケトン系除草剤を酸化し、コハク酸と酸化物に代謝する (Maeda et al., 2019)。なお、MON94313 系統が適用対象とするトリケトン系除草剤は、メソトリオンのみである。メソトリオンは TDO たん白質によって連続的に 2 段階酸化され、速やかに代謝されることが明らかにされている (Dai et al. 2022)。

380

MON94313 系統に導入された *tdo* 遺伝子配列は、イネの *tdo* 遺伝子配列を基に合成された。また、MON94313 系統で発現する TDO たん白質は、プロセシングにより第一メチオニンが取り除かれている以外、イネ由来の野生型 TDO たん白質と同一のものである。

385

(5) 純度に関する事項

塩基配列解析により、T-DNA I 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している (参考資料 1)。

390

(6) コピー数に関する事項

MON94313 系統中に導入された T-DNA I 領域 (導入遺伝子) の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、並びに導入遺伝子及びその近傍配列を確認するために、次世代シーケンス (NGS) 解析並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した。さらに、MON94313 系統の導入遺伝子挿入部位をダイズのゲノムデータベースと照合し、導入遺伝子がダイズ内在性の既知の遺伝子を破壊していないかどうかを確認した (参考資料 5、参考資料 6)。

395

NGS 解析の結果、MON94313 系統中に導入遺伝子は、核ゲノム中の 1 ヶ所に 1 コピー導入されていることが確認された。また、導入用プラスミド PV-GMHT529103 に由来する非意図的な配列が存在しないことも確認された。

400

導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を行った結果、導入遺伝子及びその近傍配列が決定され、MON94313 系統中の導入遺伝子と導入用プラスミド PV-GMHT529103 の T-DNA I 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることも確認された。また、MON94313 系統の導入遺伝子挿入部位において、連続する 40 bp のダイズゲノム内在性配列の欠失が認められた。

405

近傍配列をダイズのゲノムデータベースの塩基配列と照合した結果、導入遺伝子の挿入によりダイズ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことが示された。

410

(7) 安定性に関する事項

MON94313 系統中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するために、MON94313 系統の種子 (R₃、R₄、R₅、R₆ 及び R₇ の 5 世代) から抽出したゲノム DNA を用いて、NGS 解析を行った。その結果、供試した 5 世代の全てにおいて、導入遺伝子に起因する 2 つの接合領域のみが検出された (参考資料 5)。したがって、MON94313 系統中の導入遺伝子が、複数世代にわたり安定して遺伝していることが示された。

415

また、複数世代にわたる PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質の発現の安定性を確認するため、MON94313 系統の 5 世代 (R₃、R₄、R₅、R₆ 及び R₇ 世代) 並びに対照の非組換えダイズから採取した種子について、ウエスタンブロットを行った。その結果、供試したいずれのたん白質についても全ての世代で検出され、安定して後代で発現していることが確認された (参考資料 7)。

420

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON94313 系統における PAT たん白質、改変 DMO たん白質及び FT_T.1 たん

425

白質の発現量をマルチプレックスイムノアッセイにより、TDO たん白質の発現量を ELISA 法により測定した (参考資料 8)。試験には、2020 年に米国の 5 カ所のほ場から採取した MON94313 系統の組織を供試し、全てのほ場の各反復から地上部、種子、葉及び根を採取した。なお、本試験においては、MON94313 系統に対して、1 葉期から 2 葉期にかけて 0.105 kg a.i./ha の除草剤メソトリオン及び 0.655 kg a.i./ha の除草剤グルホシネートを、4 葉期から 6 葉期にかけて 0.563 kg a.e./ha の除草剤ジカンバ及び 1.066 kg a.e./ha の除草剤 2,4-D を散布した (※)。測定の結果、TDO たん白質の発現量が定量限界であった根を除いて、いずれのたん白質も分析を行った全ての組織において発現が確認された。

435 (※) a.e.: acid equivalent 酸当量

(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 PV-GMHT529103 には、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与するトランスポゾン Tn5 由来の *nptII* 遺伝子が含まれており、クローニングの際の *E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している。また、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トランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が含まれており、形質転換後の選抜マーカーとして T-DNA II 領域に存在している。なお、導入遺伝子の解析の結果、MON94313 系統中に *nptII* 遺伝子及び *aadA* 遺伝子が導入されていないことが確認されている。

(10) 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

MON94313 系統の導入遺伝子と、付加配列を含む 5'及び 3'末端側近傍配列において、6つのフレームに対して終止コドン (TGA、TAG、TAA) から終止コドンまでの配列を検索したところ、連続する 8 アミノ酸以上のオープンリーディングフレーム (ORF) は 8 個確認された (参考資料 9)。この 8 個の ORF について、2つのデータベースを用いて、既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

455 また、MON94313 系統の導入遺伝子において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想定し、2つのデータベースを用いて、6つのフレームに対する既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質との相同性検索を行った (参考資料 10)。その結果、1つのデータベースの検索により、5つのフレームから E-score が 1×10^{-5} 以下で相同性を示す配列が検出された (参考資料 10) が、検出されたアライメントは、いずれも有害な生理活性を呈する可能性を示唆するものではなかった。また、もう 1つのデータベースを用いた相同性検索では、相同性を示す配列は検出されなかった。

465

以上より、MON94313 系統の導入遺伝子及び両末端近傍配列から、ヒトや家畜等に影響のある既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質が産生される可能性は考えにくい。

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

470

MON94313 系統に導入された *pat* 遺伝子、改変 *dmo* 遺伝子、*ft_t.1* 遺伝子及び *tdo* 遺伝子は、それぞれ PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネート耐性、除草剤ジカンバ耐性、アリルオキシアルカノエート系除草剤耐性及びトリケトン系除草剤耐性を付与する。これらの点を除けば、MON94313 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来ダイズと変わらない。

475

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

480

PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質が、既知の毒性たん白質と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか調査するために、TOX_2022 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより E-score が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行った。検索の結果、PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質は、既知の毒性たん白質及びその他のヒトや家畜等に有害なたん白質と構造的に類似性のある配列は共有していなかった（参考資料 2、参考資料 3）。

485

(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

MON94313 系統では、PAT たん白質、改変 DMO たん白質、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質が発現する。

490

このうち、PAT たん白質はこれまでに遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された複数の除草剤グルホシネート耐性作物（トウモロコシ MON87419 系統及び MON87429 系統など）においても存在しており、MON94313 系統で発現する PAT たん白質はこれらの系統で発現する PAT たん白質と同一のアミノ酸配列を有している。したがって、MON94313 系統で発現する PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性は、既に安全性が確認された除草剤グルホシネート耐性作物で発現する PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性と同等であると考えられる。

495

また、改変 DMO たん白質も、これまでに遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された複数の除草剤ジカンバ耐性作物（ダイズ MON87708 系統（官報掲載日 2013 年 10 月 21 日）、ワタ MON88701 系統（同 2015 年 1 月 8 日）、トウモロコシ MON87419 系統（同 2017 年 7 月 27 日）、MON87429 系統（同 2021 年 7 月 19 日）及びナタネ MON94100 系統（同 2022 年 3 月 14 日））においても存在している。MON94313 系統で発現する改変 DMO たん白質は、トウモロコシ MON87429 系統で発現する 2 種類の改変 DMO たん白質のうち 1 種と同一のアミ

500

505 ノ酸配列であり、上記系統で発現するその他の改変 DMO たん白質とも、部分的
510 プロセッシングの結果 N 末端側に付加された輸送ペプチド由来のアミノ酸配列の有
無、又は N 末端側から 2 番目及び 112 番目のアミノ酸配列の違いを除いて、同一
のアミノ酸配列を有している。したがって、MON94313 系統で発現する改変
DMO たん白質の物理化学的処理に対する感受性は、既に安全性が確認された除
草剤ジカンバ耐性作物で発現する改変 DMO たん白質の物理化学的処理に対する
感受性と同等であると考えられる。

以下、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質について検討を行った。

515 MON94313 系統での FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質の発現量は少量であ
り、安全性評価試験に使用できる十分量を精製できない。そのため、MON94313
系統に導入した *ft_t.1* 遺伝子及び *tdo* 遺伝子のコード配列と同じ配列を有する発
現ベクターを用いて *E. coli* で発現させた FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質を
安全性評価試験に供試した。

520 なお、*E. coli* から調製した FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質と、MON94313
系統中で発現する FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質の同等性は、免疫反応性
(ウエスタンブロット)、分子量 (SDS-PAGE)、グリコシル化状態 (N-結合型
糖鎖及び O-結合型糖鎖の検出) 及び機能活性により確認されている (参考資料 11、
参考資料 12)。

① 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

525 *E. coli* から調製した FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質について、それぞれ
人工胃液 (ペプシン、pH1.2) 中での消化性を SDS-PAGE 法及びウエスタンブ
ロット分析により評価した (参考資料 13、参考資料 14)。その結果、完全長の
FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質はいずれも人工胃液中で 0.5 分以内に検出
限界以下まで消化されることが確認された。

530

② 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

535 *E. coli* から調製した FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質について、それぞれ
人工腸液 (パンクレアチン、pH7.5) 中での消化性をウエスタンブロット分析
により評価した (参考資料 13、参考資料 14)。その結果、完全長の FT_T.1 たん
白質及び TDO たん白質はいずれも人工腸液中で 5 分以内に検出限界以下まで
消化されることが確認された。

540 以上の結果から、FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質は、人工胃液及び人工腸
液による酸・アルカリ処理並びに酵素 (ペプシン及びパンクレアチン) 処理に対
する感受性をもつことが示された。

③ 加熱処理

E. coli から調製した FT_T.1 たん白質及び TDO たん白質の加熱処理に対する
熱感受性を、機能活性分析により評価した。その結果、FT_T.1 たん白質の活性

545 は、55°C、30 分間及び 75°C、15 分以上の加熱処理で検出限界以下となり、
TDO たん白質については、55°C、15 分以上の加熱処理で検出限界以下となり、
失活した。

550 以上の結果から、FT_T.1 たん白質は 55°C、30 分以上、TDO たん白質は
55°C、15 分以上の加熱に対して安定ではないことが示された(参考資料 15、参
考資料 16)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① PAT たん白質

555 PAT たん白質は、グルホシネートの除草剤成分である L-ホスフィノスリシ
ンに対して高い基質特異性を有していることが知られており、グルホシネート
及び高濃度のその他 L 体アミノ酸を基質として供試した競合アッセイでは、
PAT たん白質によるグルホシネートのアセチル化の阻害は認められなかった
(Wehrmann et al., 1996)。なお、近年の代謝プロファイリングにおいて、ダイ
ズを含む複数の植物で 2 つのアミノ酸 (アミノアジピン酸及びトリプトファン)
560 の PAT たん白質を介した非特異的なアセチル化が報告されている (Christ et
al., 2017)。しかしながら、これら 2 つのアミノ酸に対する PAT たん白質の活
性は、L-ホスフィノスリシンに対する活性と比べて非常に低いものであり、
PAT たん白質の L-ホスフィノスリシンに対する高い基質特異性が示唆される。

565 以上のことから、PAT たん白質が内在性化合物を代謝して、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る。

② 改変 DMO たん白質

570 DMO たん白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られており、DMO
たん白質の触媒部位のアミノ酸は、ジカンバのカルボキシ基及び塩素原子と相
互作用する。このクロロ基がジカンバの代謝に必須であり (D'Ordine et al.,
2009; Dumitru et al., 2009)、また植物及び他の真核生物において、塩素化合物
の存在は限定的であることが知られていることから (Gribble, 2010)、改変
DMO たん白質が植物の内在性化合物を代謝することは考え難い。実際、植物
575 に存在している化合物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) でも DMO たん白質によって代謝されないことが、除草
剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統の安全性審査において確認されている。

580 さらに、MON94313 系統で発現する改変 DMO たん白質は、既に遺伝子組換
え飼料としての安全性が確認されている遺伝子組換え作物で発現する DMO た
ん白質と高いレベルのアミノ酸配列同一性を有しており、これらの遺伝子組換
え作物で発現する DMO たん白質はいずれも宿主の代謝経路に影響を及ぼすこ
とはないと判断されている。

585 以上のことから、改変 DMO たん白質が内在性化合物を代謝して、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る。

③ FT_T.1 たん白質

MON94313 系統で発現する FT_T.1 たん白質は、遺伝子組換えトウモロコシ MON87429 系統で発現する FT_T たん白質に対して、除草剤 2,4-D に対する活性をさらに向上させる目的で 3 ヶ所のアミノ酸置換が導入されているが、これらのアミノ酸置換は FT_T たん白質と比較した際の FT_T.1 たん白質の基質特異性には影響しない (Larue et al. (2019) の Table 1, p7)。

FT_T たん白質の植物内在性化合物に対する特異性は、トウモロコシ MON87429 系統の安全性審査において精査されている。その中で、既知の基質 (合成オーキシシン系除草剤ジクロロプロップ) との構造的類似性及び FT_T たん白質の活性部位への適合性に基づいた *in silico* スクリーニングにより、潜在的な基質となりうる植物内在性化合物が植物代謝物データベースから選定され、FT_T たん白質はいずれの候補化合物に対しても活性がないことが示されたことから、FT_T たん白質が内在性化合物を代謝して宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと判断されている。

FT_T たん白質と FT_T.1 たん白質のアミノ酸配列がほぼ同一であること、及び両者での除草剤に対する特異性の一致を鑑みれば、FT_T たん白質と同様、FT_T.1 たん白質が内在性化合物を代謝して、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る。

④ TDO たん白質

TDO たん白質の潜在的な基質となりうる植物内在性化合物を探索する目的で、FT_T たん白質に対して用いたものと同様の *in silico* スクリーニングを行った。本スクリーニングにおいては、TDO たん白質の既知の基質であるメソトリオンとの構造的類似性及び TDO たん白質の活性部位へのメソトリオンの予想立体配座を、スクリーニングの基準に利用した。スクリーニングの結果得られた化合物のうち、入手可能な 32 化合物、メソトリオン、及び他の HPPD 阻害型除草剤に対する TDO たん白質の特異性を、生化学的解析により評価した。その結果、TDO たん白質は、潜在的な基質として選定されたいずれの植物内在性化合物に対しても活性を示さず、HPPD 阻害型除草剤のうちトリケトン系除草剤 (メソトリオン、テンボトリオン、スルコトリオン) に対して特異的な活性を示した (参考資料 17)。

したがって、TDO たん白質がトリケトン系除草剤耐性を付与する作用機序及びその特異性は明らかであり、TDO たん白質が内在性化合物を代謝して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る。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON94313 系統及び対照の非組換えダイズの種子及び地上部について、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類並びに抗栄養素及びイソフラボン類の分析を行った (参考資料 18、参考資料 19)。その結果、種子の栄養素及びイソフラボン類の項目に統計学的有意差が認められたものがあつたが、MON94313 系統の平均値はいずれも AFSI データベースに報告されているダイズにおける含有量の範囲内に収まっており、これまで安全に摂取されている従来ダイズの変動

の範囲内であった。これらの相違が安全性に影響を与えているとは考えられない。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

630

これまでに実施したほ場試験において、MON94313 系統と非組換えダイズとの間に、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

635

MON94313 系統と非組換えダイズにおいて、生存及び増殖能力の制限要因に関しても変わりはない。

(8) 不活化法に関する事項

640

MON94313 系統は、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。

(9) 外国における認可等に関する事項

表3 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
カナダ	CFIA 認可 (2023年10月)	HC 認可 (2023年10月)	CFIA 認可 (2023年10月)
米国	FDA 申請中 (2022年9月)	FDA 申請中 (2022年9月)	USDA 評価済 (規制対象外) (2023年11月)
欧州	EFSA 申請中 (2023年9月)	EFSA 申請中 (2023年9月)	—
オーストラリア・ニュージーランド	—	FSANZ 認可 (2024年5月)	—

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

645

MON94313 系統では、生育期に雑草防除のために除草剤グルホシネート、ジカンバ、2,4-D 及びメソトリオンを使用できる。この点を除き、栽培方法は従来ダイズと同様である。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

650

MON94313 系統の種子の製法及び管理方法は従来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該当しない。

655

IV 審議結果

除草剤グルホシネート、ジカンバ、アリルオキシアルカノエート系及びトリケトン系耐性ダイズ MON94313 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ないと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

AFSI. 2020. Crop Composition Database, Version 8.0. Agriculture & Food Systems Institute.
665 <https://www.cropcomposition.org/> [Accessed April 20, 2021].

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.

670 Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.

675 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.

680 Baumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassuner, M. Van Montagu, D. Inze and U. Wobus. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Mol Gen Genet* 225: 459-467.

685 Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. *Nucleic Acids Research Supplement* (2): 91-92.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.

690 Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.

695 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.

- Brooke, J.S. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 25: 2-41.
- 700 Bugg, T.D.H. 2003. Dioxygenase enzymes: catalytic mechanisms and chemical models. *Tetrahedron* 59: 7075-7101.
- Cade, R., K. Burgin, K. Schilling, T.-J. Lee, P. Ngam, N. Devitt and D. Fajardo. 2018. Evaluation of whole genome sequencing and an insertion site characterization method for molecular
705 characterization of GM maize. *Journal of Regulatory Science* 6(1):1-14.
- 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
710 Biophysics* 437: 20-28.
- Chaudhary, D.K., S.-W. Jeong and J. Kim. 2017. *Sphingobium naphthae* sp. nov., with the ability to degrade aliphatic hydrocarbons, isolated from oil-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67: 2986-2993.
- 715 Christ, B., R. Hochstrasser, L. Guyer, R. Francisco, S. Aubry, S. Hörtensteiner and J.-K. Weng. 2017. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene BAR. *Nature Plants* 3: 937-945.
- 720 Clark, S.E. and G.K. Lamppa. 1992. Processing of the precursors for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystem II and photosystem I during import and in an organelle-free assay. *Plant Physiology* 98: 595-601.
- 725 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 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
730 insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
- 735 Dai, S., N. Georgelis, M. Bedair, Y.-J. Hong, Q. Qi, C.T. Larue, B. Sitoula, W. Huang, B. Krebel, M. Shepard, W. Su, K. Kretzmer, J. Dong, T. Slewinski, S. Berger, C. Ellis, A. Jerga and M. Varagona. 2022. Ectopic expression of a rice triketone dioxygenase gene confers mesotrione tolerance in soybean. *Pest Management Science*.

- 740 de Carolis, E. and V. de Luca. 1994. 2-Oxoglutarate-dependent dioxygenase and related enzymes: Biochemical characterization. *Phytochemistry* 36: 1093-1107.
- della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-*enol*pyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.
- 745 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.
- 750 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.
- Echemendia, Y. 2010. Microorganism of the month: *Stenotrophomonas maltophilia*. Environmental Microbiology Laboratory, Inc. <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-07-2007.html> [Accessed August 10, 2010].
- 755 Enya, J., H. Shinohara, S. Yoshida, T. Tsukiboshi, H. Negishi, K. Suyama and S. Tsushima. 2007. Culturable leaf-associated bacteria on tomato plants and their potential as biological control agents. *Microbial Ecology* 53: 524-536.
- 760 FAO/WHO. 2011. Pesticide residues in food 2010: Joint FAO/WHO meeting on pesticide residues. FAO Plant Production and Protection Paper 200. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report10/Dicamba.pdf.
- 765 FAO/WHO. 2014. Pesticide residues in food 2014 - Report 2014 - Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. FAO Plant Production and Protection Paper Series. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy. https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report2014/JMPR_2014_Full_Report.pdf.
- 770 FAO/WHO. 2019. Pesticide residues in food 2019 - Report 2019 - Extra Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy. <https://apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Document/261>.
- 775 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.

780

Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

785

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.

790

Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.

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

795

Hausinger, R.P. 2004. Fe(II)/ α -Ketoglutarate-Dependent Hydroxylases and Related Enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39: 21-68.

800

Heller, D., E.J. Helmerhorst, A.C. Gower, W.L. Siqueira, B.J. Paster and F.G. Oppenheim. 2016. Microbial diversity in the early *in vivo*-formed dental biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 1881-1888.

805

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. *Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.

810

HRAC. 2022. HRAC Mode of Action Classification 2022. https://hracglobal.com/files/HRAC_MOA_Poster_January_6_2022.pdf [Accessed July 28, 2022].

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

815

Hymowitz, T. and F.I. Collins. 1974. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. and Zucc. *Agron. J.* 66: 239-240.

Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene

- 820 encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to
obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
- Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian,
825 A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation
sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization
of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- Kundu, S. 2012. Distribution and prediction of catalytic domains in 2-oxoglutarate dependent
dioxxygenases. *BMC Research Notes* 5: 410.
- 830 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature
Methods* 9: 357-359.
- Larue, C.T., M. Goley, L. Shi, A.G. Evdokimov, O.C. Sparks, C. Ellis, A.M. Wollacott, T.J. Rydel,
835 C.E. Halls, B. Van Scoyoc, X. Fu, J.R. Nageotte, A.M. Adio, M. Zheng, E.J. Sturman, G.S. Garvey
and M.J. Varagona. 2019. Development of enzymes for robust aryloxyphenoxypropionate and
synthetic auxin herbicide tolerance traits in maize and soybean crops. *Pest Management Science*
75: 2086-2094.
- 840 Lira, F., G. Berg and J.L. Martínez. 2017. Double-face meets the bacterial world: The
opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in Microbiology* 8: 2190.
- Maeda, H., K. Murata, N. Sakuma, S. Takei, A. Yamazaki, M.R. Karim, M. Kawata, S. Hirose, M.
Kawagishi-Kobayashi, Y. Taniguchi, S. Suzuki, K. Sekino, M. Ohshima, H. Kato, H. Yoshida and
845 Y. Tozawa. 2019. A rice gene that confers broad-spectrum resistance to β -triketone herbicides.
Science 365: 393-396.
- 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-
850 142.
- Mazodier, P., P. Cossart, E. Giraud and F. Gasser. 1985. Completion of the nucleotide sequence
of the central region of Tn 5 confirms the presence of three resistance genes. *Nucleic Acids
Research* 13: 195-205.
- 855 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
860 modifications. *Proteomics* 8: 626-649.

Mitchell, G., D.W. Bartlett, T.E.M. Fraser, T.R. Hawkes, D.C. Holt, J.K. Townson and R.A. Wichert. 2001. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. *Pest Management Science* 57: 120-128.

865

Mizuguti, A., Y. Yoshimura and K. Matsuo. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.

870

Müller, T.A., T. Fleischmann, J.R. van der Meer and H.-P.E. Kohler. 2006. Purification and characterization of two enantioselective α -ketoglutarate-dependent dioxygenases, RdpA and SdpA, from *Sphingomonas herbicidovorans* MH. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4853-4861.

875

Myouga, F., R. Motohashi, T. Kuromori, N. Nagata and K. Shinozaki. 2006. An Arabidopsis chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response. *The Plant Journal* 48: 249-260.

880

Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 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.

885

Natarajan, S., C. Xu, H. Bae and B.A. Bailey. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *Journal of Plant Physiology* 164: 756-763.

890

Norris, S.R., S.E. Meyer and J. Callis. 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: 895-906.

895

OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

900

OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). ENV/JM/MONO(2000)9. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2001)15. Series on the Safety of

Novel Foods and Feeds No.2. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

905 OECD. 2002. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

910 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. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25.

915 Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.

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.

920

Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.

Rijavec, T., A. Lapanje, M. Dermastia and M. Rupnik. 2007. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 802-808.

925

Robinson, J.T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz and J.P. Mesirov. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29: 24-26.

930

Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.

Salomon, S. and H. Puchta. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. *The EMBO Journal* 17: 6086-6095.

935

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.

940

Thomas, P., S. Kumari, G.K. Swarna and T.K.S. Gowda. 2007. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from in vitro cultures and host-endophyte interaction in vitro and in vivo. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 380-390.

- 945 To, J.P.C., I.W. Davis, M.S. Marengo, A. Shariff, C. Baublite, K. Decker, R.M. Galvão, Z. Gao, O. Haragutchi, J.W. Jung, H. Li, B. O'Brien, A. Sant and T.D. Elich. 2021. Expression Elements Derived From Plant Sequences Provide Effective Gene Expression Regulation and New Opportunities for Plant Biotechnology Traits. *Frontiers in Plant Science* 12.
- 950 U.S. EPA. 2017. 2,4-D Human health risk assessment for registration review. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- 955 Wang, C., K.C. Glenn, C. Kessenich, E. Bell, L.A. Burzio, M.S. Koch, B. Li and A. Silvanovich. 2016. Safety assessment of dicamba mono-oxygenases that confer dicamba tolerance to various crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 81: 171-182.
- 960 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.
- 965 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.
- 970 Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C* 39: 500-504.
- 975 Wohleben, 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.
- 980 Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 20: 773-786.
- 985 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.
- 990 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 養賢堂 64(66): 650-656
- 厚生労働省 2013 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会資料 資料 8-2 (平成 25 年 9 月 24 日開催) <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000024087.html> [Accessed June 20,

2023]

985

厚生労働省 2015 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会資料 資料 5-1 (平成 27 年 4 月 21 日開催) <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi2/0000083695.html> [Accessed June 20, 2023]

990

厚生労働省 2021 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会資料 資料 1-1 (令和 3 年 5 月 18 日開催) https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_18460.html [Accessed June 20, 2023]

995

財務省 2023 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed May 26, 2023]

農林水産省 2023 飼料月報 令和 4 年度 4 月～3 月 農林水産省畜産局飼料課 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/cyosa/attach/pdf/kako-122.pdf [Accessed May 26, 2023]

1000

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 養賢堂 64(65): 541-546

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Sequence of Genetic Elements in PV-GMHT529103
2. Updated Bioinformatics Evaluation of PAT Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0000842)
3. Bioinformatics Evaluation of DMO, FT_T.1, and TDO in MON 94313 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001380)
4. Nature of [14C]-Mesotrione Residues in/on Soybean Raw Agricultural Commodities Following Preemergence and Postemergence Application to Herbicide Tolerant Soybean HT4 (Two labels) (M-780669-01-1)
5. Amended from TRR0001418: Molecular Characterization of Herbicide Tolerant Soybean MON 94313 (M-815764-02-1)
6. Updated Bioinformatics Evaluation of the MON 94313 Insertion Site Utilizing the GMA_2021 Database (TRR0001383)
7. Demonstration of the Presence of DMO, FT_T.1, PAT, and TDO Proteins in Soybean Seed Samples Across Multiple Generations of MON 94313 (TRR0001514)
8. Assessment of DMO, PAT, FT_T.1, and TDO Protein Levels in Herbicide Treated Soybean Forage, Grain, Leaf, and Root Tissues Collected from MON 94313 Produced in United States Field Trials During 2020 (TRR0001494)
9. Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 94313 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001381)
10. Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in MON 94313 Utilizing the AD_2021, TOX_2021, and PRT_2021 Databases (TRR0001382)
11. Characterization of the FT_T.1 Protein Purified from the Soybean Seed of MON 94313 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and Escherichia coli (E. coli)-Produced FT_T.1 Proteins (M-820215-02-1)
12. Characterization of the TDO Protein Purified from Seed of MON 94313 Soybean and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and Escherichia coli (E. coli)-Produced TDO Proteins (TRR0001392)
13. *In vitro* Digestibility of *E. coli*-produced FT_T.1 Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0000874)
14. Amended Report for TRR0001315: *In vitro* Digestibility of *E. coli*-produced TDO Protein by Pepsin and Pancreatin (TRR0001573)
15. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Escherichia coli*-produced FT_T.1 Protein (TRR0001512)
16. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of Escherichia coli (E. coli)-produced TDO Protein (TRR0001400)
17. Substrate Screen of Triketone Dioxygenase (TDO) from *Oryza sativa* (M-817739-01-1)
18. Amended Report for TRR0001366: Compositional Analyses of Soybean Grain and Forage Harvested from MON 94313 Grown in United States During the 2020 Season (TRR0001412)
19. Amended Report for TRR0001368: Analyses of B Vitamins and Minerals of Soybean Grain from MON 94313 Grown in United States in 2020 (TRR0001414)