

## 「除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統」に係る安全性確認

### I はじめに

除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統（以下「MON89788 系統」という。）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」（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 : 除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 系統  
性 質 : 除草剤耐性  
申 請 者 : 日本モンサント株式会社  
開 発 者 : Monsanto Company

MON89788 系統は、除草剤グリホサート存在下でも機能する改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する遺伝子（改変 *cp4 epsps* 遺伝子）を導入したものであり、除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できる性質を付与されている。

一般に、ダイズは主にその油かすが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

宿主に用いた植物は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) である。MON89788 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

##### (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

宿主であるダイズは、飼料分野では主として油かすの形態で利用され、広範囲な家畜等の飼養経験をもつ。その油かすは、主に育すう用、成鶏用、ブロイラー用、養豚用、乳牛用及び肉牛用の配合飼料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

MON89788 系統の種子及び地上部 (forage) の主要構成成分等（たん白質、脂質、酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF)、灰分及び炭水化物) の分析値について、非組換えダイズの分析値等と比較したところ差異は認められなかった。

##### (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON89788 系統と既存のダイズとの相違は、MON89788 系統が改変 CP4 EPSPS たん白質の発現により除草剤グリホサートの影響を受けずに生育できる点のみである。この点を除けば、MON89788 系統は既存のダイズと同じであり、既存種と比較して①収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法、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相違はない。

以上（１）～（４）により、MON89788 系統の飼料としての安全性を評価するために、既存のダイズを比較対照として用いる方法が適用できると判断された。

## ２ 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON 89788 系統は改変 CP4 EPSPS たん白質の発現により除草剤グリホサートに耐性を示し、非選択性の本除草剤を使用することが可能となる。

## 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

宿主はマメ科 *Glycine* 属の *Soja* 亜属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) で、MON89788 系統の作出には A3244 が用いられた。

### （２） 遺伝的先祖に関する事項

*Glycine* 属はアジアとオーストラリアが原産地であり、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分かれる。*Glycine* 亜属は 22 種の多年生野生種で構成される（参考文献 1）。一方、*Soja* 亜属にはダイズの他にその祖先である野生ダイズ [和名: ツルマメ] (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) が含まれる。

### （３） 有害生理活性物質の生産に関する事項

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が知られている。トリプシンインヒビターの働きによってたん白質の分解が妨げられるため、結果として動物の生育に悪影響を及ぼす（参考文献 2）。トリプシンインヒビターはダイズ製品の加工過程で行われる加熱処理によってその大半が不活性化するため、実際に家畜等が摂取するダイズ由来のトリプシンインヒビターの量はごくわずかであると考えられる。ダイズ種子中のトリプシンインヒビターの一般的な含有量は、19.59TIU/mg dwt～118.68TIU/mg dwt である（参考文献 3）。

また、ダイズには細胞膜を構成する糖たん白質や糖脂質の糖の部分に結合することにより、細胞凝集や細胞分裂の誘発などを引き起こすレクチンが含まれている。生で摂取した場合には、動物の生育を妨げ、場合によっては死をもたらすこともある。しかし、トリプシンインヒビター同様、ダイズレクチンの活性も加熱により大きく減少することが知られているため（参考文献 2）、実際に家畜等が摂取するダイズ由来のダイズレクチンの量はごくわずかであると考えられる。ダイズレクチンの一般的な含有量は、0.105 H.U./mg fwt～9.038H.U./mg fwt とされている（参考文献 3）。

なお、上記以外にもダイズにはイソフラボン、スタキオース、ラフィノース、フィチン酸といった抗栄養素と考えられる物質が含まれていることが知られている。

### （４） 寄生性及び定着性に関する事項

ダイズの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

### （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

ダイズには立ち枯れ病 (*Phytophthora* 及び *Pythium*)等の病害が発生するが（参考文献 4）、

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。

(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。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ダイズは一年生の植物であり、北半球では 4 月から 5 月にかけて播種が行われる。その有性生殖周期は、品種や栽培地によっても異なるが、約 100 日～160 日である。

*Soja* 亜属には、栽培ダイズ品種である *G. max* 及び一年生野生種である *G. soja* が属している。*G. soja* は *G. max* との自然交雑が可能である。また、*Soja* 亜属には非公認の種である *G. gracilis* が含まれる（参考文献 1）。これらの種間交雑から稔性のある雑種は簡単に得られる（参考文献 5、6）。

多年生野生種の *Glycine* 亜属は、亜属間交雑が起こりえるが（参考文献 1、7）、*G. max* と多年生野生種の *Glycine* 種との交雑性は極めて低い。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

ダイズミールには約 48%のたん白質と 1.5%以下の脂質が含まれており、高たん白質ミールとして知られている（参考文献 8）。一般的に、ダイズミールは最も費用効率の高いアミノ酸源であるため、動物が必要とする制限アミノ酸を満たすために利用されており、また、トウモロコシたん白質の制限アミノ酸を補足するのに最も適したたん白質源でもある（参考文献 9）。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

上記（8）のとおり、ダイズは飼料として安全に利用されている。なお、トリプシンインヒビターやダイズレクチンのような既知の有害生理活性物質は、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。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

栽培ダイズ品種は、一年生であり、種子によって繁殖する。ダイズ種子に休眠性はなく（参考文献 10）、寒さに弱いため（参考文献 11）、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、物理的あるいは化学的な従来の方法で防除することができる（参考文献 6）。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズの近縁種には、同じ *Soja* 亜属に分類される *G. soja* がある（参考文献 12、13）。*G. soja* ツルマメにはトリプシンインヒビターが存在しているとの報告がある（参考文献 14）。また、フィチン酸やラフィノースといった有害生理活性物質は植物種子に一般的に含まれている物質であることから（参考文献 15、16）、*G. soja* もダイズ同様、これらの有害生理活性物質を含んでいると推定される。

#### 4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON89788 系統の作出にはプラスミド・ベクターPV-GMGOX20 が用いられた。PV-GMGOX20 は、非病原性の *Escherichia coli* あるいは *Agrobacterium tumefaciens* 由来の中間プラスミド及びPCR フラグメントを用いて作成された。

(2) 性質に関する事項

PV-GMGOX20 の全長は 9,664bp である。PV-GMGOX20 に存在する全ての遺伝子は、その由来・機能が明らかになっており、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

PV-GMGOX20 には、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 に由来する *aadA* 遺伝子が存在しているが、この遺伝子は T-DNA 領域外に存在しているため MON 89788 系統中に導入されておらず、また、このことはサザンブロット分析によって確認された。

(4) 伝達性に関する事項

PV-GMGOX20 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

PV-GMGOX20 の T-DNA 領域外には、広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *ori-V* とプラスミド pBR322 に由来する複製開始領域 *ori-PBR322* が組み込まれているが、植物や自然界では増殖することが出来ない。なお、サザンブロット分析により、MON89788 系統中には、これらの配列を含む外骨格領域は導入されていないことが確認された。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

PV-GMGOX20 は、挿入遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子とこの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子が非病原性の *E. coli* あるいは *A. tumefaciens* 由来の中間プラスミドに組み込まれ作成された。

(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

PV-GMGOX20 の T-DNA 領域がアグロバクテリウム法により宿主に導入された。

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

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する *cp4 epsps* 遺伝子をもとに、植物での発現を高めるように遺伝子配列を改変した遺伝子である。なお、CP4 EPSPS たん白質のアミノ酸配列においてN末端配列から 2 番目のセリンがロイシンに置換されている。

② 安全性に関する事項

*Agrobacterium* は、土壌中及び植物の根圏に存在する微生物の一つで、家畜等に対しての病原性は知られていない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

PV-GMGOX20 は、挿入遺伝子である改変 *cp4 epsps* 遺伝子とこの遺伝子の発現に必要な調節遺伝子が非病原性の *E. coli* あるいは *A. tumefaciens* のプラスミドに組み込まれ作成された。宿主への導入はアグロバクテリウム法により行われた。導入後は、グリホサート、カルベニシリン及びクラフォランを含む培地上で形質転換体が選抜された。

(3) 構造に関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ *Tsf1* プロモーター（参考文献 17）に Figwort Mosaic Virus 35S プロモーターのエンハンサー配列（参考文献 18）を結合させた *FMV/Tsf1* プロモーターである。ターミネーターは、エンドウのリブ羅斯-1,5-ニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット *E9* 遺伝子の 3'非翻訳領域（参考文献 19）である *E9* ターミネーターである。

(4) 性質に関する事項

MON89788 系統に導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの各構成要素、由来及び機能を表 1 にまとめた。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

| 構成要素                          | 由来及び機能                                                                                  |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット |                                                                                         |
| <i>FMV/Tsf1</i>               | シロイヌナズナ及び Figwort Mosaic Virus 由来のキメラプロモーター。目的遺伝子を全組織中で恒常的に発現させる。                       |
| <i>L-Tsf1</i>                 | シロイヌナズナ由来の <i>Tsf1</i> 遺伝子の 5'末端非翻訳リーダー配列（参考文献 17）。翻訳の際のリボソーム結合部位である。                   |
| <i>I-Tsf1</i>                 | シロイヌナズナ由来の <i>Tsf1</i> 遺伝子のイントロン配列（参考文献 17）。目的遺伝子の発現を高める。                               |
| <i>CTP2</i>                   | シロイヌナズナ由来の葉緑体輸送ペプチドをコードする配列（参考文献 20）。芳香族アミノ酸の合成が行われる色素体へ CP4 EPSPS たん白質を輸送する。           |
| 改変 <i>cp4 epsps</i>           | <i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の <i>cp4 epsps</i> 遺伝子（参考文献 21、22）。ダイズでの発現を最適化するように改変されている。 |
| <i>E9</i>                     | エンドウ由来のターミネーター。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。                                              |

(5) 純度に関する事項

挿入した遺伝子の塩基配列、大きさ及び由来は明らかであり、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。

(6) 安定性に関する事項

MON89788 系統の後代世代での挿入遺伝子の安定性を確認するため、改変 *cp4 epsps* プローブをハイブリダイズさせることによりサザンブロット分析を行ったところ、改変 *cp4 epsps* 遺伝子が安定していることが確認された。また、MON89788 系統の後代世代での遺伝的安定性を確

認するため、ウェスタンブロット分析を行ったところ、改変 CP4 EPSPS たん白質が安定して発現していることが確認された。

(7) コピー数に関する事項

サザンブロット分析及び PCR 分析の結果から、PV-GMGOX20 の T-DNA 領域がダイズゲノムに 1 コピー挿入されたことが確認された。また、MON89788 系統には PV-GMGOX20 の外骨格配列は存在しないこと、遺伝子挿入部位において 40bp の欠失があること、5'末端及び 3'末端にそれぞれ 10bp と 6bp のゲノムリアレンジメントが存在すること、及び導入遺伝子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。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON89788 系統における改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を ELISA 法により測定したところ、その発現量は、葉  $54 \mu\text{g/g}$  fwt $\sim 90 \mu\text{g/g}$  fwt、種子  $140 \mu\text{g/g}$  fwt $\sim 150 \mu\text{g/g}$  fwt、根  $22 \mu\text{g/g}$  fwt $\sim 32 \mu\text{g/g}$  fwt、地上部  $59 \mu\text{g/g}$  fwt $\sim 73 \mu\text{g/g}$  fwt であった。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

PV-GMGOX20 の T-DNA 領域外には *aadA* 遺伝子（参考文献 23）が存在しているが、この遺伝子は MON89788 系統には存在せず、このことはサザンブロット分析により確認された。

(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

サザンブロット分析及び PCR 分析の結果、MON 89788 系統中には改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む発現ベクター PV-GMGOX20 の T-DNA 領域 1 コピーのみが導入されており、その他の遺伝子断片は導入されていないことが確認されたことから、MON 89788 系統中には目的外のたん白質を発現するオープンリーディングフレームは存在しないと考えられた。

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

MON89788 系統は、改変 CP4 EPSPS たん白質が発現することにより除草剤グリホサートに耐性を示す。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質と既知毒素との構造相同性を確認するため、「毒素」として登録されている既知の毒素から成るデータベース（TOXIN 5）を構築し、FASTA 型アルゴリズムを用いて改変 CP4 EPSPS たん白質のアミノ酸配列との比較を行った。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質と既知毒素との間に構造相同性は認められなかった。

(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

① 人工胃液に対する感受性

*E. coli* で発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質を人工胃液で処理し（参考文献 24）、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行ったところ、試験開始後 15 秒以内で検出限界

(10ng 及び 0.05ng) 以下に消失することが確認された。

② 人工腸液に対する感受性

*E. coli* で発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質を人工腸液で処理し、ウエスタンブロット分析を行ったところ、試験開始後 10 分後に 50%以上の改変 CP4 EPSPS たん白質が分解され、100 分後に検出限界以下に消失することが確認された。

③ 加熱処理に対する感受性

190℃で 30 分間の加熱条件により処理し、ウエスタンブロット分析を行ったところ、改変 CP4 EPSPS たん白質の 99%以上減少していることが確認された。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸 (PEP) 及びシキミ酸-3-リン酸 (S3P) に反応する。PEP と S3P 以外に EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P 類似体であるシキミ酸のみである。EPSPS たん白質とシキミ酸の反応性は、EPSPS たん白質と S3P の反応性のおよそ 200 万分の 1 であることから、シキミ酸が植物体内で EPSPS たん白質と反応することはないと考察された。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON89788 系統、対照の非組換えダイズを用いて、地上部の主要構成成分 (たん白質、脂質、灰分及び水分)、酸性デタージェント繊維 (ADF) 及び中性デタージェント繊維 (NDF) の分析を行った。また、種子中の主要構成成分 (たん白質、脂質、灰分及び水分)、酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF)、アミノ酸、脂肪酸 (C8~C22)、フィチン酸、トリプシンインヒビター、イソフラボン、レクチン、ラフィノース、スタキオース及びビタミン E の分析を行った。なお、炭水化物については、USDA Agriculture Handbook に示されている方法に基づき計算した (%炭水化物=100%-(%たん白質+%脂質+%水分+%灰分))。

その結果、地上部の水分、種子中のイソフラボン (ダイゼイン、グリシテイン) 及びビタミン E において、MON89788 系統と非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたが、その分析値はいずれも商業品種の分析値の範囲内若しくは分析値から計算された許容区間内 (99%T.I.) に収まっていた。なお、脂肪酸 14 成分については、それらの分析値が検出限界以下であり統計学的有意差の確認は行われていない。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

米国等で行われた MON89788 系統のは場試験において、生存・増殖能力に関し非組換えダイズと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

上記 (6) のとおり、MON 89788 系統の生存・増殖能力は非組換えダイズと差異は認められなかったことから、制限要因についても両者の間に変化はないと考えられた。

(8) 不活化法に関する事項

物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の散布）など、ダイズを枯死させる従来の方法によって MON89788 系統は不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

米国食品医薬品局（FDA）より、2007 年 1 月に飼料としての安全性が認可された。

カナダ食品検査庁（CFIA）へ 2006 年 6 月に飼料としての安全性審査の申請が行われた。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準局（FSANZ）へ 2006 年 10 月に飼料としての安全性審査の申請が行われた。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON89788 系統と既存のダイズとの相違は、MON89788 系統が生育期の雑草防除にグリホサートが使用できる点のみであり、栽培方法等は既存のダイズと同じである。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON89788 系統の種子の製法及び管理方法については、既存のダイズと同じである。

- 7 2 から 6 までは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。

#### IV 審議結果

除草剤グリホサート耐性ダイズ MON89788 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続」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

#### V 参考文献

1. Hymowitz, T. 2004. Speciation and cytogenetics. pp97-136. *In Soybeans: Improvement, Production and Uses, Third Edition.* Boerma, H. R., and J. E. Specht(eds.). Agronomy Monograph 16. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
2. Liener, I. E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Rev. in Food Sci. and Nutr.* 34: 31-67.
3. ILSI Soybean Database. 2004. International Life Sciences Institute Crop Composition Database. Version 2.0. Search criteria soybean seed, all locations, all years, all proximates, amino acids, fatty acids, bio-actives, fiber, dry weight other than moisture.  
<http://www.cropcomposition.org>
4. Pederson, P. 2006. Iowa State University Extension.  
<http://www.extension.agron.iastate.edu/soybean/index.html>
5. Dorokhov, D., A. Ignatov, E. Deineko, A. Serjapin, A. Ala, and K. Skryabin. 2004. Potential for gene flow from herbicide resistant GM soybeans to wild soya in the Russian Far East. *In Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives.* Den Nijs, H. C. M., D.

- Bartsch, and J. Sweet(eds.). National Institute of Agricultural Botany (NIAB), Cambridge, U.K.
6. OECD (Organization of Economic Co-operation and Development). 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max*(L.) Merr. (soybean). OECD, ENV/JM/MONO(2000)15.
  7. Hymowitz, T. and R. J. Singh. 1987. Taxonomy and speciation. *In* Soybeans: Improvement, Production, and Uses, 2nd edition. Wilcox, J. R. (ed.). American Society of Agronomy.
  8. SMIC (Soybean Meal Information Center). 2006. Soybean processing fact sheet.  
<http://www.soymeals.org/pdf/processing3.pdf>
  9. Kerley, M. S., and G. L. Allee. 2003. Modifications in soybean seed composition to enhance animal feed use and value: Moving from a dietary ingredient to a functional dietary component. *AgBioForum* 6 (1&2): 14-17.
  10. TeKrony, D. M., D. B. Egli, and G. M. White. 1987. Seed production and technology. pp295-354. *In* Soybeans: Improvement, Production, and Uses; Second Edition. Wilcox, J. R. (ed.). American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin.
  11. Raper, C. D., Jr., and P. J. Kramer. 1987. Stress physiology. pp589-641. *In* Soybeans: Improvement, production, and uses, Second Edition. Wilcox, J. R. (ed.). ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
  12. 農文協 1997 日本の野生植物II 日本原色雑草図鑑 平凡社
  13. 浅野貞夫 1995 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会
  14. Natarajan, S., C. Xu, H. Bae, and B. A. Bailey. 2006. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *J. Plant Physiol.* Article in Press.
  15. Raboy, V., P. Gerbasi, K. Young, S. Stoneberg, S. Pickett, A. Bauman, P. Murthy, W. Sheridan, and D. Ertl. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124: 355-368.
  16. Kuo, T. M., J. F. VanMiddlesworth, and W. J. Wolf. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food Chem.* 36: 32-36.
  17. 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  $\alpha$ : molecular cloning, characterization and expression. *Mol. Gen. Genet.* 291(1-2): 106-112.
  18. Richins, R., H. Scholthof, and R. Shepard. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (Caulimovirus Group). *Nucleic Acids Res.* 15: 8451-8466.
  19. 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. *EMBOJ*3: 1671-1679.
  20. Klee, H. J. and Y. M. Muskopf, and C. S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Mol. Gen. Genet.* 210: 437-442.
  21. Padgett, S. R., D. B. Re, G. F. Barry, D. E. Eichholtz, F. X. Delannay, R. L. Fuchs, G. M. Kishore, and R. T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready gene. pp53-84. *In* Herbicide-resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. S. O. Duke(ed.). CRC Press, New York.

22. Barry, G. F., G. M. Kishore, S. R. Padgett, and W. C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. United State Patent 5, 633, 435.
23. Fling, M., J. Kopf, and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3'(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 13: 7095-7106.
24. Thomas, K., M. Aalbers, G. A. Bannon, M. Bartels, R. J. Dearman, D. J. Esdaile. T. J. Fu, C. M. Glatt, N. Hadfield, C. Hatzos, S. L. Hefle, J. R. Heylings, R. E. Goodman, B. Henry, C. Herouet, M. Holsapple, G. S. Ladics, T. D. Landry, S. C. MacIntosh, S. C., E. A. Rice, L. S. Privalle, H. Y. Steiner, R. Teshima, R. van Ree, M. Woolhiser, J. Zawodny, 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 39: 87-98.