

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統

平成 23 年 5 月 26 日

農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課

目次

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統」に係る安全性確認	3
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
(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
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	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
(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
(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
(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
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
(5) 純度に関する事項	10

（６）安定性に関する事項.....	1 1
（７）コピー数に関する事項.....	1 1
（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
（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 2
（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 2
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 3
（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 4
（５）宿主との差異に関する事項.....	1 4
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	1 5
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	1 5
（８）不活化法に関する事項.....	1 6
（９）外国における認可等に関する事項.....	1 6
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	1 6
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 6
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 6
IV 審議結果.....	1 6
V 提出資料で引用された参考文献.....	1 6

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統」に係る安全性確認

I はじめに

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 ダイズ（以下「MON87701 ダイズ」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 : チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 系統
性 質 : チョウ目害虫抵抗性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

MON87701 ダイズは、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与するために改変 *cry1Ac* 遺伝子を導入したダイズである。改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は、グラム陽性土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki* であり、改変 *cry1Ac* 遺伝子によって産生される改変 Cry1Ac たん白質は、ダイズ栽培で発生するベルベットビーンキャタピラー、ソイビーンルーパー等のチョウ目害虫に特異的に殺虫活性を示す。ダイズの収量は害虫による食害によって影響を受け、食害の程度によっては相当の経済的損失を受けることが知られている。一般的に、ダイズのチョウ目害虫防除には殺虫剤が使用されているが、十分な効果が得られないことがある。MON87701 ダイズは、熱帯及び亜熱帯に属する南米でダイズに深刻な被害を与えるチョウ目害虫の被害を軽減すると同時に、現在チョウ目害虫防除に使用されている殺虫剤の削減を図る目的で作出された。

MON87701 ダイズの作出過程で選抜マーカーとして利用するために、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入したが、遺伝的分離により、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たず、改変 *cry1Ac* 遺伝子のみを持つ個体を選抜したため、MON87701 ダイズには改変 *cp4 epsps* 遺伝子は含まれていない。

既存のダイズを比較対照とした場合、MON87701 ダイズには改変 Cry1Ac たん白質を発現するという差異を有するが、その安全性は確認され、有害生理活性物質であるトリプシンインヒビター及びレクチンを含め、構成成分等その他の事項についての差異は認められなかったことから、MON87701 ダイズがそれを飼料として摂取する家畜の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、一般に、ダイズは大豆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

MON87701 ダイズの宿主植物はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine max* (L.) Merr. の商業品種 A5547 である。

改変 Cry1Ac たん白質をコードする改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体は、グラム陽性

37 土壌細菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* である(参考文献 1)。改変
38 Cry1Ac たん白質と野生型 Cry1Ac たん白質のアミノ酸配列は、7箇所異なること
39 を除き、同一である。また、改変 Cry1Ac たん白質は、平成 15 年に我が国で飼料
40 としての安全性確認がなされているインガードワタ(531 系統)の発現する Cry1Ac
41 たん白質と 100%の相同性を有するが、MON87701 ダイズでは Cry1Ac たん白質
42 の N 末端側に Chloroplast transit peptide 1(CTP1)たん白質由来の 4 アミノ酸が
43 結合している。

44 改変 CP4 EPSPS たん白質をコードする改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体は、
45 *Agrobacterium* sp. CP4 株である。ただし、R₁ 世代において遺伝的分離により改
46 変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体を選抜している。

47 48 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

49 宿主であるダイズは、優れたたん白質の供給源であり、飼料として最も一般的
50 な利用方法は大豆油かすである。主に育すう・成鶏用、ブロイラー用、養豚用、
51 乳牛用及び肉牛用飼料の原料として用いられている(参考文献 2)。

52 53 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

54 MON87701 ダイズ及び非組換えダイズの主要構成成分(たん白質、脂質、灰分、
55 水分、炭水化物、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維) ビタミ
56 ン類、アミノ酸組成及び脂肪酸組成(C8～C22) 及び有害生理活性物質(トリプシ
57 ンインヒビター、レクチン、イソフラボン、スタキオース、ラフィノース及びフ
58 ィチン酸) についての分析値及び文献値が明らかとなっており、それらを比較し
59 た結果、安全性に影響を及ぼす差異は認められなかった(参考文献 3)。

60 61 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

62 MON87701 ダイズに導入されたのは、改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットのみで
63 ある。MON87701 ダイズは改変 Cry1Ac たん白質の発現によりチョウ目害虫に対
64 する抵抗性が付与されている。これらの点を除けば、MON87701 ダイズは既存の
65 ダイズと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜等の摂取(可食)部位、③
66 家畜等の摂取量、④調製及び加工方法について既存のダイズと相違はない。

67
68 以上(1)～(4)により、MON87701 ダイズの飼料としての安全性を評価する
69 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。

70 71 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

72 MON87701 ダイズは、改変 Cry1Ac たん白質の発現によりチョウ目害虫に対して
73 抵抗性を示し、ベルベットビーンキャタピラー、ソイビーンルーパー、ソイビーンア
74 クシルボーラー及びサンフラワールーパーといった南米の大豆栽培における主要なチ
75 ョウ目害虫に対し、効果的な防除を行うことが可能となる。

76 77 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

MON87701 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 A5547 である。

(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を起源とし、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分かれる。*Soja* 亜属にはダイズ(*G.max*)の他に、その野生近縁種であるツルマメ(*G. soja* Sieb. and Zucc.)が存在し、共に一年生である。

(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、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(参考文献 4)。

トリプシンインヒビターは、たん白質の分解を妨害することにより、結果として動物の生育に悪影響を及ぼす。ダイズの加工過程における加熱により不活化され、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の量はごくわずかであると考えられる。(参考文献 5)

レクチンは、細胞膜を構成する糖タンパクや糖脂質の糖と結合することで、細胞の凝集や細胞分裂を引き起こす。レクチンは生で摂取された場合には動物の生育を阻害し、場合によっては死をもたらすこともあるが、トリプシンインヒビター同様、レクチンの活性も加熱により大きく減少することが報告されている。したがって、実際に摂取するダイズ製品に含まれるレクチンの量はごくわずかであると考えられる(参考文献 5)。

(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

ダイズの主要病害として、立ち枯れ病、ダイズシスト線虫及びダイズさび病が知られているが、これらの病原体のヒトや家畜等に対する病原性を示す報告はない(参考文献 6,7,8)。

(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く、MON87701 ダイズもその特性は同様であると考えられた。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ダイズは一年生の種子植物で、高い自家受粉率を示し、通常、他家受粉率は 1%未満となっている(参考文献 9,10)。北半球では 4 月から 5 月にかけて播種が行われる。ダイズ種子は土壌温度が 10℃に達すると発芽し、5~7 日の期間で地上へ出て

くる（参考文献 9）。栄養成長期は約 40 日ほどであり、この時期にも根粒形成は行われているが、完全に機能しているものではない。ダイズは気温が 25~30℃に達すると急速に生育を始める。夏の終わりになると莢の形成が始まり、収穫は秋に行われる。ダイズにおける有性生殖周期は約 100 日~160 日であるが、品種や栽培地によっても異なる(参考文献 11)。

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ツルマメ(*G. soja* Sieb. and Zucc.)が属している。ツルマメは中国、台湾、日本、韓国及びロシアに生息しており、*G. max* との自然交雑が可能である(参考文献 12)。

(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最も一般的な利用方法は大豆油かすである。大豆油かすには約 48%のたん白質と 1.5%以下の脂質が含まれており、高たん白質油かすとして知られている(参考文献 2)。大豆油かすはその栄養成分、供給量、そして価格面での利点のため、補助たん白質源として家畜用飼料に幅広く利用されている。世界中で利用されている油かすの約 3 分の 2 はダイズ由来のものである(参考文献 13)。

(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、レクチン及びフィチン酸等の有害生理活性物質が含まれるが、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、大豆油かすは飼料として安全に使用されている(参考文献 6)。

(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 14)、寒さに弱い(参考文献 15)、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(参考文献 10)。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズと同じ *Soja* 亜属に属する近縁種として、ツルマメ(*G. soja* Sieb. 及び Zucc.)が存在する。ツルマメは日当たりの良い野原や道端のような環境に自生している(参考文献 16,17)。ツルマメにもトリプシンインヒビター(参考文献 18,19,20)、ラフィノースやスタキオース(参考文献 21) 及びフィチン酸(参考文献 22)といったダイズに含まれる有害生理活性物質が含まれている。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON87701 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMIR9 は、中間プラスミド A~F から構成される合成ベクターである(参考文献 23)。この導入用プラスミドに病原性はなく、ヒト及び家畜等に対する有害性は知られていない。

158 (2) 性質に関する事項

159 導入用プラスミド PV-GMIR9 の塩基数は 15,532 bp である。各構成要素の塩基
160 数及び塩基配列は明らかになっている(参考文献 24)。これらの塩基配列及び制限
161 酵素による切断地図は明らかにされている(参考文献 23,24)。既知の有害塩基配列
162 は含まない(参考文献 25)。

164 (3) 薬剤耐性に関する事項

165 導入用プラスミド PV-GMIR9 にはストレプトマイシンに対する耐性を付与する
166 3'(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする *aadA* 遺伝子が含
167 まれており、*E. coli* や *R. radiobacter*(*A. tumefaciens*)中での選択マーカーとして
168 使用された(参考文献 23)。なお、*aadA* 遺伝子が作出された MON87701 ダイズに
169 存在し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(参考文献 26)。

171 (4) 伝達性に関する事項

172 導入用プラスミド PV-GMIR9 は伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性
173 はない(参考文献 23,24)。

175 (5) 宿主依存性に関する事項

176 植物及び家畜等が導入用プラスミド PV-GMIR9 の宿主となることはない。

178 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

179 導入用プラスミド PV-GMIR9 は、改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットからなる T-
180 DNAI 及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNAII を有している。
181 MON87701 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMIR9 は、中間プラ
182 スミドであるベクター A~F を用いて作出されている(参考文献 23)。

184 (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

185 MON87701 ダイズは導入用プラスミド PV-GMIR9 を、アグロバクテリウム法
186 により従来商業ダイズ品種 A5547 に導入することにより作出された。ダイズへの
187 挿入遺伝子領域である改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットを含む T-DNAI 及び改変
188 *cp4epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNAII を初めとする PV-GMIR9 の遺伝
189 子配列はすべて明らかとなっている(参考文献 24)。

191 5 挿入遺伝子に関する事項

192 (1) 供与体に関する事項

193 ① 名称、由来及び分類に関する事項

194 MON87701 ダイズに導入された改変 *cry1Ac* 遺伝子は *B. thuringiensis* ssp.
195 *kurstaki* に由来する(参考文献 27)。

196 また、MON87701 ダイズ作出の過程で選抜マーカーとして使用された *cp4*
197 *epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する(参考文献 28,29)。ただし、

後代世代において従来の育種法を用いた遺伝的分離により *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体を選抜しており、MON87701 ダイズに *cp4 epsps* 遺伝子は含まれない(参考文献 26)。

② 安全性に関する事項

B. thuringiensis ssp. *kurstaki* は土壤中に一般的に存在するグラム陽性細菌であり、米国では 1958 年以来、殺虫活性を示す微生物由来製剤の製造用に商業利用されてきた(参考文献 30)。

Agrobacterium sp. CP4 株は土壤中に一般的に存在する微生物類の一つであり、ヒトや家畜家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

MON87701 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMIR9 は、中間プラスミドであるベクターA~F から構成される合成ベクターである。

導入用プラスミド PV-GMIR9 を、アグロバクテリウム法を用いて従来商業ダイズ品種 A5547 の分裂組織に導入し、分裂組織と導入用プラスミド PV-GMIR9 を含むアグロバクテリウムを共置培養した後、グリホサートを含む選択培地に入れて形質転換されていない細胞を除去し、その後カルベニシリン、セフトキシム及びチカルシリン・クラブラン酸を添加してアグロバクテリウムを除去した。選抜された細胞から植物体を再分化させ、正常な表現型を示す個体を選抜し、生育特性等の評価を行った。

得られた再分化個体(R₀)を自殖させることにより R₁ 世代を作成した。R₁ 世代において、通常の散布量よりも低薬量のグリホサートを散布し、軽度の損傷を受けた個体を T-DNA II を持たない個体として選抜した。その後、サザンブロット分析、ELISA 法、TaqMan PCR 及び分離比の解析により、1 コピーの T-DNA I のみを有する R₁ 個体を選抜した。R₁ 個体から自殖を繰り返して得られた後代を対象にさらに導入遺伝子解析及び形態特性についての評価を行い、MON87701 ダイズを最終的な商品化系統として選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

MON87701 ダイズへ導入された改変 *cry1Ac* 遺伝子は、*RbcS4* プロモーターによりその発現を制御されている。*RbcS4* プロモーターは、*A. thaliana* リブローズ 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット 1A 遺伝子に由来し、植物体地上部で改変 *cry1Ac* 遺伝子の発現を誘導する(参考文献 31)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *FMV* プロモーターによりその発現を制御されている。*FMV* プロモーターは Figwort mosaic virus(FMV)の 35S RNA に由来し、植物細胞内での転写を誘導する(参考文献 32)。

② ターミネーターに関する事項

MON87701 ダイズへ導入された改変 *cry1Ac* 遺伝子のターミネーターは、7S α' 3'ターミネーターである。7S α' 3'ターミネーターは、*G. max* のダイズ 7S 種子貯蔵たん白質遺伝子に由来し、転写を終結させ *CTP1*-改変 *cry1Ac* 転写物のポリアデニル化を誘導する(参考文献 33)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーターは E9 ターミネーターであり、*Pisum sativum* のリブロース-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 *RbcS2* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域に由来し、転写を終結させ CS³-改変 *cp4-epsps* 転写物のポリアデニル化を誘導する(Coruzzi *et al.*, 1984)。

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-GMIR9 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。各構成要素の機能は次項のとおり。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR9 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

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>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット	
P ⁷ - <i>RbcS4</i>	<i>A. thaliana</i> リブロース 1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ小サブユニット 1A 遺伝子に由来し、植物体地上部で改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子の発現を誘導する(参考文献 31)。
TS- <i>CTP1</i>	<i>A. thaliana</i> の <i>RbcS4</i> 遺伝子に由来する輸送ペプチドをコードする配列。改変 <i>Cry1Ac</i> たん白質を葉緑体へ輸送する(参考文献 31)。
CS- 改変 <i>cry1Ac</i>	<i>B. thuringiensis</i> に由来する改変 <i>Cry1Ac</i> たん白質をコードする配列(参考文献 27)。
T-7S α' 3'	<i>G. max</i> のダイズ 7S α' 種子貯蔵たん白質をコードする <i>Sphas1</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する(参考文献 33)。
改変 <i>cp4epsps</i> 遺伝子発現カセット	
P- <i>FMV</i>	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーター。植物細胞内での転写を誘導する(参考文献 32)。
L- <i>ShkG</i>	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)たん白質をコードしている <i>Arabidopsis thaliana</i> の <i>ShkG</i> 遺伝子の 5'末端非翻訳領域。遺伝子発現の調整に関与する(参考文献 34)。

TS-CTP2	<i>A.thaliana</i> の EPSPS たん白質をコードする <i>ShkG</i> 遺伝子に由来する葉緑体輸送ペプチドをコードする配列。目的たん白質を細胞質から葉緑体へと輸送する(参考文献 34)。
CS-改変 <i>cp4-epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS)をコードしている <i>cp4 epsps</i> 遺伝子のコーディング配列(参考文献 28,29)。
T- <i>E9</i>	<i>Pisum sativum</i> のリブロース-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。mRNA の転写を終結させ、mRNA のポリアデニル化を誘導する(参考文献 35)。

① 改変 *cry1Ac* 遺伝子の機能

改変 *cry1Ac* 遺伝子は、*B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* 株に由来し、Bt たん白質の一つである改変 Cry1Ac たん白質を発現することにより特定のチョウ目昆虫に対する抵抗性を有する(参考文献 36)。MON87701 ダイズは、熱帯及び亜熱帯に属する南米でダイズに深刻な被害を与えるチョウ目害虫であるベルベットビーンキャタピラー、ソイビーンアクシルボーラー、サンフラワールーパー、及びソイビーンルーパーなどの標的とするチョウ目害虫をほぼ完全に防除することが確認されている(参考文献 37)。Bt たん白質は、標的とするチョウ目昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合することにより、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成し、その結果として昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示す(参考文献 38,39,40)。

1 (1) に記載したとおり、MON87701 ダイズ中の改変 Cry1Ac たん白質は、野生型の Cry1Ac たん白質のアミノ酸配列と比較して 7 箇所異なっている。また、MON87701 ダイズでは改変 Cry1Ac たん白質の N 末端側に CTP1 由来の 4 アミノ酸が結合している。これはプロテアーゼにより CTP1 が改変 Cry1Ac たん白質から切断される際に改変 Cry1Ac たん白質の N 末端側に残ったものである。

② 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能

除草剤グリホサートは、植物細胞内の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)に結合し、植物の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成を阻害する。その結果植物は、生育に必要な芳香族アミノ酸を生産できずに枯死する(参考文献 41,42)。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって発現する改変 CP4 EPSPS たん白質は、EPSPS と構造的に類似し同一の機能を持つが、除草剤グリホサートとの結合親和性が低いため、除草剤グリホサート存在下においても、芳香族アミノ酸を生産し続けることができる(参考文献 28)。

(5) 純度に関する事項

抗生物質耐性マーカーによる選抜や塩基配列解析により、T-DNA I 及び T-DNA II 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(参考文献 24)。

(6) 安定性に関する事項

5 世代の MON87701 ダイズから得られたゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を行った。その結果、改変 *cry1Ac* 遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝し、MON87701 ダイズには改変 *cp4 epsps* 遺伝子が含まれていないことが確認された(参考文献 26)。また、同様に 5 世代の MON87701 ダイズのウエスタンブロット分析を行った結果、すべての世代から改変 Cry1Ac たん白質が検出された(参考文献 43)。

MON87701 ダイズ中での改変 *cry1Ac* 遺伝子の分離様式及び安定性を確認するために、複数世代にわたってカイ二乗検定による統計解析を行った。その結果から、MON87701 ダイズ中の改変 *cry1Ac* 遺伝子は、ダイズゲノム内の単一遺伝子座に存在し、かつメンデルの法則に従って後代に遺伝していると考えられた(参考文献 44)。

(7) コピー数に関する事項

MON87701 ダイズ中に導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数、導入遺伝子発現カセットの完全性及び外側骨格領域の有無をサザンブロット分析により確認した。その結果、MON87701 ダイズのゲノム中には 1 コピーの改変 *cry1Ac* 遺伝子カセットが導入されており、導入用プラスミド PV-GMIR9 由来の外側骨格領域及び *cp4 epsps* 遺伝子カセットを含む新たな遺伝子は存在しないことが確認された(参考文献 26)。

MON87701 ダイズの導入遺伝子の実際の構成を、PCR 分析及び塩基配列解析により確認した。その結果、MON87701 ダイズには完全な改変 *cry1Ac* 遺伝子発現カセットが導入されていることが確認された(参考文献 26)。

MON87701 ダイズの導入遺伝子の 5'及び 3' 末端近傍配列がダイズゲノム由来であることを、PCR 分析及び塩基配列解析により確認した。非組換えダイズから増幅された PCR 産物と MON87701 ダイズの 5'及び 3'末端近傍配列から増幅された PCR 産物の塩基配列を比較した結果、アグロバクテリウム法による形質転換に伴い挿入部位の 5'側に 32bp の欠損及び 14bp の挿入があったことを除き、挿入遺伝子の近傍配列と宿主のゲノムの塩基配列は一致していた。これらのことから、挿入遺伝子の近傍配列はダイズゲノムに由来することが確認された(参考文献 26,45)。

遺伝子の導入によりダイズゲノム内在性オープンリーディングフレーム(ORF)が破壊されていないこと及び導入遺伝子の近傍配列にダイズゲノム内在性の ORF が含まれていないことを BLASTn 及び BLASTx 解析により確認した。その結果、BLASTn 及び BLASTx いずれにおいても機能が明らかな塩基配列は検出されなかった(参考文献 46)。さらに、導入遺伝子挿入部位を決定し、公表されているダイズゲノムマップと比較した結果、導入遺伝子挿入部位には、ダイズゲノム内在性 ORF は存在しないことが明らかとなった(参考文献 55)。したがって、既知のダイズ内在性遺伝子は T-DNA の導入により破壊されていないと結論された。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON87701 ダイズにおける改変 Cry1Ac たん白質の発現量を ELISA 法により測定した。試験には米国(2007 年)の 5 ヶ所の試験ほ場から収集された葉、種子、根、地上部及び花粉/葯を供試した。その結果、改変 Cry1Ac たん白質の発現量は葉でもっとも高く(340 µg/g DW)、次いで地上部(34 µg/g DW)及び種子(4.7 µg/g DW)であった。根における改変 Cry1Ac たん白質の発現量は検出限界未満であった。生育期間を通じて、葉における改変 Cry1Ac たん白質発現量の平均値の範囲は 220~340 µg/g DW であった(参考文献 47)。

(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-GMIR9 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域の外側に存在している(参考文献 48)。なお、MON87701 ダイズ中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロット分析で確認されている(参考文献 26)。

(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

既知の毒素と相同性のあるたん白質を産生する新規 ORF が形成されていないことを確認するために、MON87701 ダイズの導入遺伝子と近傍配列(400bp)の両境界領域においてストップコドン(TGA、TAG、TAA)を検索し、導入遺伝子から開始、または導入遺伝子で終結する ORF を検索した。その結果、8 アミノ酸以上の ORF が 5'末端側境界配列に 5 個、3'末端側境界配列から 5 個、合計 10 個の ORF が確認された(参考文献 48)。また、5 (7) に記載した、14bp の挿入配列を導入遺伝子の一部と仮定した場合に、この 14bp の挿入配列の 5'末端とダイズゲノムの境界領域における新規 ORF 形成の可能性についても確認を行った。その結果、8 アミノ酸以上の ORF がさらに 2 つ確認された(参考文献 49)。これらの 12 個の ORF について、既知の毒素及び有害な生理活性のあるたん白質とのアミノ酸相同性検索を行った。その結果、相同性を示す配列は検出されなかった。したがって、MON87701 ダイズ中で確認された ORF が仮に翻訳されたとしても、ヒトの健康に影響を与えるとは考えにくい。

また、MON87701 ダイズ中の導入遺伝子領域において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想定し、既知の毒素およびその他の関連する生理活性のあるたん白質との相同性を調べた。その結果、既知の毒素及び生理活性のあるたん白質との相同性を示す配列は検出されなかった(参考文献 50)。

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

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 ダイズに導入されたのは、改変 *cry1Ac*

365 遺伝子発現カセットのみである。MON87701 ダイズは、改変 Cry1Ac たん白質の
366 発現によりチョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。この点を除けば、
367 MON87701 ダイズ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、
368 飼料としての利用方法も従来と変わらない。

369
370 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

371 改変 Cry1Ac たん白質が既知の毒性たん白質と相同性を有するかを確認した結果、
372 既知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の間に構造相同
373 性は認められなかった(参考文献 25)。

374
375 (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

376 植物体内における改変 Cry1Ac たん白質の産生量は極めて微量で、消化性試験
377 に必要な量を得られないため、本試験では *E. coli* で大量発現させた改変 Cry1Ac
378 たん白質を用いて人工胃液(SGF)及び人工腸液(SIF)消化試験を行った。*E. coli* から
379 調製した改変 Cry1Ac たん白質と MON87701 ダイズ中で発現する改変 Cry1Ac
380 たん白質との同等性に関しては、免疫学的反応性(ウェスタンブロット法)、SDS-
381 PAGE 法、グリコシル化状態及び機能活性により確認した(参考文献 51)。

382
383 ① 人工胃液に対する感受性

384 改変 Cry1Ac たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウェス
385 タンブロット分析により評価した。その結果、完全長の改変 Cry1Ac たん白質
386 は、人工胃液中で試験開始から 30 秒以内に検出限界以下まで分解されたことが
387 確認された(参考文献 52)。

388 SDS-PAGE 法において改変 Cry1Ac たん白質の断片(約 4kDa)が検出された。
389 改変 Cry1Ac たん白質を人工胃液中で 2 分間消化した後に、人工腸液中でパン
390 クレアチン消化を行った場合、人工腸液処理後 30 秒で約 4kDa の断片は検出さ
391 れなくなったことから、約 4kDa の断片は人工腸液処理後速やかに(<1 分)分解
392 することが示された(参考文献 53)。

393
394 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

395 改変 Cry1Ac たん白質の人工腸液中での消化性を、ウェスタンブロット分析
396 により評価した。その結果、完全長の改変 Cry1Ac たん白質は、人工腸液中で
397 試験開始から 5 分以内に検出限界以下まで分解されたことが確認された。改変
398 Cry1Ac たん白質はトリプシン耐性コアたん白質(約 55kDa)に変換され、人工腸
399 液による処理時間処理時間を通じて安定であった(参考文献 52)。これらの結果
400 は、既に安全性が確認されているその他の Cry たん白質についての知見と同様
401 である。

402
403 ③ 加熱処理

404 改変 Cry1Ac たん白質の加熱処理感受性を評価するため、MON87701 ダイズ

の種子を供試し、ウェスタンブロット法により試験を行った(参考文献 53)。その結果、改変 Cry1Ac たん白質はダイズの商業的な加熱処理条件(190°C、15 分間)下において、安定でないことが明らかとなった(参考文献 54)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 Cry1Ac たん白質が、なんらかの酵素活性を持つとの報告はない。したがって、ダイズ中での改変 Cry1Ac たん白質の発現により、新しい代謝経路あるいは代謝産物を作ることは考えにくい。さらに、6 (5) に記載のとおり、宿主との差異に関する分析結果からも改変 Cry1Ac たん白質が代謝経路に影響しないことが確認された。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON87701 ダイズと従来のダイズとの差異を評価するため、2007 年に米国の 5 箇所のほ場において栽培した MON87701 ダイズ及び対照の非組換えダイズ品種 A5547 の栽培試験を行い、両者から収穫された種子及び地上部を用いて、主要構成成分、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、有害生理活性物質の分析を行った(参考文献 3)。

①主要構成成分

種子及び地上部の主要構成成分（水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、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)）について分析した結果、統計学的有意差は認められなかった($p < 0.05$ で有意差有り)。

②ビタミン類

種子中のビタミン E について分析した結果、統計学的有意差が認められた(MON87701 ダイズ 7.69 mg/100g DW、非組換えダイズ 6.24 mg/100g DW、 p -値<0.001)ものの、同じほ場で栽培された商業ダイズ品種の分析値から計算された許容区間(1.65 - 8.08 mg/100g DW)の範囲内であった。

③アミノ酸組成

種子中のアミノ酸組成について分析した結果、表 2 に記載した 9 つのアミノ酸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同じほ場で栽培された商業ダイズ品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

表 2 有意差の認められたアミノ酸

アミノ酸	MON87701 系統 平均値 (%DW) *	非組換えダイズ 平均値 (%DW)*	p-値	商業品種 (範囲)
アラニン	1.72	1.69	0.027	1.66 – 1.93
グリシン	1.75	1.70	0.007	1.67 – 1.99
ヒスチジン	1.12	1.08	<0.001	1.04 – 1.24
イソロイシン	1.81	1.76	0.031	1.73 – 2.02

ロイシン	3.04	2.94	0.046	2.93 – 3.32
リシン	2.74	2.62	0.012	2.35 – 3.15
セリン	2.03	1.96	0.004	1.96 – 2.30
スレオニン	1.60	1.55	0.024	1.54 – 1.74
バリン	1.92	1.86	0.040	1.83 – 2.13

*各ほ場 n=3

④脂肪酸組成

種子中の脂肪酸組成について分析した結果、ベヘン酸(22:0)にのみ有意差が認められた(MON87701 ダイズ 0.56%TFA(総脂肪酸)、非組換えダイズ 0.54%TFA、p-値 0.022)ものの、同じほ場で栽培された商業ダイズ品種の分析値から計算された許容区間(0.30 – 0.67 %TFA)範囲内であった。

⑤有害生理活性物質

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およびイソフラボン(ダイゼイン、グリシテイン及びゲニステイン)、について分析した結果、表 3 に記載した 2 つの成分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同じほ場で栽培された商業ダイズ品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

表 3 有意差の認められた有害生理活性物質

有害生理 活性物質	MON87701 系統 平均値*	非組換えダイズ 平均値*	p-値	商業品種 (範囲)
トリプシンイン ヒビター	26.06 % DW	28.57 %DW	0.014	20.84 – 37.24
ダイゼイン	667.54 mg/kg DW	604.88 mg/kg DW	0.040	213.98 – 1273.94

*各ほ場 n=3

以上の分析結果から、MON87701 ダイズの主要構成成分、ビタミン類、アミノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質は、対照の非組換えダイズあるいは従来のダイズと同程度であると考えられた。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

2001 年以来、MON87701 ダイズのほ場試験は米国を中心として延べ 200 箇所以上で行われているが、MON87701 ダイズの生存及び増殖能力は対照の非組換え品種と同等であることが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

6 (6) に記載のとおり、MON87701 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。

(8) 不活化法に関する事項

MON87701 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。

(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 2010 年 8 月に食品・飼料としての安全性が確認された。

カナダ食品検査庁(CFIA)より 2010 年 10 月に飼料・環境に対する安全性が確認された。

オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)より 2010 年 9 月に食品としての安全性が確認された。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON87701 ダイズと従来のだいずの違いは、MON87701 ダイズがチョウ目昆虫に対する抵抗性を持っているという点のみである。したがって、MON87701 ダイズは、チョウ目昆虫に対して従来よりも効果的な防除法を提供するが、それ以外に MON87701 ダイズと従来のだいずの栽培方法における差はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON87701 ダイズの種子の製法及び管理方法は、従来のだいず品種と同じである。

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

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87701 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、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 提出資料で引用された参考文献

- 1 Adang, M.J., M.J. Staver, T.A. Rocheleau, J. Leighton, R.F. Barker, and D.V. Thompson. 1985. Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*. *Gene* 36:289-300.
- 2 SMIC (Soybean Meal Information Center). 2006. Soybean processing fact sheet. <http://www.soymeal.org/pdf/processing3.pdf> [Accessed: May 3, 2006]
- 3 Compositional Analyses of Forage and Seed Collected from MON 87701 Grown in United States during 2007 : MSL-0021413(社外秘)

- 4 OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients. OECD ENV/JM/MONO(2001)15.
- 5 Liener, I.E. 1994. Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34:31-67.
- 6 Pedersen, P. 2006. Iowa State University Extension. <http://www.extension.agron.iastate.edu/soybean/index.html> [Accessed February 20, 2006.]
- 7 Faghihi, J., and V.R. Ferris. 2006. Soybean Cyst nematode. in E-210-W, Purdue University. Department of Entomology, Editor: West Lafayette, Indiana.
- 8 University of Illinois. 2006. Illinois Soybean Rust. University of Illinois Extension, Champaign, Illinois. <http://www.soyrust.cropsci.uiuc.edu> [Accessed March 20, 2006].
- 9 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) 9.
- 10 Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6:211-212.
- 11 Beversdorf, W. 1993. Soybean. Pages 17-26 in *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role on Modern Biotechnology*. OECD, Paris.
- 12 Hymowitz, T., 2004. Speciation and Cytogenetics. Pages 97-136 in *Soybeans: improvement, production, and uses*, 3rd edn., H.R. Boerma and J.E. Specht, (eds.) American Society of Agronomy, CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin.
- 13 Soy Stats 2008. American Soybean Association, St. Louis, Missouri.
- 14 TeKrony, D.M., D.B. Egli, and G.M. White. 1987. Seed Production and Technology. Pages 295-354 in *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*; 2nd edn., J.R. Wilcox, (ed.). American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin.
- 15 Raper Jr., C.D., and P.J. Kramer. 1987. Stress physiology. Pages 589–641. In *Soybeans: Improvement, production, and uses*, 2nd Edition. J.R. Wilcox, (ed.). American Society of Agronomy, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
- 16 日本の野生植物 II 日本原色雑草図鑑 1982, 平凡社
- 17 浅野貞夫 1995 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会
- 18 Mies, D.W. and T. Hymowitz. 1973. Comparative Electrophoretic Studies of Trypsin Inhibitors of Seed of the Genus *Glycine*. *Botanical Gazette* 134: 121-125
- 19 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.
- 20 Wang, K.J., Y. Takahata, Y. Kono, and N. Kaizuma. 2008 Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). *Theoretical and Applied Genetics* 117: 565-573.
- 21 Hymowitz, T., and F.I Collins. 1974. Variability of Sugar Content in Seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal* 66: 239–240.
- 22 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

- 23 Plasmid lineage of PV-GMIR9(社外秘)
- 24 Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR9 : RAR-08-379 (社外秘)
- 25 Bioinformatics Evaluation of the Cry1Ac Protein Present in MON 87701 Soybean Utilizing the AD8, TOXIN6, and PROTEIN Databases : MSL-0021658(社外秘)
- 26 Amended Report for MSL0022176: Molecular Analysis of Insect-Protected Soybean MON 87701 : MSL-0022327(社外秘)
- 27 Fischhoff, D.A., and F.J. Perlak. 1996. Synthetic plant genes. U.S. Patent 5,500,365
- 28 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore, and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 54-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York.
- 29 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett, and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. U.S. Patent 5,633,435. <http://www.patentstorm.us/patents/7214535.html> [Accessed May 25, 2010].
- 30 EPA, U.S. 1988. Guidance for the Reregistration of Pesticide Products Containing *Bacillus thuringiensis* as the Active Ingredient. U.S. Environmental Protection Agency. NTIS PB 89-164198.
- 31 Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore, and M.P. Timko. 1988. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 11:745-759.
- 32 Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. U.S. Patent Number 6,018,100.
- 33 Schuler, M.A., E.S. Schmitt, and R.N. Beachy. 1982. Closely related families of genes code for the α and α' subunits of the soybean 7S storage protein complex. Nucleic Acids Research 10:8225-8244.
- 34 Klee, H.J., Y.M. Muskopf, and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Molecular General Genetics. 210:437-442.
- 35 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.
- 36 Cry1Ac Insecticidal Activity Spectrum (社外秘)
- 37 Trait Efficacy (社外秘)
- 38 Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Höfte, J. Van Rie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins is correlated with the presence of high-affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 85:7844-7848.
- 39 Slaney, A.C., H.L. Robbins, and L. English. 1992. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* toxin CryIIIA: An analysis of toxicity in *Leptinotarsa decemlineata* (Say) and *Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber. Insect Biochemistry and Molecular Biology 22:9-18.

- 40 Van Rie, J., S. Jansens, H. Hofte, D. Degheele, and H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the Brush Border Membrane of the Insect Midgut as Determinants of the Specificity of *Bacillus thuringiensis* Delta-Endotoxins. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1378-1385.
- 41 Steinrücken H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5'-enolpyruvyl-shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94: 1207-1212.
- 42 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Page 1-50. In *Shikimic acid: metabolism and metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., West Sussex, England.
- 43 Western Blot Analysis of Cry1Ac Protein in MON 87701 Soybean Leaf across Multiple Generations in Support of a Japan Stage III Application : MSL-0021419(社外秘)
- 44 Heritability and Stability of Genes Present in Insect-Protected Soybean MON 87701 across Multiple Generations(RPN-08-438) (社外秘)
- 45 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.
- 46 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87701: BLASTx and BLASTn Analyses : MSL-0022000(社外秘)
- 47 Amended Report for MSL0021531: Assessment of the Cry1Ac Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87701 Produced in U.S. Field Trials During 2007 : MSL-0022409(社外秘)
- 48 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of the Inserted DNA in MON 87701: Assessment of Putative Polypeptides : MSL-0021816(社外秘)
- 49 Additional study: Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' Junctions of the Inserted DNA in MON 87701: Assessment of Putative Polypeptides (社外秘)
- 50 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87701 : MSL-0021937(社外秘)
- 51 Characterization of the Cry1Ac Protein Purified from the Harvested Seed of MON 87701 Soybean and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the MON 87701-Produced and *E. coli*-Produced Cry1Ac Proteins : MSL-0021146(社外秘)
- 52 Assessment of the *In Vitro* Digestibility of the Cry1Ac Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids : MSL-0021376(社外秘)
- 53 Coward, L., M. Smith, M. Kirk, and S. Barnes. 1998. Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1486S-1491S.
- 54 Immunodetection of Cry1Ac Protein in MON 87701 Ground Seed Following Heat Treatment : MSL-0021374(社外秘)
- 55 Phytozome (<http://www.phytozome.net>)