

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ
BPS-CV127-9

平成24年12月11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	5
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	5
	(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
	(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
15	(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	5
	(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	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	7
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	7
	(4) 伝達性に関する事項	7
	(5) 宿主依存性に関する事項	7
	(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	7
	(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	7
30	5 挿入遺伝子に関する事項	7

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

「イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ BPS-CV127-9」に係る安全性確認

I はじめに

60 イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ BPS-CV127-9（以下「CV127 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 : イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ BPS-CV127-9
性質 : イミダゾリノン系除草剤耐性
申請者 : BASF ジャパン株式会社
開発者 : BASF プラントサイエンス社
ブラジル農業畜産研究公社

65 CV127 ダイズは、イミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与するために改変 *AHAS(m)* 遺伝子（以下「*csr1-2(m)* 遺伝子」という。）が導入されたダイズである。*csr1-2(m)* 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に由来し、改変アセトヒドロキシ酸合成酵素（以下「改変 *AHAS(m)* たん白質」という。）を発現する。

70 イミダゾリノン系除草剤は、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）の生合成を触媒するアセトヒドロキシ酸合成酵素（以下「*AHAS* たん白質」という。）の酵素活性を阻害することにより植物体の生長を阻害するが、改変 *AHAS(m)* たん白質はイミダゾリノン系除草剤の阻害を受けないため、改変 *AHAS(m)* たん白質を発現する CV127 ダイズはイミダゾリノン系除草剤を散布されても生長することができる。

75 また、CV127 ダイズに挿入された DNA 断片には、*csr1-2(m)* 遺伝子とともに、*AtSEC61γ* 遺伝子が含まれている。*AtSEC61γ* 遺伝子は、既存のダイズにも存在する遺伝子であり、たん白質の輸送に重要な役割をもつ *AtSEC61γ* サブユニットたん白質（以下「*AtSEC61γ* たん白質」という。）を発現する。

抗生物質耐性マーカー遺伝子は CV127 ダイズには含まれていない。

80 CV127 ダイズと既存のダイズとを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そこで、遺伝子組換え操作により付与された性質について安全性を評価したところ、飼料としての安全上の問題となる点は認められなかった。したがって、CV127 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、ダイズは主に大豆油かすの形態で飼料として使用されている。

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 CV127 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 Conquista である。

改変 *AHAS(m)* たん白質をコードする *csr1-2(m)* 遺伝子は、イミダゾリノン系除

95 草剤に耐性を獲得したシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 変異体に由来する。
野生型の AHAS たん白質をコードする *AHAS* 遺伝子と比較して、*csr1-2(m)* 遺伝
子は 2 箇所塩基が変異しており、その結果としてアミノ酸配列が 2 箇所異な
100 っている。1 箇所のアミノ酸変異は、イミダゾリノン系除草剤に対し耐性を有するシ
ロイヌナズナ変異体から分離した遺伝子に生じていたものであり、もう 1 箇所の
アミノ酸変異は、DNA 断片 LF-6.2PvuII をダイズに導入した際に生じたものであ
る。以上のことから、本文では、シロイヌナズナから分離された 1 アミノ酸変異
のみを有する改変 *AHAS* 遺伝子を *csr1-2* 遺伝子、CV127 ダイズゲノム導入後の 2
アミノ酸変異を有する改変 *AHAS* 遺伝子を *csr1-2(m)* 遺伝子としている。

また、CV127 ダイズに導入された、シロイヌナズナ変異体から分離した DNA
断片には、*csr1-2* 遺伝子とともに、AtSEC61y たん白質をコードする *AtSEC61y*
遺伝子も含まれている。

105 (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、優れたたん白質の供給源であり、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。利用
形態は主に大豆油かす、他に少量のダイズ及びきな粉が飼料として利用されてい
る（新編飼料原料図鑑, 2008）。

110 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

CV127 ダイズ及び非組換えダイズの主要構成成分（たん白質、総脂質、灰分、
水分、炭水化物、総食物繊維）、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸組成、脂肪酸
組成及び有害生理活性物質（トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン、
115 スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸）についての分析値及び文献値は明ら
かとなっている（ILSI, 2006、参考資料 31~33）。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

CV127 ダイズには、*csr1-2(m)* 遺伝子及び *AtSEC61y* 遺伝子が導入されている。
120 CV127 ダイズは、*csr1-2(m)* 遺伝子が改変 *AHAS(m)* たん白質を発現することによ
りイミダゾリノン系除草剤に対する耐性が付与されている点を除けば、既存のダ
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。

125 以上（1）～（4）により、CV127 ダイズ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象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

130 CV127 ダイズは、ブラジルとアルゼンチンにおいて商業栽培されることを予定し
ている。

ブラジルとアルゼンチンでは、グリホサートの連用に伴い、グリホサートに耐性
を有するマルバツユクサ、ブラジルハシカグサモドキ、ハリフタバ属、アサガオ類等

135 の雑草種が優勢となってきたが、イミダゾリノン系除草剤は、非選択性除草剤であり、低薬量でこれらの雑草を効果的に防除することができる上、生育期の茎葉への散布により、長期間にわたって雑草の発生を抑え、除草剤の散布回数を軽減することができる。

140 イミダゾリノン系除草剤に対し耐性を有する CV127 ダイズとイミダゾリノン系除草剤を併用利用することにより、ダイズ生産者の除草剤の散布経費や労力を削減でき、更に、不耕起栽培を併用することで、環境に対する負荷を軽減することができる (Tan *et al.*, 2005)。

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

145 CV127 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 Conquista である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

150 *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 (*Glycine soja*) 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

155 ダイズは既知の毒性物質を生成しないが、トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン、スタキオース、ラフィノース、フィチン酸など数種類の栄養阻害物質を含む。これらの栄養阻害物質は、ダイズ種子を加工する際に大幅に減少する。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

160 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

165 ダイズには多数の病害が発生することが知られており、糸状菌、ウイルス、細菌、ファイトプラズマのダイズへの感染が確認されている。世界では、ダイズさび病、べと病、立枯れ性病害、うどんこ病、モザイク病、矮化病などによる被害が報告されている (農業技術大系, 2000, Grau *et al.*, 2004) が、ダイズに感染する上記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

170 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

ダイズは短日植物である (Garner and Allard, 1920)。ダイズの自家受粉率は高

く、他家受粉率は通常 1%未満である。

175 近縁野生種としては、染色体数が同じ (2n=40) ツルマメ (*G. soja*) が挙げられ、
細胞学的、形態学的、分子生物学的に、ダイズの祖先と考えられている。ツルマ
メは、韓国、台湾、中国北東部、中国とロシアの国境地域に自生し (Hymowitz
and Newell, 1981)、我が国においても広く分布している (新編農学大事典, 2004)。
ダイズとツルマメとの交雑は起こり得るものの、ダイズとツルマメはともに自殖
180 性植物であり、ダイズとツルマメの開花期は重なりにくいこと、ダイズとツルマ
メを隣接して栽培し、かつ開花期を重複させた条件下でも、ダイズとツルマメが
交雑する可能性は極めて低いことが報告されている (Mizuguti *et al.*, 2009)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

185 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。その他、少量
だが、ダイズ及びきな粉も飼料として利用されている。

我が国において、飼料として主に利用されてきた大豆油かすは、明治時代満州
(中国東北部) から輸入され、我が国の農業の発展に大きく寄与してきた (飼料原
料ガイドブック副原料編, 2004)。その後、日本国内では圧搾法によるダイズ搾油
190 工業が始まり、大豆油かすは代表的な植物性たん白質飼料として、牛、豚、鶏な
どの家畜の飼料として広く利用されている。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

195 ダイズには、トリプシンインヒビター、レクチンなどの栄養阻害物質が含まれ
ているが、加工又は調理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利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

200 ダイズ種子には休眠性がほとんどなく、ある特殊な条件下で越冬した際に発芽
する場合もあるが、十分に生育することはない (OECD, 2000)。ダイズ種子の発芽
力は常温では通常約 3 年で失われる (農業技術大系, 1976)。これまで我が国にお
いてダイズが雑草化した例は報告されていない。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

205 ツルマメは、トリプシンインヒビターを含むことが報告されている (Natarajan
et al., 2007)。また、フィチン酸、ラフィノースなどの有害生理活性物質は種子一
般に含まれているので (Kuo *et al.*, 1988, Raboy *et al.*, 2000)、ツルマメにもダイ
ズ同様これらの有害生理活性物質が含まれると考えられる。

4 ベクターに関する事項

210 (1) 名称及び由来に関する事項

CV127 ダイズの作出に用いた約 6.2 kbp の DNA 断片 LF-6.2PvuII は、プラス
ミド pAC321 から切り出した断片である。プラスミド pAC321 は、プラスミド

pBluescript SK (-)を基に構築された (Sathasivan *et al.*, 1990)。プラスミド pBluescript SK (-)は非病原性で家畜等に対する有害性を示す報告はない。

215

(2) 性質に関する事項

プラスミド pBluescript SK (-)の全塩基数は 2958 bp で、その塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかとなっている。また、プラスミド pBluescript SK (-)の塩基配列には、既知の有害塩基配列は含まれていない。

220

(3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pBluescript SK (-)には、アンピシリン耐性を付与する β -ラクタマーゼをコードしているアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。アンピシリン耐性遺伝子はプラスミドの選抜マーカーとして用いられた。

225

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pBluescript SK (-)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

230

プラスミド pBluescript SK (-)の宿主域は限られており、家畜等が宿主となることはない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

235

エチルメタンサルフォン酸処理によりシロイヌナズナ変異体を作成し、イミダゾリノン系除草剤により選抜したシロイヌナズナ変異体のcDNAライブラリーを作成した (Leutwiler *et al.*, 1986)。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のAHAS遺伝子配列をプローブとし、このcDNAライブラリーからAHAS遺伝子配列をもつcDNAクローンを選抜した (Mazur *et al.*, 1987)。

240

当該cDNAクローンを制限酵素 *Xba*I で切断した約5.7 kbpの断片をpBluescript SK (-)にサブクローニングした。シークエンス解析を行い、*csr1-2*遺伝子配列がクローニングされたことを確認できたプラスミドをプラスミドpAC321とした (参考資料3)。

245

プラスミドpAC321から制限酵素 *Pvu*II を用いて約6.2 kbpのDNA断片LF-6.2PvuIIを切り出した。

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

プラスミド pAC321 から切り出した DNA 断片 LF-6.2PvuII を、パーティクルガン法によりダイズゲノムへ導入した (Klein *et al.*, 1987、Sanford *et al.*, 1993、Lee *et al.*, 1996)。

250

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

255

CV127 ダイズに導入された *csr1-2(m)* 遺伝子及び *AtSEC61y* 遺伝子は、シロイヌナズナに由来する。シロイヌナズナはヨーロッパ、アジア、北西アフリカ原産のアブラナ科 (*Brassicaceae*) の植物である。

② 安全性に関する事項

260

シロイヌナズナは、植物生理学や分子生物学のモデル植物として広く用いられ、2000 年に全塩基配列が解読されており、病原性及び毒素産生性を示す報告はない。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

265

プラスミド pAC321 から制限酵素 *PvuII* で切断した *csr1-2(m)* 遺伝子及び *AtSEC61y* 遺伝子を含む約 6.2 kbp の DNA 断片 LF-6.2*PvuII* を、慣行品種 Conquista 種子の頂端分裂組織を含む胚軸にパーティクルガン法により導入した (Klein *et al.*, 1987、Sanford *et al.*, 1993、Lee *et al.*, 1996、Aragão *et al.*, 1996)。

270

イミダゾリノン系除草剤イマザピルを含む再生培地で形質転換体を選抜し、再生個体を得た。再生個体から複数回の自殖、戻し交配を経て得られた後代を対象に、世代間の導入遺伝子の遺伝安定性、組換えたん白質の発現量の解析等を実施し、CV127 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

275

csr1-2 遺伝子発現領域及び *AtSEC61y* 遺伝子発現領域に存在するそれぞれのプロモーターを使用した。*csr1-2* 遺伝子のプロモーターは、栄養生長期の葉組織において高い活性を示すことが知られている (Stidham and Singh, 1991)。

② ターミネーターに関する事項

280

csr1-2 遺伝子発現領域及び *AtSEC61y* 遺伝子発現領域に存在するそれぞれのターミネーターを使用した。

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 DNA 断片 LF-6.2*PvuII* には既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

285

(4) 性質に関する事項

導入 DNA 断片 LF-6.2*PvuII* の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。CV127 ダイズに導入された *csr1-2(m)* 遺伝子及び *AtSEC61y* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

290

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
導入 DNA 断片 LF-6.2PvuII 領域	
<i>lacZ</i> promoter	<i>E. coli lacZ</i> プロモーター。β-ガラクトシダーゼ アルファフラグメント (<i>lacZ</i>) の転写を促進する
<i>lacZ</i> CDS, interrupted	<i>E. coli</i> β-ガラクトシダーゼ アルファフラグメントのコーディング配列。アルファ相補性により、マルチクローニングサイトへ目的配列が挿入されたかどうかを青白選抜で確認できる
T3 promoter	バクテリオファージ T3 プロモーター転写開始部位。ファージミドで T3 RNA ポリメラーゼによる RNA <i>in vitro</i> 合成を可能にする
Arabidopsis gDNA, unannotated 1	シロイヌナズナゲノム DNA 由来: 相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は検索されず、ORF を形成していない
<i>AtSEC61γ</i> 5'UTR	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 5'非翻訳領域
<i>AtSEC61γ</i> CDS	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> コーディング領域
<i>AtSEC61γ</i> intron 1	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 第一イントロン
<i>AtSEC61γ</i> 3'UTR and terminator	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 3'非翻訳領域 (ターミネーターを含む)
<i>AtSEC61γ</i> intron 2	シロイヌナズナ <i>SEC61γ</i> 第二イントロン
<i>AtAHAS</i> 5'UTR and putative promoter	シロイヌナズナ <i>AHAS</i> 5'非翻訳領域 (プロモーターを含む): <i>AHAS</i> たん白質は栄養生長期の葉組織において高い活性を示すことがわかっている。また、非常に低い発現ながらも全ての組織において発現が確認されている
<i>csr1-2</i> 遺伝子	<i>csr1-2</i> 遺伝子領域
<i>AtAHAS</i> 3'UTR and terminator	シロイヌナズナ <i>AHAS</i> 3'非翻訳領域 (ターミネーターを含む)
Arabidopsis gDNA, unannotated 2	シロイヌナズナゲノム DNA 由来: 相同性検索により既知の遺伝子と相同性のある配列は検索されず、ORF を形成していない
T7 promoter	バクテリオファージ T7 プロモーター転写開始部位。ファージミドで T7 RNA ポリメラーゼによる RNA <i>in vitro</i> 合成を可能にする

① *csr1-2(m)* 遺伝子の機能

CV127 ダイズに導入された *csr1-2(m)* 遺伝子は、野生型の *AHAS* たん白質の 653 番目のセリン残基がアスパラギン残基に、272 番目のアルギニン残基がリジン残基にそれぞれ置換 (R272K, S653N) されている、改変 *AHAS(m)* たん白質をコードしている。本たん白質を発現させることにより、ダイズにはイミダズリノン系除草剤に対する耐性が付与される (Haughn and Somerville, 1986、Haughn and Somerville, 1990、Manabe *et al.*, 2007)。

300

AHAS たん白質は、あらゆる植物、微生物に含まれる生存に必須の酵素で、分岐鎖アミノ酸（バリン、ロイシン、イソロイシン）生合成の第1段階を触媒する (Stidham and Singh, 1991、Delfourne *et al.*, 1994、Singh and Shaner, 1995、Duggleby and Pang, 2000)。下図のとおり、通常の植物では、イミダゾリノン系除草剤が AHAS たん白質を阻害することで分岐鎖アミノ酸が欠乏し、生育できなくなるが、CV127 ダイズが発現する改変 AHAS(m)たん白質は、イミダゾリノン系除草剤が触媒ユニットに結合できない変異を起こしているため、CV127 ダイズはこの除草剤による分岐鎖アミノ酸の生合成系への影響を受けずに生育することができる (Newhouse *et al.*, 1992、Pang *et al.*, 2002、McCourt *et al.*, 2006)。

305

310

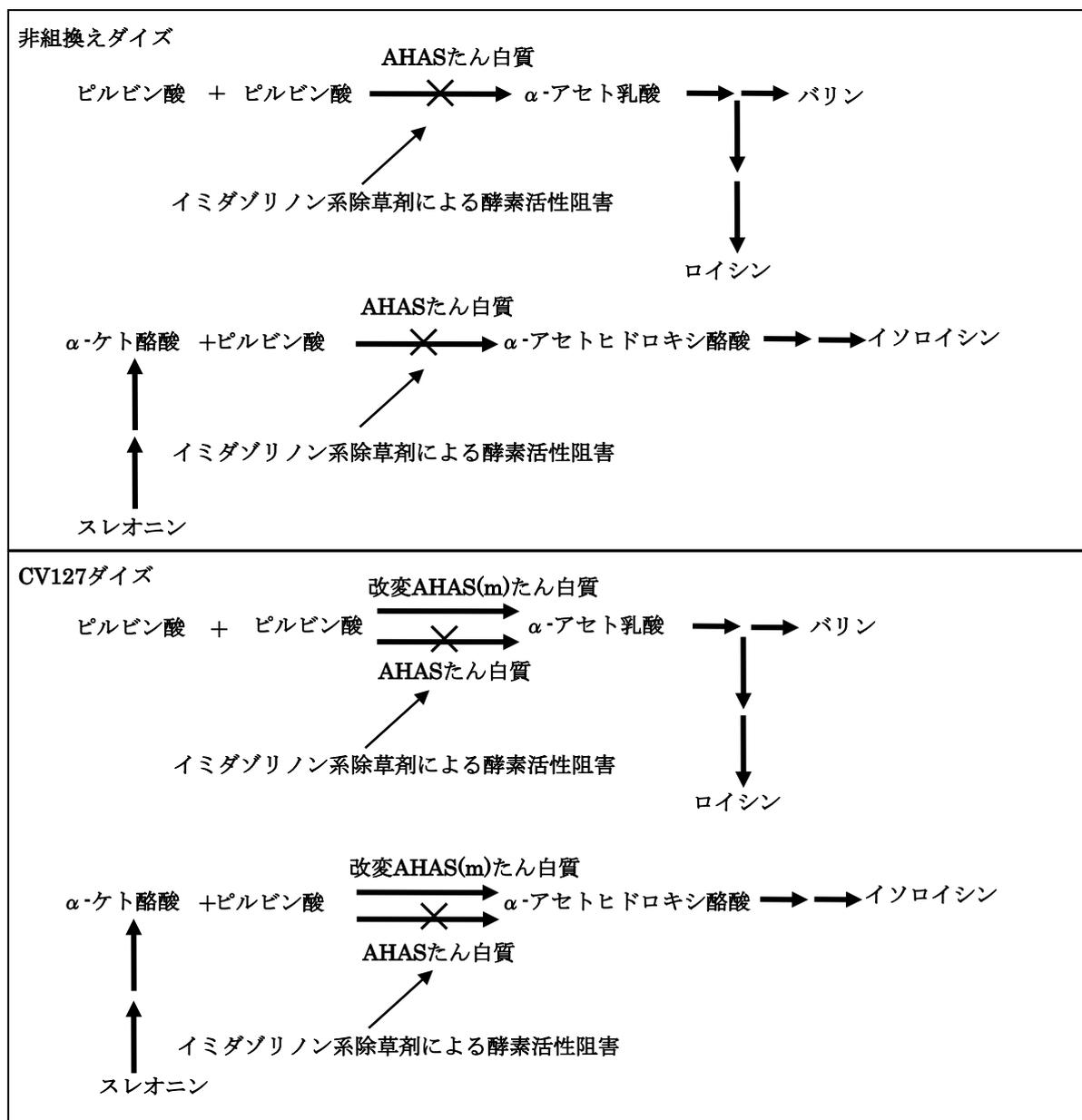


図 改変 AHAS(m)たん白質の作用機構

② *AtSEC61γ* 遺伝子の機能

315

AtSEC61γ 遺伝子がコードする *AtSEC61γ* たん白質は、*AtSEC61α* 及び *AtSEC61β* サブユニットたん白質と共に、輸送たん白質複合体として小胞体膜に局在し、たん白質の輸送に重要な役割を有する。*AtSEC61γ* 遺伝子は、あらゆる植物及び真核生物に広く保存されている (Hartmann *et al.*, 1994)。ダイズゲノム中には 4 つの *AtSEC61γ* 遺伝子が存在することがわかっている。シロイヌナズナとダイズの *AtSEC61γ* たん白質間には約 86% のアミノ酸配列の相同性が認められた (参考資料 2)。

320

(5) 純度に関する事項

325

制限酵素 *PvuII* を用いてプラスミド pAC321 から切断された DNA 断片 LF-6.2*PvuII* は、アガロースゲル電気泳動で分離、目的とするバンドの切出し、精製を経て純化されており、目的外の遺伝子の混入はない。

(6) コピー数に関する事項

330

ダイズゲノムに導入した配列は、*csr1-2* 遺伝子を含む約 6.2 kbp の DNA 断片 LF-6.2*PvuII* である。導入遺伝子のコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、CV127 ダイズには DNA 断片 LF-6.2*PvuII* が 1 コピー組み込まれていることが確認された (参考資料 4、5)。

335

CV127 ダイズのゲノム中に、DNA 断片 LF-6.2*PvuII* 以外のプラスミド pAC321 に由来する領域 (外骨格領域) が存在しないことを確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、CV127 ダイズには外骨格領域が挿入されていないことが確認された (参考資料 4、6)。

340

CV127 ダイズのシーケンス解析を行った結果、ダイズゲノムへ導入された挿入 DNA 配列の長さは 4758 bp であった (参考資料 4)。また、前述のとおり、*csr1-2(m)* 遺伝子配列中には 2 箇所の点変異があり、それに伴いアミノ酸配列に 2 箇所の変異が生じていることが確認された (参考資料 7)。その他に *csr1-2(m)* 遺伝子の 3' 非翻訳領域の下流に 2 つの点変異が見つかったが、この点変異によるアミノ酸置換は起こっていない。更に、*csr1-2(m)* 遺伝子発現領域の上流に、完全な *AtSEC61γ* 遺伝子が含まれていること、ダイズゲノムへ導入されたことに伴う変異は生じていないことが確認された (参考資料 4)。そして、*csr1-2* 遺伝子の一部配列 (376 bp) が、挿入 DNA 配列の 3' 末端側に挿入されており、この塩基配列中に 1 箇所の点変異が確認された (参考資料 4)。なお、この点変異によるアミノ酸置換は起こっていない。

345

DNA断片LF-6.2*PvuII*が導入された領域の近傍配列がダイズゲノム由来の配列であることを確認するため、挿入DNA配列の 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列のシーケンス解析を行い (参考資料 4、8、11、12)、データベース¹を用いて

¹ GenBank、EMBL、DDBJ、PDB 及び BASF プラントサイエンス所有データベースに、2008 年 12 月に全塩基配列が解読されたダイズ品種 Williams82 のゲノムシーケンスデータを加えたデータ

350 BLAST検索を行った。その結果、検索に用いた近傍配列は、データベース上の複数
のダイズ染色体と相同性を示し、DNA断片が導入された領域の近傍配列では、
355 遺伝子組換え操作に伴い、ダイズ染色体に部分的な構造変化が起こっている可能性
が考えられた。

遺伝子組換え操作に伴い内在性遺伝子が破壊された可能性について、近傍配列
とデータベースとの相同性検索を行った結果、ダイズ染色体の構造変化に伴い、1
360 つの内在性遺伝子が破壊された可能性が高いと考えられた（参考資料 9）。なお、当
該遺伝子と相同性が認められる配列は、ダイズ 2 番染色体に 1 つ、ダイズ 10 番染
365 色体に 2 つ存在する（参考資料 10）。また、この内在性遺伝子の遺伝子産物につ
いてドメイン検索を行ったところ、機能を予測できる配列は認められず、既知の毒
370 性たん白質との相同性も認められなかった（参考資料 13）。次に、BioMart²を使用
し、上述のダイズ染色体の構造変化に伴い欠失したダイズゲノム領域にオープン
リーディングフレーム（以下「ORF」という。）が存在するか確認したところ、
243 のORFが検索されたが、PFAM³及びPANTHER⁴を用いてたん白質ドメイン
375 及び機能に関する相同性検索を行ったところ、既知の毒性物質、栄養阻害物質、
アレルギー等に関与する遺伝子産物との相同性は認められなかった。また、これ
380 ら 243 のORFと相同性を有する配列は、BLAST検索の結果、他のダイズ染色体上
にも存在していることが確認された（参考資料 14）。

以上のことから、CV127 ダイズには、DNA断片 LF-6.2PvuII が 1 コピー導入
されている。その導入により、近傍配列の内在性遺伝子が破壊・欠失している可能
370 性が高いが、ダイズが 4 倍体であること、かつ、他のダイズ染色体上にもこの内
在性遺伝子と相同性を有する配列が存在することから、この内在性遺伝子の機能を
他のダイズ染色体上の相同性のある遺伝子が補っている可能性が考えられた。
なお、農業形質に関する試験結果（参考資料 15）、後述の種子の栄養成分及び栄養
375 阻害物質等の分析結果（参考資料 31~34）からも、この内在性遺伝子の欠失・破壊
に起因すると考えられる影響は認められなかった。さらに、ダイズ染色体の構造
変化により欠失した領域における遺伝子産物のドメイン及び機能検索の結果、毒
380 性物質、栄養阻害物質及びアレルギー等に関与する遺伝子産物との相同性は認め
られなかった。これらのことから、DNA断片の導入及びそれに伴うダイズ染色体
の構造変化による近傍配列の内在性遺伝子の破壊・欠失が、CV127 ダイズの飼料と
しての安全性に支障を及ぼすおそれはないと考えられた。

（7）安定性に関する事項

ダイズゲノムに導入した *csr1-2(m)* 遺伝子発現領域の安定性を確認するため、4
世代の CV127 ダイズから得たゲノム DNA 試料についてサザンブロット分析を行

ベース

² BioMart 遺伝子解析ソフトウェアの 1 つ。version 0.6. <http://central.biomart.org>

³ PFAM たん白質ドメイン及びファミリーのデータベース。遺伝子産物と既知のたん白質ドメインとの相同性を検証することにより、遺伝子産物の機能の予測が可能 (Sammur *et al.*, 2008)。

⁴ PANTHER 文献情報に基づき遺伝子の機能を分類、登録したデータベース。遺伝子産物と既知のたん白質のアミノ酸配列の相同性の有無を検証することが可能 (Mi *et al.*, 2010)。

385 った。パーティクルガン法では複数コピーが目的のゲノムに導入されることがあ
ることが知られており、戻し交配前の世代では複数コピーが存在していたが、戻
し交配後の世代では 1 コピーの *csr1-2(m)* 遺伝子発現領域が安定的に継承されてい
ることが確認された (参考資料 4)。その遺伝様式について確認するため、定量
390 PCR 解析により *csr1-2(m)* 遺伝子の分離比を算出し、カイ二乗検定を実施した結果、
期待値との間に統計学的有意差は認められなかった (参考資料 16)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

① 改変 *csr1-2(m)* 遺伝子

CV127 ダイズの各時期 (幼苗(V2)期、開花(R2)期、成熟(R8)期) の各組織 (植物
395 体全体、葉、根、初生葉(V2 期)、花(R2 期)、莢及び種子(R8 期)) における改変
AHAS(m)たん白質量を ELISA 法により測定した。なお、改変 AHAS(m)たん白質
とダイズ由来の AHAS たん白質はアミノ酸配列の相同性が高く、ELISA に用いた
抗 AHAS 抗体は、これら 2 つのたん白質を区別することができないため、本試験
400 では総 AHAS たん白質量を測定した。その結果、CV127 ダイズの全ての部位で
AHAS たん白質が検出され、その発現は V2 期の葉及び植物体全体で最も高かった
(参考資料 17、18)。

② *AtSEC61γ* 遺伝子

DNA断片 LF-6.2PvuII に含まれる *AtSEC61γ* 遺伝子の発現の有無について RT-
405 PCRにより確認した結果、*AtSEC61γ* 遺伝子の低レベルの転写産物が検出された
(参考資料 4)。この転写産物を用いて RLM-5'-RACE 解析 (RNA-ligase mediated
rapid amplification of 5' complementary DNA ends⁵⁾) を行い、転写産物中の開始
コドン「ATG」を検索した結果、*AtSEC61γ* 遺伝子は開始コドンを持つことから、た
ん白質に翻訳されると考えられた (参考資料 19)。*AtSEC61γ* 遺伝子の発現につ
410 いて確認するため、CV127 ダイズ、対照品種 Conquista 及びシロイヌナズナの葉及
び種子からたん白質を抽出し、ウエスタンブロット分析を実施したところ、シロ
イヌナズナの種子からのみ *AtSEC61γ* たん白質が検出された (参考資料 20)。以上
のことから、*AtSEC61γ* 遺伝子は CV127 ダイズ中においてわずかに転写されてい
るが、仮に発現していたとしても *AtSEC61γ* たん白質の発現量は非常に小さく、後
415 述のとおり毒性も認められないことから安全上の問題になることはないと考えら
れた。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

DNA断片 LF-6.2PvuII の構築過程で使用したプラスミド pAC321 にはアンピシ
420 リン耐性遺伝子が含まれているが、ダイズゲノムに導入した DNA断片 LF-
6.2PvuII には含まれていない。また、CV127 ダイズ中にプラスミド pAC321 の外

⁵ mRNA の塩基配列が部分的に解っているときに、その既知領域の塩基配列情報を基に PCR を行い、未知領域を含む完全長 cDNA をクローニングする方法。未知領域が mRNA の 5'末端側にある場合を 5'-RACE、3'末端側にある場合を 3'-RACE という。

骨格領域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（参考資料 4、6）。

425 (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

CV127 ダイズの挿入遺伝子領域の 5'末端側及び 3'末端側の近傍配列に、毒性たん白質及びアレルゲンと相同性のある ORF が新たに形成されていないことを確認するため、挿入 DNA 配列と近傍配列について下記の解析を行った（参考資料 13）。

430 ① 挿入 DNA 配列及び近傍配列中に存在する ORF の検索

2つの終止コドン間に存在する連続した 8 アミノ酸以上の長さを持つ領域を推定 ORF と定義し、挿入 DNA 配列、5'末端及び 3'末端の近傍配列（合計約 7 kbp）中の ORF 検索を 6つの読み枠（センス鎖及びアンチセンス鎖毎に 3つの読み枠）で行った。その結果、AtSEC61 γ たん白質と改変 AHAS(m)たん白質を除く 448 の推定 ORF が見つかった（参考資料 13）。

435 ② 448 の推定 ORF と既知の毒性たん白質との構造相同性の確認

GenBank ペプチド配列データベースを使用し、448 の推定 ORF のアミノ酸配列と既知の毒性たん白質のアミノ酸配列との BLASTp 相同性検索を行った。その結果、検索に用いた 448 の推定 ORF と既知の毒性たん白質との相同性は認められなかった（参考資料 13）。

440 ③ 挿入 DNA 配列の 3'末端側に推定された 501bp の ORF の転写の有無

挿入遺伝子のシーケンス解析の結果、*csr1-2* 遺伝子の一部配列（376 bp）が、挿入 DNA 配列の 3'末端側に挿入されていた。さらに、376 bp の *csr1-2* 遺伝子の一部配列中に開始コドンが見つかり、501 bp の ORF を形成している可能性が考えられた。この 501 bp の ORF の転写の有無を RT-PCR で確認したが、この ORF の転写は認められなかった（参考資料 4）。

445

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

450 CV127 ダイズは、改変 AHAS(m)たん白質の発現によりイミダゾリノン系除草剤に対して耐性を有している（Haughn and Somerville, 1986、Haughn and Somerville, 1990）。この点を除けば、CV127 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、飼料としての利用方法も従来と変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

455 ① 改変 AHAS(m)たん白質

改変 AHAS(m)たん白質と既知の毒性たん白質とのアミノ酸配列の相同性の有無を、GenBank ペプチド配列データベースを用いた BLASTp 検索により確認した。その結果、改変 AHAS(m)たん白質と既知の毒性たん白質のアミノ酸配列には相同性は認められなかった（参考資料 21）。

460

② AtSEC61 γ たん白質

①と同様に、AtSEC61 γ たん白質と既知の毒性たん白質とのアミノ酸配列の

相同性の有無を確認した。その結果、AtSEC61 γ たん白質と既知の毒性たん白質のアミノ酸配列には相同性は認められなかった（参考資料 21）。

465

(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

本試験では、改変 AHAS(m)たん白質の人工胃液中での消化性試験（下記①）のみ、*E. coli*で大量発現させた改変 AHAS(m)たん白質と CV127 ダイズの種子及び葉から抽出した改変 AHAS(m)たん白質が用いられているが、その他の試験では
470 全て *E. coli*から調製したたん白質が用いられている。*E. coli*から調製したたん白質と CV127 ダイズ中で発現するたん白質との同等性は、改変 AHAS(m)たん白質については性質、純度、機能性、濃度、可溶性、分子量測定、抗 AHAS 抗体を用いた免疫反応性の確認、除草剤イマザピルによる阻害活性の確認、N 末端のアミノ酸配列の解析及び糖鎖修飾の解析により、AtSEC61 γ たん白質については分子
475 量の測定、抗 AtSEC61 γ 抗体による免疫反応性により確認した（参考資料 23、24）。

① 人工胃液に対する感受性

改変 AHAS(m)たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（United States Pharmacopeia, 2000、
480 Thomas *et al.*, 2004）。その結果、改変 AHAS(m)たん白質は速やかに分解され、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確認された（参考資料 22）。

AtSEC61 γ たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（United States Pharmacopeia, 2000、
485 Thomas *et al.*, 2004）。その結果、AtSEC61 γ たん白質は速やかに分解され、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確認された（参考資料 25）。

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

改変 AHAS(m)たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（United States Pharmacopeia, 1990）。その結果、改変 AHAS(m)たん白質は試験開始から 30 秒以内に検出限界以下まで分解されたことが確認された（参考資料 26）。

AtSEC61 γ たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（United States Pharmacopeia, 1990）。その結果、AtSEC61 γ たん白質は、ウエスタンブロット分析によって試験開始から 60 分後まで検出された（参考資料 27）。

③ 加熱処理

改変 AHAS(m)たん白質の加熱処理感受性を、ウエスタンブロット分析及び酵素活性により評価した（参考資料 28）。ウエスタンブロット分析の結果、改変 AHAS(m)たん白質は 100°C、60 分間の加熱処理後であっても検出されたこ

500

505 とから、加熱処理に対して一次構造の免疫学的反応性は変化しないことが確認された。一方、Singh らの方法 (Singh *et al.*, 1988) により酵素活性を評価した結果、改変 AHAS(m)たん白質の酵素活性は 60°C、30 分間又は 75°C 以上、2 分間の加熱処理により 0%となった。以上のことから、改変 AHAS(m)たん白質は 60°C 以上の加熱処理により不活化されることが明らかとなった (参考資料 29)。

510 AtSEC61 γ たん白質の加熱処理感受性を、ウエスタンブロット分析により評価した (参考資料 30)。その結果、100°C、60 分間の加熱処理であっても検出されたことから、加熱処理に対して一次構造の免疫反応性は変化しないことが確認された。

515 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

520 AHAS たん白質は、あらゆる植物、微生物に含まれる生存に必須の酵素で、基質特異性が高く、分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) 生合成の第 1 段階を触媒する (Stidham and Singh, 1991)。AHAS たん白質は、2 分子のピルビン酸を縮合しバリンとロイシンの前駆体であるアセト乳酸を生成させるか、1 分子のピルビン酸を 2-ケト酪酸 1 分子と縮合させ、イソロイシンの生合成中間体である 2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸を生成させる (Delfourne *et al.*, 1994、Singh and Shaner, 1995、Duggleby and Pang, 2000)。

525 また、コムギでは、分岐鎖アミノ酸バリン、ロイシンによって、AHAS たん白質の酵素活性がフィードバック制御を受けることが知られている (Newhouse *et al.*, 1992、McCourt *et al.*, 2006、McCourt and Duggleby, 2006)。そこで、CV127 ダイズ及び対照品種の葉から得られたたん白質抽出物を用いて分岐鎖アミノ酸による AHAS 酵素活性のフィードバック制御について調べた (参考資料 24)。その結果、CV127 ダイズの AHAS 酵素活性は、バリン、ロイシンによって、対照品種と同程度のフィードバック制御を受けることが確認された。

530 なお、1 アミノ酸が変異している改変 AHAS たん白質及び 2 アミノ酸が変異している改変 AHAS(m)たん白質は、同等のイミダゾリノン系除草剤耐性を有すること、それぞれ既存の AHAS たん白質と同等の触媒活性を有することが確認されている (参考資料 1)。

535 以上のことから、改変 AHAS(m)たん白質は分岐鎖アミノ酸合成経路にのみ関与し、仮に改変 AHAS(m)たん白質が過剰に発現された場合でも、既存の AHAS たん白質と同様にフィードバック制御が働くと考えられ、他の代謝系には影響しないと考えられる。

540 CV127 ダイズには、改変 AHAS(m)たん白質に加えて、AtSEC61 γ たん白質が発現する可能性がある。本たん白質は、AtSEC61 α 及び AtSEC61 β サブユニットたん白質と共に、輸送たん白質として機能することが知られており (Hartmann *et al.*, 1994)、仮に発現した場合であっても代謝系には影響しないと考えられる。

545 (5) 宿主との差異に関する事項

CV127 ダイズと従来のダイズとの差異を評価するため、ブラジルにおいて、2006年に6箇所、2007年に4箇所のは場で栽培した CV127 ダイズ及び対照品種 Conquista 及び商業栽培品種 2 品種の栽培試験を行い、収穫された種子の主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類及び有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 31~33)。

550

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、総食物繊維) について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006) の範囲内であった。

555

②脂肪酸組成

種子中の 37 種の脂肪酸について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006) の範囲内であった。

560

③アミノ酸組成

種子中の 18 種のアミノ酸について分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006) の範囲内であった。

565

④ミネラル類

種子中の 5 種のミネラルについて分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006) の範囲内であった。

570

⑤ビタミン類

種子中の 6 種のビタミンについて分析した結果、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006) の範囲内であった。

575

⑥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、ウレアーゼ、トリプシンインヒビター及びイソフラボン (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、いずれの成分の分析値も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培品種や文献に記載された分析値 (ILSI, 2006、Gao *et al.*, 2007、Hou *et al.*, 2009) の範囲内であった。

580

以上の結果から、CV127 ダイズには、遺伝子組換えによる意図しない差異は構成成分等には生じていないことが確認された。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

CV127 ダイズの生存及び増殖能力は対照の非組換え品種と相違はない。

585

(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、CV127 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ついても相違はない。

590

(8) 不活化法に関する事項

CV127 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

595

2009年1月に欧州食品安全機関（EFSA）へ食品・飼料としての安全性の確認を申請した。

2009年12月に中国農業省（MOA）へ食品・飼料としての安全性の確認を申請した。

600

2009年12月にブラジル国家バイオ安全技術委員会（CTNBio）において食品・飼料としての安全性が確認された。

2010年5月にアルゼンチン農牧水産食糧庁（SAGPyA）へ食品・飼料としての安全性の確認を申請した。

2012年2月に米国食品医薬品局（FDA）において食品・飼料としての安全性が確認された。

605

2012年7月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において食品としての安全性が確認された。

2012年11月にカナダ保健省（Health Canada）において食品としての、また、カナダ食品検査庁（CFIA）において環境・飼料としての安全性が確認された。

610

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

CV127 ダイズの栽培方法は、生育期の雑草防除にイミダゾリノン系除草剤を使用できることを除き、既存のダイズ品種の栽培方法と同じである。

615

CV127 ダイズへの使用が想定されるイミダゾリノン系除草剤イマザピル及びイマザピック並びにそれらの代謝産物について、CV127 ダイズへの残留の有無及びそれらの摂取が家畜の健康に及ぼす影響を検証した結果、安全上の問題は認められなかった。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

CV127 ダイズの種子の製法及び管理方法は、従来のダイズ品種と同じである。

620

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。

625

IV 審議結果

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ BPS-CV127-9 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。

630

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Ribeiro, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., and Rech, E.L. 1996. Inheritance of foreign genes in transgenic bean (*Phaseolus vulgaris* L.) co-transformed via particle bombardment. *Theor. Appl. Genet.* 93:142-150.
- 2 Delfourne, E., Bastide, J., Badon, R., Rachon, A., and Genix, P. 1994. Specificity of plant acetohydroxyacid synthase: Formation of products and inhibition by herbicides. *Plant Physiol. Biochem.* 32:473-477.
- 3 Duggleby, R.G. and Pang, S.S. 2000. Acetohydroxyacid synthase. *J. Biochem. Molec. Biol.* 33:1-36.
- 4 Gao, Y. Shang, C. Saghai Maroof, M. A. Biyashev, R. M. Grabau, E. A. Kwanyuen, P. Burton, J. W., and Buss, G. R. 2007. A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean. *Crop Science* 47: 1797-1803.
- 5 Garner, W.W. and Allard, H.A. 1920. Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 18:553-606.
- 6 Grau, C.R., Dorrance, A.E., Bond, J., and Russin, J.S. 2004. Fungal Diseases. In: Soybeans: Improvement, production, and uses, 3rd edition, Boerma, H.R. and Specht, J.E. (eds.). p. 679-763. Agron. Monogr. 16. ASA, CSA, and SSSA Publishers, Madison, WI, USA.
- 7 Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T. A. 1994. Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367:654-657.
- 8 Haughn, G.W. and Somerville, C.R. 1986. Sulfonyleurea-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gne. Genet.* 204:430-434.
- 9 Haughn, G.W. and Somerville, C.R. 1990. A mutation causing imidazolinone resistance maps to the *csr1* locus of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 92:1081-1085.
- 10 Hou, A. Chen, P. Alloatti, J. Li, D. Mozzoni, L. Zhang, B., and Shi, A. 2009. Genetic variability of seed sugar content in worldwide soybean germplasm collections. *Crop Science* 49: 903-912.
- 11 Hymowitz, T. and Newell, C.A. 1981. Taxonomy of the genus *Glycine*, domestication and uses of soybeans. *Econ. Bot.* 35:272-288.
- 12 International Life Sciences Institute (ILSI). 2006. ILSI Crop Composition Database. Version 3.0.
<http://www.cropcomposition.org>
- 13 Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- 14 Kuo, T.M., VanMiddlesworth, J.F., and Wolf, W.J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *J. Agric. Food. Chem.* 36:32-36.

- 15 Lee, L., Laramore, C.L., Day, P.R., and Tumer, N.E. 1996. Transformation and regeneration of creeping bentgrass (*Agrostis palustris* Huds.) protoplasts. *Crop Science* 36:401-406.
- 16 Leutwiler, L.S., Meyerowitz, E.M., and Tobin, E.M. 1986. Structure and expression of three light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein genes in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl. Acids Res.* 14:4051-4064.
- 17 Manabe, Y., Tinker N., Colville, A., and Miki B. 2007. CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 48(9):1340-1358.
- 18 Mazur, B.J., Chui, C.F., and Smith, J.K. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiol.* 85:1110-1117.
- 19 McCourt, J.A. and Duggleby, R.G. 2006. Acetohydroxyacid synthase and its role in the biosynthetic pathway for branched-chain amino acids. *Amino Acids.* 31(2):173-210.
- 20 McCourt, J.A., Pang, S.S., King-Scott, J., Guddat, L.W., and Duggleby, R.G. 2006. Herbicide-binding sites revealed in the structure of plant acetohydroxyacid synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 103(3): 569-573.
- 21 Mi, H., Dong, Q., Muruganujan, A., Gaudet, P. Lewis S., and Thomas, P. D. 2010. PANTHER version 7: improved phylogenetic trees, orthologs and collaboration with the Gene Ontology Consortium. *Nucleic Acids Res.* 38: 204-210.
- 22 Mizuguti, A., Yoshimura, Y., and Matsuo K. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management.* 9:93-96
- 23 Natarajan, S., Xu, C., Bae, H., and Bailey, B.A. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *J. Plant Physiol.* 164:756-763.
- 24 Newhouse, K.E., Smith, W.A., Starrett, M.A., Schaefer, T.J. and Singh, B.K. 1992. Tolerance of imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiol.* 100:882-886.
- 25 OECD. 2000. Organization for Economic Cooperation and Development, Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15. ENV/JM/MONO (2000) 9. <http://www.oecd.org>.
- 26 Pang, S.S., Duggleby, R.G., and Guddat, L.W. 2002. Crystal structure of yeast acetohydroxy acid synthase: a target for herbicidal inhibitors. *J. Mol. Biol.* 317:249-262.
- 27 Raboy, V., Gerbasi, P.F., Young, K.A., Stoneberg, S.D., Pickett, S.G., Bauman, A.T., Murthy, P.P.N., Sheidan, W.F., and Etrl, D.S. 2000. Origin and seed phenotype of maize low phytic acid 1-1 and low phytic acid 2-1. *Plant Physiol.* 124:355-368.
- 28 Sanford, J.C., Smith, F.D., and Russell, J.A. (1993) Optimizing the biolistics process for different biological applications. *Methods Enzymol.* 217:483-509.
- 29 Sammut, S. J., Finn, R. D., and Bateman, A. 2008. Pfam 10 years on: 10,000 families and still growing. *Brief Bioinform.* 9(3):210-219.
- 30 Singh, B.K., Stidham, M.A., and Shaner, D.L. 1988. Assay of acetohydroxyacid synthase. *Anal. Biochem.* 171:173-179.

- 31 Singh, B.K. and Shaner, D.L. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field. *Plant Cell* 7:935-944.
- 32 Stidham, M.A. and Singh, B.K. 1991. Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. *In: The imidazolinone herbicides*. Chapter 6; Shaner, D. and O'Connor, S. (eds.). p. 71-90. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- 33 Thomas, K., Aalbers, M., Bannon G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J., Fu, T.J., Glatt, C.M., Hadfield, N., Hatzos, C., Hefle, S.L., Heylings, J.R., Goodman, R.E., Henry, B., Herouet, C., Holsapple, M., Ladics, G.S., Landry, T.D., MacIntosh, S.C., Rice, E.A., Privalle, L.S., Steiner, H.Y., Teshima, R., van Ree, R., Woolhiser, M., and Zawodny, J. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 39:87-98.
- 34 Tan, S., Evans, R.R., Dahmer, M.L., Singh, B.K., and Shaner, D.L. 2005. Imidazolinone-tolerant crops: history, current status and future. *Pest Manag. Sci.* 61:246-257.
- 35 United States Pharmacopeia 1990. The National Formulary USP XXII, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. p. 1788-1789.
- 36 United States Pharmacopeia 2000. The National Formulary USP XXIV, NF XIX, U.S. Pharmacopeial Convention, Inc. Mack Printing Co., Easton, PA, p. 2235.
- 37 飼料原料ガイドブック副原料編. 2004. 飼料輸出入協議会. 50-51.
- 38 新編飼料原料図鑑. 2008. 社団法人日本科学飼料協会. 22.
- 39 新編農学大辞典. 2004. 山崎耕宇 久保祐雄 西尾敏彦 石原邦 監修. 株式会社養賢堂発行. 466-471.
- 40 農業技術大系. 1976. 作物編 第6巻 ダイズ 基礎編 生育のステージと生理、生態 種子と発芽 昆野昭晨.
- 41 農業技術大系. 2000. 西和文 執筆. 農山漁村文化協会. 第6巻 161-165.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Comparison of inhibition of *At*AHAS (S653N) and *At*AHAS (S653N R272K) by imidazolinones and sulfonylurea. (Report No. BPS-004-06)
- 2 *At*SEC61y subunit protein expression in cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-010-07A)
- 3 CV127 系統の作出に用いたプラスミド pAC321 の全塩基配列 (全長 8669 bp)
- 4 Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-001-06)
- 5 Molecular bridging study for herbicide-tolerant soybean BPS-CV127-9. (Report No. BPS-014-07)
- 6 Supplement to “Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-001-06)”
- 7 シロイヌナズナ (AHAS)、プラスミド pAC321 (pAC321)、CV127 系統ダイズ (CV127) の AHAS 遺伝子領域のアライメント
- 8 ダイズゲノムへ導入した挿入 DNA 配列及び近傍配列
- 9 Bioinformatics analysis of the genomic area surrounding the transgene insert in herbicide-tolerant soybean BPS-CV127-9. (Report No. BPS-005-09)
- 10 Supplement to “Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No.

- BPS-001-06)”
- 11 Supplement to “Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-001-06)”
 - 12 Supplement to “Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-001-06)”
 - 13 Bioinformatics analysis of deduced amino acid sequences of open reading frames contained in the transgene insert of herbicide-tolerant soybean BPS-CV127-9 and within 1000 base pairs of flanking sequence on each side of the insertion. (Report No. BPS-004-09)
 - 14 Supplement to “Molecular characterization of cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-001-06)”
 - 15 ブラジル 6 箇所のほ場で栽培された CV127 系統及び対照品種の生育特性調査
 - 16 Imidazolinone-tolerant soybean CV127: agricultural and ecological experiments in season 2006/07
 - 17 Analysis of expression levels of *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (AHAS) protein, by ELISA, in the cultivance soybean event 127, plants grown in Brazilian field trials during the summer 2006/2007 season. (Report No. RF-1247-07)
 - 18 Analysis of expression levels of *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (AHAS) protein, by ELISA, in the BPS-CV127-9 soybean, plants grown in Brazilian field trials during the 2007 season. (Report No. RF-1383-07)
 - 19 Determination of the 5’end of the *Arabidopsis thaliana* *SEC61γ* subunit transcript in cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-002-06)
 - 20 Supplement to “AtSEC61γ subunit protein expression in cultivance soybean event 127. (Report No. BPS-010-07A)”
 - 21 Bioinformatics analysis of deduced amino acid sequences of *Arabidopsis thaliana* *ahas1* and *SEC61γ* from herbicide-tolerant soybean BPS-CV127-9 for allergenicity and toxicity potential. (Report No. BPS-014-08)
 - 22 Digestive fate of test substance *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (Lot#AtAHAS-0107) and AtAHAS produced in imidazolinone herbicide tolerant soybean BPS-CV127-9. (Report No. BPS-012-07A)
 - 23 Characterization of test substance *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (Lot# AtAHAS-0107). (Report No. BPS-011-07)
 - 24 Characterization of AtAHAS protein produced in imidazolinone- tolerant soybean BPS-CV127-9 and comparison with AtAHAS protein expressed in recombinant *Escherichia coli*. (Report No. BPS-013-07)
 - 25 Digestive fate of *Arabidopsis* *SEC61γ* subunit protein. (Report No. BPS-002-08)
 - 26 Supplement to “Digestive fate of test substance *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase (Lot#AtAHAS-0107) and AtAHAS produced in imidazolinone herbicide tolerant soybean BPS-CV127-9. (Report No. BPS-012-07A)”
 - 27 Supplement to “Digestive fate of *Arabidopsis* *SEC61γ* subunit protein. (Report No. BPS-002-08).”
 - 28 Supplement to “Heat stability of *Arabidopsis* acetohydroxyacid synthase present in test

- substance AtAHAS-0107. (Report No. BPS-018-07)”
- 29 Heat stability of Arabidopsis acetohydroxyacid synthase present in test substance AtAHAS-0107. (Report No. BPS-018-07)
 - 30 Heat stability of Arabidopsis SEC61γ subunit protein. (Report No. BPS-002-10)
 - 31 Compositional analysis of grain from imidazolinone-tolerant soybean BPS-CV127-9 produced in Brazil in 2006/2007 and comparison with that from isoline control and conventional soybean varieties. (Report No. BPS-015-07A)
 - 32 Compositional analysis of grain from imidazolinone-tolerant soybean BPS-CV127-9 produced in Brazil in 2007 and comparison with that from isoline control and conventional soybean varieties. (Report No. BPS-012-08)
 - 33 Supplement to “Compositional analysis of grain from imidazolinone-tolerant soybean BPS-CV127-9 produced in Brazil in 2006/2007 and comparison with that from isoline control and conventional soybean varieties. (Report No. BPS-015-07A)” and “Compositional analysis of grain from imidazolinone-tolerant soybean BPS-CV127-9 produced in Brazil in 2007 and comparison with that from isoline control and conventional soybean varieties. (Report No. BPS-012-08)”
 - 34 ガスクロマトグラフィで検出可能な脂肪酸