

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤
グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統**

**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	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
(1)	遺伝的素材に関する事項	4
(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	5
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	6
(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	6
(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	6
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(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	7
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	7
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	7
4	ベクターに関する事項	7
(1)	名称及び由来に関する事項	7
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	8
(4)	伝達性に関する事項	8
(5)	宿主依存性に関する事項	8
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	8
(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	8
5	挿入遺伝子に関する事項	8

（１） 供与体に関する事項.....	8
（２） 遺伝子の挿入方法に関する事項.....	9
（３） 構造に関する事項.....	9
（４） 性質に関する事項.....	9
（５） 純度に関する事項.....	1 2
（６） コピー数に関する事項.....	1 2
（７） 安定性に関する事項.....	1 3
（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 4
（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 5
（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.....	2 0
（７） 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	2 1
（８） 不活化法に関する事項.....	2 1
（９） 外国における認可等に関する事項.....	2 1
（１０） 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	2 1
（１１） 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	2 1
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.....	2 1
IV 審議結果.....	2 1
V 参考文献及び参考資料.....	2 1

「低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統」
に係る安全性確認

I はじめに

低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統 (以下「MON87705 ダイズ」という。) について、平成 23 年 10 月 4 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 : 低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 系統
性質 : 低飽和脂肪酸及び高オレイン酸含有並びに除草剤グリホサート耐性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

10

MON87705 ダイズは、種子中の飽和脂肪酸の含有量を抑え、オレイン酸の含有量を高めることを目的として、*FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の部分的な配列 (以下、「*FAD2-1A* 遺伝子断片」及び「*FATB1-A* 遺伝子断片」という。) が導入されている。*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片はダイズに由来し、それぞれ $\Delta 12$ デサチュラーゼ及びパルミトイルアシルキャリアーたん白質チオエステラーゼをコードする遺伝子の一部である。MON87705 ダイズでは、これらの遺伝子断片によって生じる RNAi¹により $\Delta 12$ デサチュラーゼ及びパルミトイルアシルキャリアーたん白質チオエステラーゼの発現を抑制する。その結果、ダイズ種子における飽和脂肪酸のパルミチン酸及びステアリン酸並びに二価不飽和脂肪酸のリノール酸の

15

20

含量が減少し、単価不飽和脂肪酸のオレイン酸の含量が高まる。
また、MON87705 ダイズには、選抜マーカーとして *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。グリホサートは EPSPS たん白質の働きを阻害することで除草活性を示すが、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS たん白質は、グリホサートの影響を受けないため、MON87705 ダイズはグリホサートに対する耐性を獲得する。

25

MON87705 ダイズと既存のダイズを比較したところ、遺伝子組換え操作により付

¹ RNAi (RNA interference, RNA 干渉)は、真核生物における遺伝子発現調節機構の一つ。

概要 : ①二本鎖 RNA(dsRNA)が Dicer と呼ばれる酵素により切断され、21~26 塩基の siRNA (small interfering RNA)が形成される。②siRNA は RNAi-induced silencing complex (RISC)と結合した後、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する。③RISC により、siRNA と結合した mRNA は分解され、たん白質の産生が阻害される(Kusaba, 2004、Siomi and Siomi, 2009)。

RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制効果も高いことから、特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている(Kusaba, 2004)。

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、MON87705 ダイズが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。

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

MON87705 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 A3525 である。

MON87705 ダイズには、ダイズに由来する *FAD2-1A* 遺伝子断片、*FATB1-A* 遺伝子断片及び *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する *cp4 epsps* 遺伝子の一部を改変した改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。

MON87705 ダイズ中に導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片によって生じる RNAi により、ダイズ中の脂肪酸生合成に関わる二つの酵素をコードする、内在性の *FAD2* 遺伝子²と *FATB* 遺伝子³のジーンサイレンシング⁴を誘導し、それぞれの酵素の発現を抑制する。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS たん白質を発現することにより、MON87705 ダイズに除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。その性質を利用し、MON87705 ダイズ作出時に選抜マーカーとして使用している。

(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、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。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON87705 ダイズ及び非組換えダイズの主要構成成分（水分、炭水化物、たん白質、脂質、灰分、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維）、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類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、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が明らかとなっており、それらを比較することによる差異の有無の確認が可能である(OECD, 2001、ILSI, 2006)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

² *FAD2* 遺伝子には *FAD2-1* 遺伝子及び *FAD2-2* 遺伝子の 2 つのサブファミリーが含まれる。なお、*FAD2-1A* 遺伝子は *FAD2-1* 遺伝子に存在するサブファミリーの一つである。

³ *FATB* 遺伝子には *FATB1* 遺伝子及び *FATB2* 遺伝子の 2 つのサブファミリーが含まれる。なお、*FATB1-A* 遺伝子は *FATB1* 遺伝子に存在するサブファミリーの一つである。

⁴ ジーンサイレンシング：遺伝子からたん白質の発現が抑制されること。遺伝子抑制ともいう。

MON87705 ダイズは、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片が RNAi によりジーンサイレンシングを誘導する結果、種子において低飽和脂肪酸、高単価不飽和脂肪酸(オレイン酸(18:1))、低多価不飽和脂肪酸(リノール酸(18:2))となる。

65 また、MON87705 ダイズに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS たん白質 をコードしており、除草剤グリホサートに対する耐性を植物体に付与している。

70 これらの点を除けば、MON87705 ダイズは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認められない。

(1) ~ (4) により、MON87705 ダイズ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。

75 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON87705 ダイズは食用のダイズ油の汎用性を高める目的で作出された。MON87705 ダイズは、従来のダイズ種子と同様の脂肪酸を含むが、従来のダイズ油に約 23%含まれる単価不飽和脂肪酸(オレイン酸)が約 76%に高められ、それに伴い、従来のダイズ油中に約 60%含まれている多価不飽和脂肪酸(主にリノール酸)が約 80 17%に減少している。また、従来のダイズ油に約 15%含まれる飽和脂肪酸が約 6%に抑えられている。これにより、ダイズ油の酸化安定性の向上及び飽和脂肪酸摂取量の低減が期待できるとしている。なお、飼料としての利用目的及び利用方法については既存のダイズと変わらない。

85 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

MON87705 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 A3525 である。

90 (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。

95 (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、主にトリプシンインヒビター及びレクチンが含まれている他、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含まれていることが知られている(OECD, 2001)。

100 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が(Liener, 1994)、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

一の量はごくわずかであると考えられる(OECD, 2001)。

105 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(Liener, 1994)。

110 なお、ダイズは長い食経験の中で、これまでに内在性の有害生理活性物質によりヒトや動物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、ダイズが家畜等に寄生又は定着することはない。

115 (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(Faghihi and Ferris, 2006、Dorrance *et al.*, 2007、Pedersen, 2008)。

120 (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

125 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(Caviness, 1966、OECD, 2000)。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(OECD, 2000)。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(Beversdorf, 1993)。

130 *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(Hymowitz, 2004)。

135 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

140 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。中でも約48%のたん白質と1.5%以下の脂質が含まれる大豆油かすは(SMIC, 2006)、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。

我が国では、2009年度に配合飼料として約342万トンの全粒ダイズ及びダイズ

由来の飼料が原料として用いられており、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利用されている（飼料月報, 2010）。

145 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

ダイズにはトリプシンインヒビター及びレクチン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。

150 (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(TeKrony *et al.*, 1987)、寒さに弱いため(Raper and Kramer, 1987)、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。休眠性がないため、適切な温度と湿度であればダイズ種子はすぐに発芽し、自生植物として生育する。しかし、このような自生植物は秋冬の霜により枯死する。仮にこのようなこぼれ落ち種子が自生したとしても、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(OECD, 2000)。

155

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

160

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. et Zucc.) が知られている。ツルマメは主に河川敷や前植生が攪乱された工場跡地や畑の周辺、その他、日当たりの良い野原や道端に自生している（浅野, 1995、高橋ら, 1996、沼田ら, 1997、大橋, 1999）。

165

ダイズの祖先であるツルマメにはトリプシンインヒビター(Mies and Hymowitz, 1973、Natarajan *et al.*, 2007、Wang *et al.*, 2008)、ラフィノースやスタキオース(Hymowitz and Collins, 1974) 及びフィチン酸(Raboy and Dickinson, 1993) 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ことが知られている。

4 ベクターに関する事項

170

(1) 名称及び由来に関する事項

ベクターB は MON87705 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の中間プラスミドである（参考資料 1）。ベクターB 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。

175

(2) 性質に関する事項

ベクターB の各構成要素の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかにされている(参考資料 1, 2)。ベクターB の構築に用いられた全ての中間プラスミドは非病原性の *Escherichia coli* 又は *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) に由来するものであり、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。

180

(3) 薬剤耐性に関する事項

185 ベクターB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 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 T-DNA 領域外に含まれており、*E. coli* や *R. radiobacter*(*A. tumefaciens*) 中での選択マーカーとして使用された。なお、*aadA* 遺伝子が作出された MON87705 ダイズ中に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。

190 (4) 伝達性に関する事項

ベクターBは伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

(5) 宿主依存性に関する事項

195 導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 には外側骨格領域に広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *ori V* 及び *ori-p* BR322 が組み込まれているが、植物及び家畜等が導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の宿主となることはない。さらに導入遺伝子の解析の結果、MON87705 ダイズ中には、これら複製開始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。

200 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

導入用プラスミドPV-GMPQ/HT4404は、*FAD2-1A*・*FATB1-A*遺伝子発現抑制カセット及び改変*cp4 epsps*遺伝子発現カセットを含むT-DNAI及びT-DNAIIを有している(参考資料1)。導入用プラスミドPV-GMPQ/HT4404は、中間プラスミドであるベクターB~Fを用いて作出されている(参考資料 2)。

205 (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

MON87705 ダイズはアグロバクテリウム法を用いて導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 を従来商業ダイズ品種 A3525 に導入することにより作出された。挿入しようとする遺伝子の発現ベクター内の位置については明らかとなっている。

210 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

215 MON87705 ダイズに導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片は、宿主であるダイズ (*G. max*) に由来する。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、土壌細菌の *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

② 安全性に関する事項

ダイズ (*G. max*) には安全に飼料利用された長い経験がある。

220 また、*Agrobacterium* sp. CP4 株は土壌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

225 MON87705 ダイズは、導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 をアグロバクテリウム法により従来商業ダイズ品種 A3525 の分裂組織に導入することで作出した。

分裂組織と導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 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分裂組織を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及びセフトキシムを添加してアグロバクテリウムを除去した。

230 その後、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。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

235 *FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットは、*7Sa'* プロモーターによりその発現が制御されている。*7Sa'* プロモーターは、*G. max* の β -コングリシニン貯蔵たん白質(alpha'-bcsp)をコードする *Sphas1* 遺伝子に由来する種子特異的プロモーターである (Doyle *et al.*, 1986)。なお、*7Sa'* プロモーターは主に種子の登熟期に働くプロモーターであり、完熟種子での発現は比較的低いことが報告されている (Chen *et al.*, 1986、Allen *et al.*, 1989、Wang and Dubois, 2004)。

240 改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *FMV/EF1- α* プロモーターによりその発現を制御されている。*FMV/EF1- α* プロモーターは、シロイヌナズナの伸長因子 EF-1 alpha をコードする *EF1- α* 遺伝子プロモーター (Axelos *et al.*, 1989) に Figwort Mosaic virus 35S RNA プロモーターのエンハンサー配列 (Richins *et al.*, 1987) を結合させたキメラプロモーターである。

② ターミネーターに関する事項

250 *FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットの *H6* ターミネーターは、二次細胞壁の形成に関わる繊維たん白質をコードしている *Gossypium barbadense* に由来する *H6* 遺伝子の 3'非翻訳領域配列であり、転写を終結させる (John and Keller, 1995)。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子の *E9* ターミネーターは *Pisum sativum* の *RbcS2* 遺伝子由来の *E9* 遺伝子の 3'非翻訳領域配列であり、転写を終結させる (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

255 導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の各構成要素の機能は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

260 導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 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。*FAD2-1A* 遺伝子断片、*FATB1-A* 遺伝子断片及び改変 *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>cp4epsps</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA I)	
<i>FMV/EF-1α</i> プロモーター	<i>A. thaliana</i> に由来する <i>EF-1α</i> プロモーター (Axelos <i>et al.</i> , 1989) に Figwort Mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーターのエンハンサー配列 (Richins <i>et al.</i> , 1987) を結合させたキメラプロモーター。全組織での目的遺伝子の恒常的な発現に関与する。
<i>EF-1α</i> リーダー配列	<i>A. thaliana</i> に由来する翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>EF-1α</i> 遺伝子のリーダー配列 (exon 1) (Axelos <i>et al.</i> , 1989)
<i>EF-1α</i> イントロン配列	<i>A. thaliana</i> に由来する翻訳伸長因子 EF-1 alpha をコードする <i>EF-1α</i> 遺伝子のイントロン配列 (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	<i>A. thaliana</i> に由来する <i>ShkG</i> 遺伝子の、葉緑体輸送ペプチドをコードしている配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987)。改変 CP4 EPSPS たん白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株に由来する <i>aroA</i> 遺伝子の、CP4 EPSPS たん白質をコードしている配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996、 Barry <i>et al.</i> , 1997)
<i>E9</i> ターミネーター	<i>P. sativum</i> に由来するリブ羅斯-1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS2</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域。mRNA のポリアデニル化を誘導する (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)
<i>FAD2-1A</i> ・ <i>FATB1-A</i> 遺伝子発現抑制カセット (T-DNA I)	
<i>7Sd</i> プロモーター	<i>G. max</i> に由来する、β-コングリシニン貯蔵たん白質 (alpha'-bcs) をコードする <i>Sphas1</i> 遺伝子のプロモーター及びリーダー配列 (Doyle <i>et al.</i> , 1986)。種子における転写を誘導する。
<i>FAD2-1A</i> 遺伝子部分配列	<i>G. max</i> に由来する、Δ12 デサチュラーゼをコードする <i>FAD2-1A</i> 遺伝子のイントロン#1 の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
<i>FATB1-A</i> 遺伝子部分配列	<i>G. max</i> に由来する、パルミトイルアシルキャリアたん白質チオエステラーゼをコードする <i>FATB1-A</i> 遺伝子の 5'非翻訳領域及び色素体ターゲティング配列の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
<i>FAD2-1A</i> ・ <i>FATB1-A</i> 遺伝子発現抑制カセット (T-DNA II)	
<i>H6</i> ターミネーター	<i>G. barbadense</i> に由来する、二次細胞壁の形成に関わる繊維たん白質をコードしている <i>H6</i> 遺伝子の 3'非翻訳領域配列 (John and Keller, 1995)。転写を終結させる。
<i>FAD2-1A</i> 遺伝子部分配列	<i>G. max</i> に由来する、Δ12 デサチュラーゼをコードする <i>FAD2-1A</i> 遺伝子のイントロン#1 の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。
<i>FATB1-A</i> 遺伝子部分配列	<i>G. max</i> に由来する、パルミトイルアシルキャリアたん白質チオエステラーゼをコードする <i>FATB1-A</i> 遺伝子の 5'非翻訳領域及び色素体ターゲティング配列の部分配列 (Fillatti <i>et al.</i> , 2003)。

① *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の機能

ダイズ種子中の脂肪酸合成経路の概要を図 1 に記載した。

FATB 遺伝子がコードするアシル-ACP チオエステラーゼは、プラスチドに局在し、飽和脂肪酸残基を持つアシル-ACP を加水分解する (Voelker and Kinney, 2001)。その加水分解により、飽和脂肪酸は ACP から切り離され、それ以上炭素鎖が伸長されなくなる。また、*FAD2* 遺伝子がコードする $\Delta 12$ デサチュラーゼは、小胞体においてオレイン酸をリノール酸に不飽和化する。

MON87705 ダイズでは、*FAD2-1A*・*FATB1-A* 遺伝子発現抑制カセットから転写される mRNA の RNAi により、ジーンサイレンシングが誘導され、ダイズの内在性遺伝子である *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝子の発現がそれぞれ抑制される。アシル-ACP チオエステラーゼをコードする *FATB* 遺伝子の発現が抑制されることにより、飽和脂肪酸は ACP から切り離されなくなるため、炭素鎖伸長反応が継続する。また、*FAD2* 遺伝子から $\Delta 12$ デサチュラーゼへの発現が抑制されることにより、オレイン酸からリノール酸への不飽和化が抑制される。これらの結果、オレイン酸含量が高まる。

表 2 のとおり、MON87705 ダイズから得られるダイズ油は従来のダイズ油と比較して、飽和脂肪酸であるパルミチン酸及びステアリン酸が減少していること、オレイン酸が増加し、それに伴いリノール酸が減少していることが確認された。

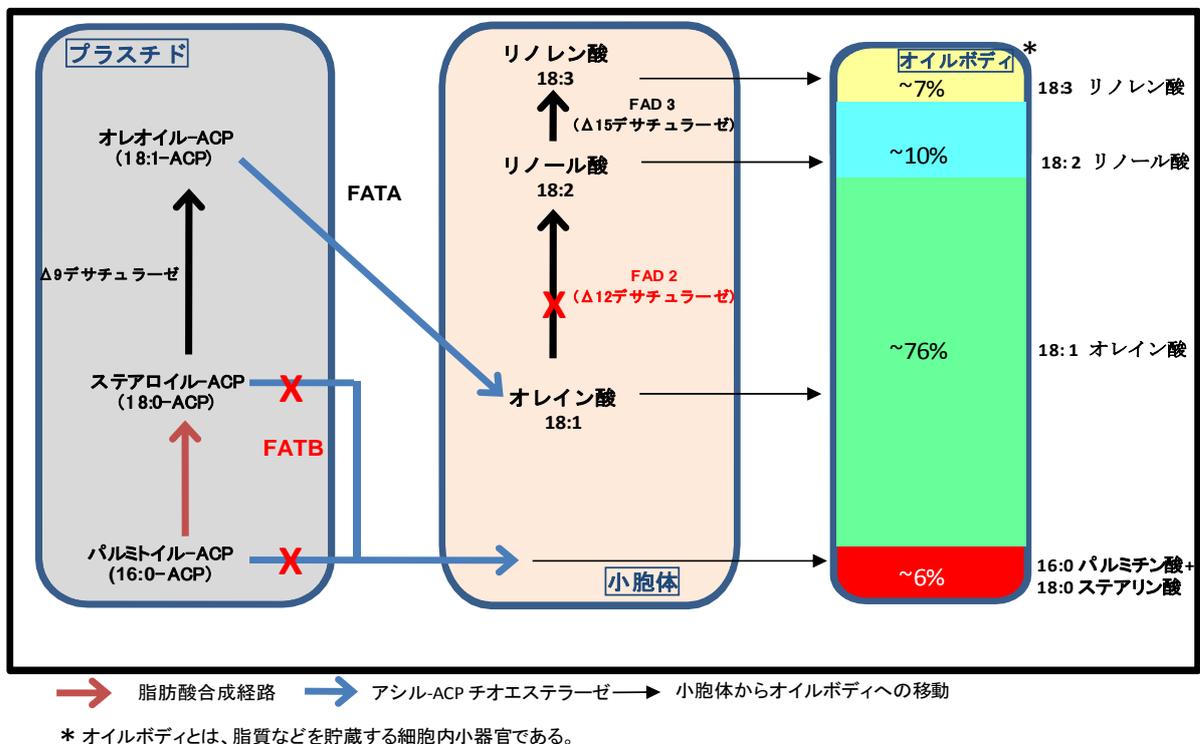


図 1 ダイズ種子中における脂肪酸生合成経路の模式図

×は、MON87705 ダイズの種子において内在性酵素 (*FATB* 及び *FAD2*) の mRNA から

の翻訳が抑制されることを示す。

表 2 導入遺伝子の働きにより影響を受けると考えられた脂肪酸の含有量¹

	全脂肪酸に占める割合 (%)		p-値
	MON87705 系統 平均値 (S.E.) ² [範囲]	A3525 平均値 (S.E.) [範囲]	
16:0 パルミチン酸	2.36 (0.056) [2.25 - 2.44]	10.83 (0.056) [10.51 - 11.08]	<0.001
18:0 ステアリン酸	3.31 (0.067) [3.07 - 3.82]	4.50 (0.067) [4.24 - 4.85]	<0.001
18:1 オレイン酸	76.47 (0.59) [73.13 - 79.17]	22.81 (0.59) [21.41 - 25.08]	<0.001
18:2 リノール酸	10.10 (0.39) [7.85 - 12.42]	52.86 (0.39) [51.68 - 53.89]	<0.001

¹チリの 5 ヲ所のは場から得られたサンプルについて分析を行った (n=5)。

²S.E. = 標準誤差

295

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(Steinrücken and Amrhein, 1980、 Haslam, 1993)。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改変 CP4 EPSPS たん白質が除草剤グリホサートと結合しないことから、芳香族アミノ酸を生産し続けることができる(Padgett *et al.*, 1996)。

300

305

(5) 純度に関する事項

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(参考資料 3)。

310

(6) コピー数に関する事項

MON87705 ダイズにおける導入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導入遺伝子領域以外の領域(外側骨格領域)の有無を確認するため、サザンブロット分析を実施した。また、導入遺伝子の塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列が PV-GMPQ/HT4404 中の対応する塩基配列と同一か確認した。更に、導入遺伝子挿入部位の解析から、挿入部位におけるダイズ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことを確認した。

315

サザンブロット分析の結果、MON87705 ダイズ中のゲノム DNA の 1 ヲ所に、1

320 コピーの T-DNAI 中の *FAD2-1A/FATB1-A* 遺伝子断片と T-DNAII 中の *FAD2-1A/FATB1-A* 遺伝子断片が逆方向反復の形で隣接して導入されていること及び外側骨格領域は導入されていないことが確認された。また、T-DNA 領域及び外側骨格領域由来の意図しない遺伝子断片が導入されていないことも確認された(参考資料 5)。

325 塩基配列解析を行った結果、MON87705 ダイズ中の導入遺伝子と、導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 の T-DNA I 領域及び T-DNA II 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された(参考資料 5)。

330 導入遺伝子の 5'末端に 36 bp の欠損及びダイズゲノム由来と考えられる 2,374 bp の付加があることが確認された。しかし、BLASTn 及び BLASTx による近傍配列の分析結果から、T-DNAI 及び T-DNAII の導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確認された。(参考資料 5、8)。

(7) 安定性に関する事項

335 導入遺伝子が複数世代に安定して遺伝しているか確認するため、4 世代の MON87705 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実施したところ、T-DNAI 領域及び T-DNAII 領域が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された(参考資料 5)。

340 また、MON87705 ダイズ中に導入された遺伝子によって改変された脂肪酸組成が複数世代の MON87705 ダイズで安定して遺伝しているか確認するため、4 世代の種子の脂肪酸組成分析を行った。その結果、4 世代の種子の全てで意図された脂肪酸組成が確認された(参考資料 20)。

345 次に、改変 CP4 EPSPS たん白質が複数世代で安定して発現しているか確認するため、4 世代の MON87705 ダイズを用いて改変 CP4 EPSPS たん白質のウェスタンブロット分析を実施したところ、複数世代にわたり安定して発現していることが確認された(参考資料 6)。

350 さらに、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MON87705 ダイズを用いてインベーター分析により *H6* ターミネーターの有無を確認し、カイ二乗検定により期待値との比較を実施したところ、MON87705 ダイズ中の導入遺伝子がメンデルの法則に従って後代に遺伝していることが確認された(参考資料 7)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

355 MON87705 ダイズでは、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片によって生じる RNAi によりジーンサイレンシングを誘導することで、内在性の *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の発現が抑制されると考えられる。内在性の *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するため、2 世代の MON87705 ダイズ及び非組換えダイズ A3525 の未熟種子から単離した mRNA についてノーザンブロット分析を行った。

その結果、MON87705 ダイズの未熟種子における *FAD2-1A* 遺伝子及び

360 *FATB1-A* 遺伝子の RNA 量は、対照の非組換えダイズ A3525 と比べると大幅に減少していたことから、MON87705 ダイズにおいて *FAD2-1A* 遺伝子及び *FATB1-A* 遺伝子の発現が抑制されていると考えられた。一般的にジーンサイレンシングを誘導させるために転写された mRNA は分解されることが知られており
365 (Waterhouse and Helliwell, 2003、Baulcombe, 2004)、二本鎖 RNA は構造的にリボソームでの翻訳が阻害されるため(Kozak, 1989)、二本鎖 RNA から新たなたん白質が産生されるとは考えにくい。これらのことから、MON87705 ダイズで発現する *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片からたん白質に翻訳されるとは考えにくいため、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片由来のたん白質の発現量測定は行っていない。

370 MON87705 ダイズ (葉、地上部、根、種子) における改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を ELISA 法により測定した結果、全ての組織サンプルから改変 CP4 EPSPS たん白質が検出された(参考資料 9)。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

375 導入用プラスミド PV-GMPQ/HT4404 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 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (AAD) をコードしている *aadA* 遺伝子が外側骨格領域に存在している (Fling *et al.*, 1985)。なお、5 の (7) に記載したとおり、MON87705 ダイズには外側骨格領域が存在しないことが確認されている。

380 (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

MON87705 ダイズ中の導入遺伝子と付加配列を含む 5'末端側境界配列及び 3'末端側境界配列についてストップコドン (TGA, TAG, TAA) を検索し、導入遺伝子領域のストップコドンから近傍のダイズゲノムのストップコドンまでの配列を ORF
385 と仮定し検索したところ、12 個の ORF が確認された。これら 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結果、相同性を示す配列は検出されなかった (参考資料 10、11)。

390 また、MON87705 ダイズ中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、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(参考資料 12)。

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

395 MON87705 ダイズには、*FAD2-1A* 遺伝子断片、*FATB1-A* 遺伝子断片及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。MON87705 ダイズの種子は、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片によって生じる RNAi の結果、低飽和脂肪酸、高

400 単価不飽和脂肪酸(オレイン酸(18:1))、低多価不飽和脂肪酸(リノール酸(18:2))となる。また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、改変 CP4 EPSPS たん白質 をコードしており、MON87705 ダイズに除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

以上の点を除けば、MON87705 ダイズは従来のダイズと相違は認められず、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

405 MON87705 ダイズには *FATB1-A* 遺伝子断片及び *FAD2-1A* 遺伝子断片並びに改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されているが、*FATB1-A* 遺伝子断片及び *FAD2-1A* 遺伝子断片については、前述のとおり (5の(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項)、たん白質に翻訳されているとは考えにくいため、*FATB1-A* 遺伝子断片及び *FAD2-1A* 遺伝子断片について毒性の評価から除外した。

410 改変 CP4 EPSPS たん白質が既知の毒素と機能上重要なアミノ酸配列を共有するか毒性たん白質データベースを用いた相同性検索により確認したところ、改変 CP4 EPSPS たん白質は既知の毒素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的に類似性のある配列は共有していなかった(参考資料 4)。

415 (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

420 *FATB1-A*・*FAD2-1A* 遺伝子発現抑制カセットについてはたん白質に翻訳されているとは考えにくいため、本項に関する考察は改変 CP4 EPSPS たん白質についてのみ *E. coli* で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質を用いて以下の①～③の検討を行った(参考資料 13、14、15、16)。なお、*E. coli* から調製した改変 CP4 EPSPS たん白質と MON87705 ダイズ中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質の同等性に関しては、免疫反応性 (ウエスタンブロット分析)、SDS-PAGE、グリコシル化状態及び機能活性により確認している(参考資料 14)。

① 人工胃液に対する感受性(参考資料 14)

425 SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析を用いて、改変 CP4 EPSPS たん白質の人工胃液 (SGF) 中での消化性を評価した。その結果、SDS-PAGE では改変 CP4 EPSPS たん白質の 98%以上が 15 秒以内に消化されることが確認され、ウエスタンブロット分析では、同様に 95%以上が人工胃液中で 15 秒以内に消化されることが確認されたことから、改変 CP4 EPSPS たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが示された。

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(参考資料 15)

435 人工腸液 (SIF) 中における改変 CP4 EPSPS たん白質の消化をウエスタンブロット分析により評価した。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質は、試験開始後 32 分後には試験開始直後と比較してシグナルが減少し、試験開始後 100 分以降には検出されなかった。

③ 加熱処理(参考資料 16)

440 改変 CP4 EPSPS たん白質の加熱処理感受性を評価するため、改変 CP4
EPSPS たん白質を加熱処理し ELISA 分析により評価した。その結果、改変
CP4 EPSPS たん白質は、非加熱時と比べ、75 °C 以上・30 分間の加熱処理に
より免疫反応性を失うことが確認された。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

445 MON87705 ダイズでは、*FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片によ
って生じる RNAi によりダイズの内在性遺伝子である *FAD2* 遺伝子と *FATB* 遺伝
子の発現をそれぞれ抑制している。*FATB* 遺伝子の発現が抑制されることにより、
アシル-ACP チオエステラーゼが触媒する ACP の加水分解が抑制されるため、飽
450 和脂肪酸が ACP から切り離されなくなる。それにより炭素鎖伸長反応が継続し、
飽和脂肪酸が減少し、オレイン酸の生成が促進される。また、*FAD2* 遺伝子の発現
が抑制されることにより、 $\Delta 12$ デサチュラーゼが触媒するオレイン酸からリノール
酸への不飽和化が抑制されるため、オイルボディに占めるオレイン酸含量が高ま
るとしている。

455 MON87705 ダイズへ導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断
片によって生じる RNAi による目的外の遺伝子の発現の影響の有無をバイオイン
フォマティクス解析 (参考資料 18) 及びノーザンブロット分析 (参考資料 19) に
より確認したところ、

460 ① *FAD2-1A* 遺伝子断片は、目的遺伝子である *FAD2-1A* 遺伝子に加えて、*FAD2-1B*
1B 遺伝子と *FAD2-2* 遺伝子の発現も抑制するが、*FAD2-1B* 遺伝子と *FAD2-2*
遺伝子は、目的遺伝子である *FAD2-1A* 遺伝子と同じサブファミリーに属し、同
じ $\Delta 12$ デサチュラーゼをコードすることが知られている (Schlueter *et al.*, 2006)
ことから、これらの遺伝子の発現が抑制されても、オレイン酸(18:1)からリノール
酸(18:2)への不飽和化が抑制される以外の影響は起こらないと考えられた。

465 ② 同様に、*FATB1-A* 遺伝子断片については、目的遺伝子である *FATB1-A* 遺伝子
に加えて、*FATB1-B* 遺伝子及び *FATB2* 遺伝子の発現も抑制するが、*FATB1-
B* 遺伝子及び *FATB2* 遺伝子は、目的遺伝子である *FATB1-A* 遺伝子と同じサブ
ファミリーに属し、同じアシル-ACP チオエステラーゼをコードすることが知ら
470 れている (Schmutz *et al.*, 2010) ことから、仮に *FATB1-B* 遺伝子及び *FATB2* 遺
伝子の発現が抑制されても、オレイン酸(18:1)の生成が促進される以外の影響は
起こらないと考えられた。

これらのことから、MON87705 ダイズに導入された *FAD2-1A* 遺伝子断片及び
FATB1-A 遺伝子断片によって生じる RNAi は、目的外の代謝系に影響を及ぼすこ
とはないと考えられた。

475 なお、MON87705 ダイズと対照の非組換えダイズの地上部及び種子の構成成分
分析では、目的の脂肪酸組成の改変を除き、MON87705 ダイズの種子及び地上部
は、従来ダイズと同等の組成であり(6の(5) 宿主との差異に関する事項参照)、
FAD2-1A 遺伝子断片及び *FATB1-A* 遺伝子断片によって生じる RNAi に起因する
目的外の構成要素の変化は確認されなかった。

480 また、MON87705 ダイズでは改変 *cp4 epsps* 遺伝子により、改変 CP4 EPSPS
たん白質が発現される。EPSPS は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合
成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の 1 つであり、植物の葉緑体又は色素
485 体中存在する (della-Cioppa *et al.*, 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の
5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である (Haslam, 1974、
Haslam, 1993)。一方、EPSPS はシキミ酸経路における律速酵素ではなく (Weiss
and Edwards, 1980、 Herrmann and Somerville, 1983)、EPSPS 活性が増大し
ても、芳香族アミノ酸の濃度が高まるとの報告はない (Smart *et al.*, 1985、参考
資料 17)。したがって、内在性の EPSPS と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS
たん白質が発現することによって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能
490 性は極めて低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON87705 ダイズと従来のダイズとの差異を評価するため、2007~2008 年にチ
リの 5 箇所のは場において栽培した MON87705 ダイズ、対照の非組換えダイズ品
495 種 A3525 及び商業栽培品種 20 種の栽培試験を行い、収穫された種子及び地上部
を用いて、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ビタミン類及び
⑤有害生理活性物質の分析を行った(参考資料 17)。

① 主要構成成分

500 種子及び地上部の主要構成成分 (水分、たん白質、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、いずれの成分も対照の非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培
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。

② 脂肪酸組成

505 定量及び統計解析が可能であった、種子中の 9 種の脂肪酸(パルミチン酸、ス
テアリン酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、アラキジン酸、エイコセ
ン酸、ベヘン酸及びリグノセリン酸)のうち、ベヘン酸及びリグノセリン酸を除
く 7 種の脂肪酸について統計学的有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

MON87705 ダイズでは、ダイズ内在性の *FAD2* 遺伝子及び *FATB* 遺伝子の
510 それぞれが発現を抑制されることにより、飽和脂肪酸 (パルミチン酸(16:0)及び
ステアリン酸(18:0)) の含有量が減少し、オレイン酸(18:1)含量が増加し、リノ
ール酸(18:2)の含有量が減少する。構成成分分析の結果について対照品種と
MON87705 ダイズを比較すると、種子中の総脂肪酸に占めるパルミチン酸
(16:0)の割合が、10.83%(対照品種)から 2.36%(MON87705 ダイズ)へ、ステア
515 リン酸(18:0)については 4.50%から 3.31%へそれぞれ減少した。これにより、
総飽和脂肪酸としては約 15.3%から 5.7%へ減少した。MON87705 ダイズのパ
ルミチン酸(16:0)は、参考として供試した従来商業品種の許容区間 (99%T.I.)及
び ILSI データベースの範囲を外れていた。一方、ステアリン酸(18:0)は

99%T.I.の下限を外れていたものの ILSI データベースの範囲内に収まっていた。

520 また、オレイン酸(18:1)の総脂肪酸に占める割合は 22.81% (対照品種)から 76.47% (MON87705 ダイズ)へ増加した。この変化に伴い、リノール酸(18:2)の総脂肪酸に占める割合が 52.86%から 10.10%へ減少していることも確認された。なお、MON87705 ダイズのオレイン酸(18:1)及びリノール酸(18:2)は、99%T.I.及び ILSI データベースの範囲を外れていた。

525 残り 3 種の有意差が認められた脂肪酸(リノレン酸、アラキジン酸及びエイコセン酸)のうち、MON87705 ダイズにおけるリノレン酸(18:3)含量は対照品種よりも有意に低かったが、この値は商業品種の許容区間 (99%T.I.)に収まっていた。なお、リノレン酸は、*FAD2* 遺伝子の抑制により減少するリノール酸(18:2)から生成されることから、その含有量の減少は予想されたものであった。

530 また、MON87705 ダイズにおけるアラキジン酸(20:0)含量は対照品種よりも有意に低かったが、この値は商業品種の許容区間 (99%T.I.)に収まっていた。

535 MON87705 ダイズにおけるエイコセン酸(20:1)含量は、対照品種よりも有意に高く、その含有量の平均値 (総脂肪酸の 0.34% [範囲 0.27~0.40%]) は許容区間 (99%T.I.) の上限 (総脂肪酸の 0.25%) をわずかに外れていた。しかし、その含有量の平均値は ILSI データベースの範囲内に収まっており、コーデックス委員会が報告しているダイズ油のエイコセン酸(20:1)含量の最大値(総脂肪酸の 0.5%)を下回っていた(Codex, 2011)。なお、エイコセン酸(20:1)の生合成経路については、メドウフォーム(*Limnanthes* spp.)で $\Delta 5$ デサチュラーゼによりアラキジン酸(20:0)がエイコセン酸(20:1)に不飽和化される経路、またホホバ(*Simmondsia chinensis*)で脂肪酸伸長酵素によりオレイン酸(18:1)がエイコセン酸(20:1)に伸長する経路が報告されている(Voelker and Kinney, 2001)が、*FAD2* 遺伝子がコードする $\Delta 12$ デサチュラーゼがオレイン酸以外の一価不飽和脂肪酸(エイコセン酸(20:1)を含む)を基質とするとは報告されていないことから、MON87705 ダイズのエイコセン酸(20:1)含量の有意な増加は、オレイン酸(18:1)の含有量の増加に伴うものであると考えられた。

540

545

表 3 MON87705 ダイズ及び対照品種 A3525 の種子における脂肪酸分析の結果

分析成分 (単位) ¹	MON87705 ダイズ	A3525	p-値 ³	商業品種	ILSI ⁵
	平均値 (S.E.) ² [範囲]	平均値 (S.E.) [範囲]		(範囲)	(範囲)
脂肪酸 (% 全 FA)				[99% Tol. Int. ⁴]	
16:0 パルミチン酸	2.36 (0.056) [2.25 - 2.44]	10.83 (0.056) [10.51 - 11.08]	<0.001*	(8.78 - 11.51) [7.62, 12.55]	9.55 - 15.77
18:0 ステアリン酸	3.31 (0.067) [3.07 - 3.82]	4.50 (0.067) [4.24 - 4.85]	<0.001*	(3.82 - 7.21) [2.87, 7.15]	2.70 - 5.88
18:1 オレイン酸	76.47 (0.59) [73.13 - 79.17]	22.81 (0.59) [21.41 - 25.08]	<0.001*	(20.77 - 27.19) [18.40, 30.22]	14.3 - 32.2

分析成分 (単位) ¹	MON87705 ダイズ	A3525	p-値 ³	商業品種	ILSI ⁵
	平均値 (S.E.) ² [範囲]	平均値 (S.E.) [範囲]		(範囲)	(範囲)
18:2 リノール酸	10.10 (0.39) [7.85 - 12.42]	52.86 (0.39) [51.68 - 53.89]	<0.001*	(48.62 - 54.74) [47.75, 56.46]	42.3 - 58.8
18:3 リノレン酸	6.69 (0.28) [5.55 - 7.81]	8.02 (0.28) [6.86 - 8.60]	<0.001*	(5.89 - 9.11) [4.97, 9.93]	3.0 - 12.52
20:0 アラキジン酸	0.30 (0.0076) [0.28 - 0.36]	0.34 (0.0077) [0.31 - 0.36]	0.005*	(0.28 - 0.54) [0.22, 0.53]	0.163 - 0.482
20:1 エイコセン酸	0.34 (0.013) [0.27 - 0.40]	0.19 (0.013) [0.15 - 0.21]	<0.001*	(0.15 - 0.22) [0.13, 0.25]	0.140 - 0.350

¹FA = 脂肪酸; ²S.E. = 標準誤差; ³p<0.05 のとき有意差あり(*)

⁴95%の信頼限界で商業品種集団の99%が含まれるように定めた範囲。下限値は0に設定した。

⁵ILSI Soybean Database, 2006

- 550 構成成分分析の結果、MON87705 ダイズの種子におけるオレイン酸(18:1)の含有量は A3525 と比較して有意に増加し、かつ従来商業品種の 99%T.I.及び ILSI データベースの上限を上回っていた。しかしながら、MON87705 ダイズから得られるダイズ油の脂肪酸組成は、図 2 のとおり既存のダイズ油と比べオレイン酸含量が高く、ナタネ油やオリーブオイル(CODEX, 2003、CODEX, 2005)と同様の脂肪酸組成を持っている。
- 555 高オレイン酸含有のダイズ油を飼料として家畜が摂取したときの安全性については、
- (i) ブロイラーを用いた給餌実験では、高オレイン酸含有のダイズ油を与えたブロイラーは、従来のダイズ油を与えたブロイラーと比べても体重の増加量や飼料の摂取量で違いは認められず、最終的な体重についても統計学的有意差は認められなかった(McNaughton *et al.*, 2008)。
- 560 (ii) また、家畜等の体内脂肪酸組成を改変する目的で高オレイン酸含有の飼料を与えることは一般的に行われており、多くの試験の報告もある(Ashes *et al.*, 1992b、LaCount *et al.*, 1994、Jørgensen *et al.*, 1996、Tymchuk *et al.*, 1998、Onibi *et al.*, 2000、Delbecchi *et al.*, 2001、DePeters *et al.*, 2001、Gulati *et al.*, 2002、Rey *et al.*, 2004、Nuernberg *et al.*, 2005、Hristov *et al.*, 2011、Mohammed *et al.*, 2011、He *et al.*, 2012)。
- 565 (iii) さらに、ラットを用いた 90 日間反復経口(混餌)投与毒性/1 世代生殖毒性試験において、MON87705 ダイズの大豆油かす(約 0.5%の油を含有)を投与したところ、従来の大豆油かすを投与したラットと比較して、健康状態を評価する
- 570 指標には影響は認められていない(参考資料 21)。
- これらのことから、MON87705 ダイズから得られる油に由来するものを飼料として家畜が摂取したとしても飼料としての安全上の問題はないと考えられた。

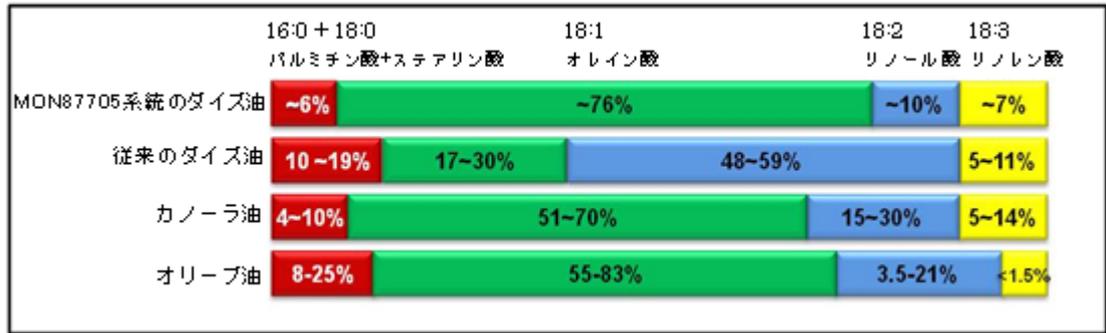


図2 MON87705 ダイズ及びその他植物油の脂肪酸組成の比較

580 MON87705 ダイズの種子及び地上部の構成成分において、パルミチン酸(16:0)、
オレイン酸(18:1)及びリノール酸(18:2)の3つの脂肪酸の変化を除いて従来ダイズ
と同等であることが確認された。また、MON87705 ダイズから得られるダイズ
油は、これまでに安全に使用されてきた歴史を有するナタネ油やオリーブオイル
と同様の脂肪酸組成を持っていることが確認された。これらのことから、
585 MON87705 ダイズで認められたこれらの脂肪酸の変化は家畜の安全性に影響を
与えることはないと考えられた。

③ アミノ酸組成

590 種子中のアミノ酸組成について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非
組換えダイズ品種と同等又は商業栽培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。

④ ビタミン類

595 種子中のビタミン類について分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組
換えダイズ品種と同等又は商業栽培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。

⑤ 有害生理活性物質

600 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、いずれの有害生理活性物質も対照の
非組換えダイズ品種と同等又は商業栽培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。

以上の結果から、MON87705 ダイズには、遺伝子組換えによる意図しない差異は
生じていないことが確認された。

605 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

2003年以來、MON87705 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、MON87705 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。

610 (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、MON87705 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。

615 (8) 不活化法に関する事項

MON87705 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

620 2011 年 1 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。

2011 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。

625 2011 年 10 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。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

作出、育種及び栽培方法について MON87705 ダイズと従来ダイズの違いはない。

630

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON87705 ダイズの種子の製法及び管理方法は、従来ダイズ品種と同じである。

635 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。

IV 審議結果

640 低飽和脂肪酸・高オレイン酸及び除草剤グリホサート耐性ダイズ MON87705 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 参考文献及び参考資料

645 参考文献

- 1 Allen, R.D., François Bernier, Philip A. Lessard, and Roger N. Beachy. 1989. Nuclear Factors Interact with a Soybean β -Conglycinin Enhancer. *Plant Cell* Vol. 1, 623-631
- 2 Ashes, J. R., P. St. Vincent Welch, S. K. Gulati, T. W. Scott, G. H. Brown, and S. Blakely. 1992b.

- Manipulation of the fatty acid composition of milk by feeding protected canola seeds. *Journal of Dairy Science* 75:1090.
- 3 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.
 - 4 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett, and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. U.S.A. Patent 5,633,435. <http://www.patentstorm.us/patents/7214535.html>.
 - 5 Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431:356-363.
 - 6 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.
 - 7 Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6:211-212.
 - 8 Chen, Z.L., M.A. Schuler, and R.N. Beachy. 1986. Functional analysis of regulatory elements in a plant embryo-specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 8560-8564.
 - 9 Codex. 2003. Codex standard for olive oils and olive pomace oils. Codex-STAN 33.
 - 10 Codex. 2005. Codex standard for named vegetable oils. Codex-STAN 210.
 - 11 Codex. 2011. Codex standard for named vegetable oils. Codex-STAN 210.
 - 12 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.
 - 13 DePeters EJ, German JB, Taylor SJ, Essex ST, Perez-Monti H. 2001. Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *Journal of Dairy Science* 84(4):929-936.
 - 14 Delbecchi L, Ahnadi CE, Kennelly JJ, Lacasse P. 2001. Milk fatty acid composition and mammary lipid metabolism in Holstein cows fed protected or unprotected canola seeds. *Journal of Dairy Science* 84(6):1375-1381.
 - 15 Dorrance, A.E., M.A. Draper, and D. Hershman. 2007. Using foliar fungicides to manage soybean rust. Ohio State University, USDA-Csrees and University of Kentucky. <http://oardc.osu.edu/soyrust/2007edition/fungisoyrust.pdf>
 - 16 Doyle, J.J., M.A. Schuler, W.D. Godette, V. Zenger, and R.N. Beachy. 1986. The glycosylated seed storage proteins of *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Biological Chemistry*. 261:9228-9238.
 - 17 Faghihi, J., and V.R. Ferris. 2006. Soybean Cyst Nematode. E-210-W. Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
 - 18 Fillatti, J.J., N.A. Bringe, and K. Dehesh. 2003. Nucleic acid constructs and methods for producing altered seed oil compositions. International Publication Number: WO 2003/080802 A3.
 - 19 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.

- 20 Gulati, S. K., M. R. Garg, and T. W. Scott. 2005. Rumen protected protein and fat produced from oilseeds and/or meals by formaldehyde treatment; their role in ruminant production and product quality: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 45:1189.
- 21 Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in *The shikimate-pathway*. Butterworth & Co, London.
- 22 Haslam, E. 1993. *Shikimic Acid: Metabolism and metabolites*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- 23 He M, Perfield KL, Green HB, Armentano LE. 2012. Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. *Journal of Dairy Science* 95(3):1447-1461.
- 24 Herrmann, K.M., 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in *In Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. K.M. Hermann and R.L. Somerville, (eds.) Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts.
- 25 Hristov AN, Domitrovich C, Wachter A, Cassidy T, Lee C, Shingfield KJ, Kairenius P, Davis J, Brown J. 2011. Effect of replacing solvent-extracted canola meal with high-oil traditional canola, high-oleic acid canola, or high-erucic acid rapeseed meals on rumen fermentation, digestibility, milk production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94(8):4057-74.
- 26 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.) ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, U.S.A.
- 27 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.
- 28 ILSI. 2006. *Crop Composition Database Version 3.0*. International Life Science Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/>
- 29 John, M.E., and G. Keller. 1995. Characterization on mRNA for a proline-rich protein of cotton fiber. *Plant Physiology* 108:669-676.
- 30 Jørgensen, H., S. K. Jensen, and B. O. Eggum. 1996. The influence of rapeseed oil on digestibility, energy metabolism and tissue fatty acid composition in pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science* 46:65.
- 31 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 and General Genetics* 210:437-442.
- 32 Kozak M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eukaryotic mRNAs. *Molecular and Cell Biology* 9:5134-5142.
- 33 Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15:139-143.
- 34 LaCount, D. W., J. K. Drackley, S. O. Laesch, and J. H. Clark. 1994. Secretion of oleic acid in milk fat in response to abomasal infusions of canola or high oleic sunflower fatty acids. *Journal of Dairy Science* 77:1372.

- 35 McNaughton, J., M. Roberts, B. Smith, D. Rice, M. Hinds, C. Sanders, R. Layton, I. Lamb and B. Delaney. 2008. Comparison of Broiler Performance When Fed Diets Containing Event DP-305423-1, Nontransgenic Near-Isoline Control, or Commercial Reference Soybean Meal, Hulls, and Oil. *Poultry Science* 87:2549-2561.
- 36 Mies, D.W., and Hymowitz, T. 1973. Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors of seed of the genus *Glycine*. *Botanical Gazette* 134:121-125
- 37 Mohammed R, McGinn SM, Beauchemin KA. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *Journal of Dairy Science* 94(12):6057-68.
- 38 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.
- 39 Nuernberg, K., K. Fischer, G. Nuernberg, U. Kuechenmeister, D. Klosowska, G. Eliminowska-Wenda, I. Fiedler, and K. Ender. 2005. Effects of dietary olive and linseed oil on lipid composition, meat quality, sensory characteristics and muscle structure in pigs. *Meat Science* 70:63.
- 40 OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.). Merr. (soybean). OECD ENV/JM/MONO(2000) 9.
- 41 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.
- 42 Onibi, G., J. R. Scaife, I. Murray, and V. R. Fowler. 2000. Supplementary α -tocopherol acetate in full-fat rapeseed-based diets for pigs: Influence on tissue α -tocopherol content, fatty acid profiles and lipid oxidation. *Journal of the Science and Food Agriculture* 80:1625.
- 43 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 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*, S.O. Duke, (ed.) CRC Press, New York.
- 44 Pedersen, P. 2006. Iowa State University Extension. http://extension.agron.iastate.edu/soybean/production_planting.html
- 45 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.
- 46 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.
- 47 Rey, A. I., C. J. Lopez-Bote, J. P. Kerry, P. B. Lynch, D. J. Buckley, and P. A. Morrissey. 2004. Modification of lipid composition and oxidation in porcine muscle and muscle microsomes as affected by dietary supplementation of n-3 with either n-9 or n-6 fatty acids and α -tocopheryl acetate. *Animal Feed Science and Technology* 113:223.
- 48 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.
- 49 SMIC (Soybean Meal Information Center). 2006. Soybean processing fact sheet.

<http://www.soymeal.org/pdf/processing3.pdf>

- 50 Schlueter, J.A., Vasylenko-Sanders, I.F., Deshpande, S., Yi, J., Siegfried, M., Roe, B.A., Schlueter, S.D., Scheffler, B.E., and R.C. Shoemaker. 2006. The FAD2 gene family of soybean: Insights into the structural and functional divergence of a paleopolyploid genome. *Crop Science* 47: 14-26.
- 51 Schmutz, J, Cannon, S, Schlueter, J, Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D., Song, Q., Thelen, J., Cheng, J., Xu, D., Hellsten, U., May, G., Yu, Y., Sakurai, T., Umezawa, T., Bhattacharyya, B., Sandhu, D., Valliyodan, B., Lindquist, E., Peto, M., Grant, D.S., Shu, S., Goodstein, D., Barry, K., Futrell-Griggs, M., Abernathy, B., Du, J, Tian, Z., Zhu, L., Gill, N., Joshi, T., Libault, M., Sethuraman, A., Zhang, X., Shinozaki, K., Nguyen, H., Wing, R., Cregan, P., Specht, J., Grimwood, J., Rokhsar, D., Stacey, G., Shoemaker, R., and S. Jackson. 2010. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- 52 Siomi, H., and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457:396-404.
- 53 Smart, C.C., D. Johanning, G. Muller, and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enolpyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *Journal of Biological Chemistry* 160:16338-16346.
- 54 Steinrücken, H.C., and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94:1207-1212.
- 55 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.
- 56 Tymchuk, S. M., G. Khorasani, and J. J. Kennelly. 1998. Effect of feeding formaldehyde- and heat-treated oil seed on milk yield and milk composition. *Canadian Journal of Animal Science* 78:693.
- 57 Voelker, T., and A.J. Kinney. 2001. Variations in the Biosynthesis of Seed-Storage Lipids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52:335-361.
- 58 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
- 59 Wang, Q., and P. Dubois. 2004. Seed specific 7Sa promoter for expressing genes in plants. U.S. patent 6,825,398.
- 60 Waterhouse P.M., and C.A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *National Review Genetics* 4: 29-38
- 61 Weiss, U., and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley and Sons, New York.
- 62 della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Frayley, and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:6873-6877.
- 63 浅野貞夫 1995. 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会

- 64 大橋 広好 1999. マメ科, Pages 186-213 in 日本の野生植物 草本 II 離弁花類, 佐竹 義輔、大井 次三郎、北村 四郎、亙理 俊次、富成 忠夫、平凡社, 東京
- 65 高橋 将一、羽鹿 牧太、異儀田 和典 1996. 九州中部で収集したツルマメの生育特性、九州農業研究(九農研) 第 58 号
- 66 沼田 真、吉沢 長人 1997. 新版・日本原色雑草図鑑、全国農村教育協会
- 67 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 編 2010. 飼料月報 平成 22 年 8 月. 社団法人配合飼料供給安定機構

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Information on Plasmid Vector B
- 2 Plasmid Lineage Diagram for PV-GMPQ/HT4404
- 3 Sequence of Genetic Elements in PV-GMPQ/HT4404
- 4 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2009 and TOX_2009 Databases (MSL-0021842)
- 5 Amended Report for MSL0022130: Molecular Analysis of Soybean MON 87705 (MSL-0022384)
- 6 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87705: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL-0022136)
- 7 Western Blot analysis of CP4 EPSPS Protein in MON 87705 Mature Soybean Seed across Multiple Generations Produced in the United States and Puerto Rico during 2006 and 2007 in Support of a Japan Stage III Application (MSL-0021243)
- 8 Heritability and Stability of Genes Present in Biotechnology-Derived Soybean MON 87705 Across Multiple Generations(RPN-08-504)
- 9 Assessment of CP4 EPSPS Protein Levels in Leaf, Seed, Root, and Forage Tissues from MON87705 soybean Grown in 2007/2008 Chile Field Trials (MSL-0021832)
- 10 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87705: Assessment of Putative Polypeptides (MSL-0021929)
- 11 Additional Bioinformatic Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' Junction of the Inserted DNA in MON 87705: Assessment of Putative Polypeptides (MSL-0022346)
- 12 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87705 (MSL-0021928)
- 13 Characterization of the CP4 EPSPS Protein Purified from the Seed of MON 87705 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Proteins (MSL-0021863)
- 14 Assessment of the *in vitro* digestibility of purified *E. coli*-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL-17566)
- 15 Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSP synthase (MSL-12949)
- 16 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764)
- 17 Composition Analyses of Forage and Seed Collected from MON 87705 Produced in Chile during the 2007-2008 Growing Season (MSL-0021756)
- 18 Bioinformatics Evaluation of the *FAD2-1A* and *FATB-1A* segments in MON 87705: BLASTN Analysis
- 19 Analysis of the endogenous *FAD2-2*, *FAD3A*, *FATB2* and *FATA* RNA levels in soybean MON 87705 (RAR-08-047)

- 20 Fatty Acid Analyses of Soybean Seed Collected from Generations R3, R4, R5 and R6 of MON 87705
Produced in the United States and Puerto Rico during 2006 and 2007 (MSL0021272)
- 21 A 90-DAY FEEDING STUDY IN RATS WITH PROCESSED MEAL FROM MON 87705 SOYBEANS
(WIL-50357)