

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統

**平成 25 年 2 月 7 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	3
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	3
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	4
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
10	3 宿主に関する事項	4
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	4
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	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	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
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	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.....	8
	(3) 構造に関する事項.....	8
	(4) 性質に関する事項.....	9
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 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
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 3
	6 組換え体に関する事項.....	1 3
	(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 3
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 3
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 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 6
50	(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
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 6
	IV 審議結果.....	1 6
	V 参考文献及び参考資料.....	1 6

「除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統」に係る安全性確認

60 I はじめに

除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統（以下「MON87708 ダイズ」という。）について、平成 24 年 1 月 24 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續」（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。

65

II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 系統
性 質 : 除草剤ジカンバ耐性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

70

MON87708 ダイズは、除草剤ジカンバに対する耐性を付与するために改変 *dmo* 遺伝子を導入したダイズである。改変 *dmo* 遺伝子の供与体は、グラム陰性細菌の一種である *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株であり、改変 *dmo* 遺伝子によって産生されるジカンバモノオキシゲナーゼ（以下「改変 MON87708 DMO¹」という。）が、除草剤ジカンバを除草活性のない化合物に変換することで、植物に除草剤ジカンバに対する耐性を付与する。

75

また、MON87708 ダイズの作出過程において、選択マーカーとして *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子を導入し、除草剤グリホサート耐性が付与された形質転換体を選抜している。なお、形質転換体の選抜以降の育成過程において改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たず、改変 *dmo* 遺伝子のみを持った個体を選抜しているため、MON87708 ダイズに改変 *cp4 epsps* 遺伝子は含まれていない。

80

MON87708 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与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そのため、MON87708 ダイズに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、MON87708 ダイズが飼料として摂取する家畜の健康を損なうおそれはないと考えられた。

85

なお、ダイズは主に大豆油かすの形態で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

90

MON87708 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。

¹ 「改変 MON87708 DMO」は、改変 *dmo* 遺伝子から発現する「改変 MON87708 DMO たん白質」、「改変 MON87708 DMO+27 たん白質」及びこれらのたん白質から形成される三量体の総称。

MON87708 ダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子は細菌の一種である *Stenotrophomonas maltophilia* DI-6 株由来であり、改変 MON87708 DMO を発現する。

95 MON87708 ダイズを作出する過程で選抜マーカーとして使用された改変 CP4 EPSPS たん白質をコードする改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来である。ただし、R₁ 世代において遺伝的分離により改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない個体を選抜しているため、MON87708 ダイズは改変 *cp4 epsps* 遺伝子を持たない。

100 (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。

105 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON87708 ダイズ及び非組換えダイズの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である (OECD, 2001、ILSI, 2006、参考資料 16)。

110 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON87708 ダイズに導入されたのは、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのみである。MON87708 ダイズは、改変 MON87708 DMO の発現により、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。この点を除けば、MON87708 ダイズは既存のダイズと差異はなく、既存種と比較して、ア 収穫時期 (成熟程度)、イ 家畜等の摂取 (可食) 部位、ウ 家畜等の摂取量、エ 調製及び加工方法についても変わりはない。

115 以上 (1) ～ (4) により、MON87708 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。

120 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

従来のダイズでは播種・発芽前に限られていた除草剤ジカンバの散布を、播種前から生殖初期 (R₁ 期：開花始) まで使用可能にする。

125 除草剤ジカンバは人工オーキシシン型の除草剤で (HRAC, 2009)、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって、除草活性を示す (Ahrens, 1994)。また、除草剤ジカンバは除草剤グリホサートでは防除が難しいシロザ (*Chenopodium album*) やアメリカツノクサネム (*Sesbania exaltata*)、また除草剤グリホサートに抵抗性を持つブタクサ (*Ambrosia artemisiifolia*) やパーマー・アカザ (*Amaranthus palmeri*) などの広葉雑草を効果的に防除できるとしている。

3 宿主に関する事項

130 (1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

MON87708 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。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

135 *Glycine* 属はアジアとオーストラリアを起源とし、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属に分類される。*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*)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

140 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(OECD, 2001)。

145 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 (Liener, 1994)。ダイズの加工過程における加熱により不活化され (OECD, 2001)、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。

150 レクチンは、細胞膜を構成する糖たん白や糖脂質の糖に対し結合することで、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 (Liener, 1994)。しかし、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 (Liener, 1994)。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。

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家畜等の健康に影響を及ぼしたという報告はない (OECD, 2001)。

155 (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

160 ダイズの主要病害として、立ち枯れ病 (*Phytophthora* 及び *Pythium*)、ダイズシスト線虫及びダイズさび病 (*Phakopsora pachyrhizi*) が知られているが (Faghihi and Ferris, 2006、Dorrance *et al.*, 2007、Pedersen, 2007)、これらの病原体がヒトや家畜等に病原性を示すという報告はない。

(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

165 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

170 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 (Beverdors, 1993)。夏の終わりに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。

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*) 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)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

ダイズの飼料としての利用形態は、大豆油かす、大豆皮、きなこ、エクストルーダー処理大豆等が挙げられる。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。

(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ているが、これらは加工段階で適切な加熱処理を施すことにより、不活性化することができるため、ダイズは飼料として安全に使用されている。

(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)。

(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*) 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 (沼田ら, 1975、浅野, 1995、高橋ら, 1996、大橋, 1999)。

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

(1) 名称及び由来に関する事項

215 ベクターB は MON87708 ダイズの作出に用いられた導入プラスミド PV-GMHT4355 の中間プラスミドである。なお、ベクターB の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

(2) 性質に関する事項

220 ベクターB の塩基数は 3,931 bp である。また、ベクターB の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており(参考資料 1)、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

225 ベクターB にはアミノグリコシド 3' -ホスホトランスフェラーゼをコードしカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子及びβ-ラクタマーゼをコードしアンピシリン耐性を付与する *blaTEM* 遺伝子が含まれており、*Escherichia coli* 中での選択マーカーとして用いられている。

(4) 伝達性に関する事項

230 ベクターB 及びその構築に用いられた中間プラスミド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

235 ベクターB には、外側骨格領域に M13 バクテリオファージから単離された自律増殖のための複製開始領域 *f1-M13* と、*E. coli* から単離された自律増殖のための複製開始領域 *ori-pUC* が組み込まれているが、植物や家畜等では増殖することは出来ない。なお、導入遺伝子の解析の結果、MON87708 ダイズには、これらの領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認されている(参考資料 5)。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

240 MON87708ダイズの作出には、導入用プラスミドPV-GMHT4355を用いている。本導入用プラスミドは、遺伝子断片A及び中間プラスミドB~Fを用いて作出されており(参考資料 2)、改変MON87708 DMOを発現する改変*dmo*遺伝子発現カセットからなるT-DNAI及び改変CP4 EPSPSたん白質を発現する改変*cp4 epsps*遺伝子
245 発現カセットからなるT-DNAIIを有している。

(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

250 MON87708 ダイズは 2 つの T-DNA 領域を持つ導入用プラスミド PV-GMHT4355 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により作出されている。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

255 MON87708 ダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子は *S. maltophilia* DI-6 株に由来する。また、MON87708 ダイズ作出の過程で選抜マーカーとして使用された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

② 安全性に関する事項

260 改変 *dmo* 遺伝子の供与体である *S. maltophilia* は好気性の環境中に普遍的に存在するグラム陰性細菌であり、水辺や土壌、植物等から検出されているほか、飼料や畜産物からも検出されている。消化管の常在細菌と同様、*S. maltophilia* は日和見感染菌であるが、健康なヒトや家畜等に対する病原性を示すことは稀である。

265 また、改変 *cp4 epsps* 遺伝子の供与体である *Agrobacterium* 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を示す報告はない。

270 なお、ジカンバを分解する土壌微生物は自然環境中に遍在しており (Altom and Stritzke, 1973、Smith, 1973、Freer, 1976、Krueger *et al.*, 1989)、様々な微生物種がジカンバを除草活性のない代謝産物へ変換できる酵素を有しているとされている (Smith, 1974、Krueger *et al.*, 1991、Taraban *et al.*, 1993)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

275 MON87708 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMHT4355 は、遺伝子断片 A と中間プラスミド B~F から構成される合成ベクターである。

従来商業ダイズ品種 A3525 の分裂組織と導入用プラスミド PV-GMHT4355 を含む *Agrobacterium* を共置培養した後、分裂組織を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 *Agrobacterium* を除去した。

280 その後、選抜された細胞から植物体を再分化させ、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-DNAII を持たない個体として選抜した。その後、T-DNAI をホモで有する個体をインベダー分析、サザンブロット分析及び定量 PCR 分析により選抜した。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、MON87708 ダイズを最終的な商品化系統として選抜した。

285

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

290 MON87708 ダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子は、PCISV プロモーターによりその発現を制御されている。PCISV プロモーターは peanut chlorotic streak

caulimovirus に由来し、植物細胞内での転写を誘導する (Maiti and Shepherd, 1998)。

295

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*FMV* プロモーターによりその発現が制御されている。*FMV* プロモーターは figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA に由来し (Rogers, 2000)、植物細胞内での転写を誘導する。

② ターミネーターに関する事項

300

MON87708 系統に導入された改変 *dmo* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子のターミネーターは、*Pisum sativum* (エンドウ) 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'末端非翻訳領域であり (Coruzzi *et al.*, 1984)、改変 *dmo* 遺伝子及び改変 *cp4 epsps* 遺伝子からの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

305

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-GMHT4355 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。

(4) 性質に関する事項

310

導入用プラスミド PV-GMHT4355 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 *dmo* 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>dmo</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA I)	
<i>PCISV</i> プロモーター	peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) に由来するプロモーター (Maiti and Shepherd, 1998)。植物細胞内での転写を誘導する。
<i>TEV</i> リーダー配列	Tobacco Etch virus (TEV) 由来の 5' 末端非翻訳領域 (Niepel and Gallie, 1999)。遺伝子発現の調整に関与する。
<i>RbcS</i> ターゲティング配列	<i>Pisum sativum</i> (エンドウ) 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遺伝子 (<i>RbcS</i>) に由来し、輸送ペプチドから成熟たん白質の N 末端から 24 アミノ酸までをコードする配列 (Fluhr <i>et al.</i> , 1986)。改変 DMO 前駆たん白質を葉緑体へ輸送する。
改変 <i>dmo</i> 遺伝子	<i>S. maltophilia</i> のジカンバモノオキシゲナーゼのコード配列 (Wang <i>et al.</i> , 1997、Herman <i>et al.</i> , 2005)。
<i>E9</i> ターミネーター	<i>P. sativum</i> (エンドウ) 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> 遺伝子に由来する 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)。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA II、MON87708 ダイズには存在しない)	
<i>FMV</i> プロモーター	Figwort mosaic virus (FMV) 35S RNA のプロモーター (Rogers, 2000)。植物細胞内での転写を誘導する。
<i>DnaK</i> リーダー配列	<i>Petunia hybrid</i> (ペチュニア) の <i>Hsp70</i> 遺伝子に由来する 5' 末端非翻訳領域リーダー配列 (Rensing and Maier, 1994)。遺伝子の発現の調節に関与する。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	<i>Arabidopsis thaliana</i> (シロイヌナズナ) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 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 (Klee <i>et al.</i> , 1987、Herrmann, 1995)。改変 CP4 EPSPS たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子	<i>Agrobacterium</i> sp.CP4 株の 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>aroA</i> 遺伝子のコドンが最適化されたコード配列 (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> (エンドウ) 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> 遺伝子に由来する 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)。

315

① 改変 *dmo* 遺伝子の機能

改変 *dmo* 遺伝子によって発現される改変 MON87708 DMO は、除草剤ジカンバから除草活性の無い DCSA (3,6-dichlorosalicylic acid; 3,6-ジクロロサリチル酸) とホルムアルデヒドへの脱メチル反応を触媒する (Chakraborty *et al.*, 2005)。

320

改変 *dmo* 遺伝子は、細胞質において改変 MON87708 DMO 前駆たん白質に翻訳される。改変 MON87708 DMO 前駆たん白質の N 末端には、葉緑体輸送ペプチド (CTP) の 57 個のアミノ酸、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 (RbcS) の N 末端から 24 個のアミノ酸 (Comai *et al.*, 1988、Behrens *et al.*, 2007) 及び intervening sequence (IS) にコードされる 3 個のアミノ酸が付加されており、葉緑体でプロセッシングを受ける。プロセッシングを受けたたん白質には、改変 MON87708 DMO 前駆たん白質から CTP、RbcS 及び IS が切り離された完全長たん白質と、RbcS と IS を合わせた 27 アミノ酸が残ったたん白質の 2 つの形態のたん白質が存在することが MON87708 ダイズ種子のウエスタンブロット分析及び N 末端アミノ酸配列解析により明らかになった。そのため、前者を「改変 MON87708 DMO たん白質」、後者を「改変 MON87708 DMO+27 たん白質」とした。

325

330

2 つのたん白質の形態が生じる原因について、スプライシング部位を予測で

335 きるアルゴリズム(Emanuelsson *et al.*, 1999)を用いて検証したところ、CTP
領域にスプライシングが可能な部位が 2 ヶ所存在し、一方の部位で切断され
た場合には改変 MON87708 DMO たん白質となり、もう一方の切断部位で切
断された場合には 27 アミノ酸が連結された改変 MON87708 DMO+27 たん白
質となるとする予測結果が得られた。なお、改変 MON87708 DMO たん白質
340 は、1 ヶ所のアラニンの挿入及び 1 ヶ所のトリプトファンからシステインへの
置換を除き、野生型 DMO たん白質 (Herman *et al.*, 2005) と同じ配列である。

DMO の結晶構造は、3 つの同一の DMO 単量体からなる三量体であること
が明らかとなっている(D'Ordine *et al.*, 2009、Dumitru *et al.*, 2009)。したが
って、MON87708 ダイズが除草剤ジカンバに対して耐性を持つためには、
DMO が三量体を形成する必要があるが、実際に MON87708 ダイズが除草剤
345 ジカンバに耐性を示し、MON87708 ダイズから抽出されたたん白質にジカン
バに対する脱メチル化酵素活性が確認されていることから (参考資料 15)、
MON87708 ダイズ内で発現される改変 MON87708 DMO たん白質や改変
MON87708 DMO+27 たん白質は三量体を形成し、除草剤ジカンバの脱メチ
ル反応を触媒していると考えられた。これらのことから、改変 MON87708
350 DMO は、改変 MON87708 DMO たん白質、改変 MON87708 DMO+27 たん
白質及びこれらの組合せにより形成される三量体からなると考えられる。

なお、改変 MON87708 DMO たん白質と改変 MON87708 DMO+27 たん白
質との差異である 27 個のアミノ酸配列は触媒部位から離れたところにあるた
め、両たん白質の間に機能的差異は生じないと考えられる。

355 ② 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は選択マーカーとして選抜の過程で用いられた。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) と結合し、植物の 5-エノールピルビルシキミ酸・3-リン酸合成
360 を阻害する (Steinrücken and Amrhein, 1980)。その結果、植物は必須アミノ
酸の欠乏に陥り、枯死する。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 と比較して機能的には同一であるが、除草
剤グリホサートに対する親和性は低いため、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
365 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)。

(5) 純度に関する事項

塩基配列解析により、T-DNAI 及び T-DNAII 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)。

370 (6) コピー数に関する事項

MON87708 ダイズに導入された遺伝子のコピー数及び挿入箇所数を決定し、T-
DNAI、T-DNAII 及び導入用プラスミド由来の外側骨格配列の有無を確認するた
め、サザンブロット分析を行った。その結果、MON87708 ダイズはゲノム中の 1

375 ヶ所に 1 コピーの T-DNAI を持ち、全ての構成要素が存在していること、導入用
プラスミドの外側骨格配列や T-DNAII 由来の配列が存在しないことが確認された
(参考資料 5)。

380 また、導入遺伝子の構成を確認し、導入遺伝子とその近傍配列の塩基配列を決
定するため、塩基配列解析を行った。その結果、導入遺伝子と導入用プラスミド
PV-GMHT4355 の T-DNAI 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)。

385 さらに、T-DNAI の挿入部位の解析を行った結果、導入遺伝子の挿入部位におい
て、内在性配列に 899 bp の欠損が認められ、5' 及び 3' 末端側近傍配列に、それ
ぞれ 128 bp と 35 bp の付加が確認された (参考資料 5)。しかし、近傍配列の
BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、T-DNA の導入による既知の内在性の遺伝子
の破壊はないことが確認された (参考資料 6)。

(7) 安定性に関する事項

390 MON87708 ダイズに導入された T-DNAI の複数世代にわたる安定性を確認する
ため、5 世代の MON87708 ダイズから得られた DNA を用いて、サザンブロット
分析を実施したところ、導入された 1 コピーの T-DNAI 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)。

395 また、改変 MON87708 DMO の発現の複数世代にわたる安定性を確認するため、
5 世代の MON87708 ダイズの組織サンプルを用いて改変 MON87708 DMO のウ
ェスタンブロット分析を実施したところ、改変 MON87708 DMO が複数世代にわ
たり安定して発現していることが確認された (参考資料 7)。

400 さらに、MON87708 ダイズでの T-DNAI の分離様式及び安定性を確認するため、
複数世代にわたる分離比のカイ 2 乗検定による統計解析を行った。その結果、分
離比の観測値と期待値との間にカイ 2 乗検定による統計学的な有意差は認められ
なかったことから、MON87708 ダイズの改変 *dmo* 遺伝子発現カセットはダイズ
ゲノムの 1 ヶ所に存在し、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 (参考資料 8)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

405 MON87708 ダイズにおける改変 MON87708 DMO の発現量を ELISA 法により
測定した (参考資料 9)。試験には米国の 5 ヶ所のは場から採取した MON87708
ダイズ及び対照の非組換えダイズ A3525 の葉、根、地上部及び種子を供試した
(Berks County (ペンシルバニア州) の非組換えダイズの地上部を除く)。測定の
結果、全ての MON87708 ダイズサンプルから改変 MON87708 DMO の発現が検
410 出された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

 導入用プラスミド PV-GMHT4355 には、スペクチノマイシン及びストレプトマ

415 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
が(Fling *et al.*, 1985)、MON87708 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によって確認されている(参考資料 5)。

(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

420 MON87708 ダイズの導入遺伝子と、付加配列を含む 5' 及び 3' 末端側近傍配列
について 6 フレームでストップコドン (TGA、TAG、TAA) を検索し、導入遺伝子
領域のストップコドンから 5' 又は 3' 末端側近傍配列のストップコドンまでの配
列を ORF と仮定して検索したところ(参考資料 10)、20 個の ORF が確認された。
この 20 個の ORF について、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のある
425 たん白質との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

また、MON87708 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、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあ
るたん白質との相同性検索を行った(参考資料 11)。その結果、既知の毒素たん白
質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性は確認されなかった。

430

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

435 MON87708 ダイズに導入されているのは、T-DNA I 領域の改変 *dmo* 遺伝子発
現カセットのみである。MON87708 ダイズは、改変 MON87708 DMO の発現に
より、除草剤ジカンバに対する耐性が付与されている。この点を除けば、
MON87708 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ダイズと変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

440 改変 MON87708 DMO が既知の毒素たん白質と相同性を有するか確認するため、
「毒素」として登録されている既知のたん白質からなるデータベース中の相同性
を示す配列の有無を検索した。その結果、改変 MON87708 DMO は既知の毒素た
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性は認めら
れなかった(参考資料 4)。

445

(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

MON87708 ダイズから抽出した改変 MON87708 DMO (改変 MON87708
DMO たん白質、改変 MON87708 DMO+27 たん白質及びこれらの組合せにより
形成される三量体)を供試し、以下の①～③を検討した。

450

① 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

改変 MON87708 DMO 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。その結果、改変 MON87708 DMO は、人工胃液中で試

455 験開始から 30 秒間以内に検出限界(SDS-PAGE: 0.02 µg、ウエスタンブロット分析 0.3 ng)以下まで消化されたことが確認された(参考資料 12)。

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

460 改変 MON87708 DMO の人工腸液中での消化性を、ウエスタンブロット分析により評価した。その結果、改変 MON87708 DMO は、人工腸液中で試験開始から 5 分間以内に検出限界(1.0 ng)以下まで消化されたことが確認された(参考資料 12)。

③ 加熱処理

465 改変 MON87708 DMO の加熱処理(各温度 30 分間)に対する熱感受性を、ELISA 分析により評価した。その結果、改変 MON87708 DMO の免疫学的反応性は非加熱時と比べ、37℃の加熱処理により 85%まで減少し、55、75 及び 95℃ では改変 MON87708 DMO の免疫学的反応性は検出限界以下であった。これらの結果から、改変 MON87708 DMO は 55℃ 及びそれ以上の温度では熱に対して安定ではないことが示された(参考資料 13)。

470 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 MON87708 DMO が内在性の植物基質を代謝する可能性を評価するため、*E.coli* で生産した DMO を用い、ダイズに存在し、構造的にジカンバに類似する化合物として特定された σ アニス酸、バニリン酸、シリング酸、フェルラ酸及びシナピン酸を供試し、LC-UV 及び LC-MS 分析により、DMO を含む反応溶液中で供試した化合物が減少するか、供試された化合物の酸化物が生成されているかを測定した。その結果、ジカンバのみ代謝され、他の化合物は DMO により代謝されず、化合物の減少は確認されなかった(参考資料 14)。改変 MON87708 DMO が *E.coli* で生産した DMO と同じ特異性を有するかどうかを確認するため、MON87708 ダイズの種子から改変 MON87708 DMO を抽出し、最もジカンバと構造的類似性を有する σ アニス酸と反応させたところ、 σ アニス酸は代謝されなかった(参考資料 15)。

480 以上のことから、MON87708 ダイズに導入された改変 *dmo* 遺伝子発現カセットから発現される改変 MON87708 DMO は、ジカンバに対する高い基質特異性を有し、植物の代謝経路へ影響することはないと考えられた。

485 また、改変 MON87708 DMO によるジカンバの分解により、DCSA 及びホルムアルデヒドが生じるが、DCSA が植物の代謝系に悪影響を及ぼすとする報告はなく、ホルムアルデヒドは植物の通常の代謝系においても産生・代謝されている物質であることから、植物の代謝経路へ影響することはないと考えられた。

490 (5) 宿主との差異に関する事項

MON87708 ダイズ及び対照の非組換えダイズとの構成成分の同等性を評価するため、米国の 5 カ所のほ場において栽培した MON87708 ダイズ及び対照の非組換えダイズ A3525 の地上部及び種子について、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③

495 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
16）。また、1ヶ所のは場で2品種、その他各は場で4品種ずつ合計18種の商業品
種を同時に栽培し、同様に分析を行った。MON87708 ダイズに関しては、2~3 葉
期に最大推奨薬量（0.56 kg acid equivalence [a.e.]/ha）で除草剤ジカンバ処理を行
った。

500 ① 主要構成成分

地上部及び種子中の水分、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)、また、種子中の粗
繊維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と同等又
は従来商業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。

505

② 脂肪酸組成

種子中の脂肪酸組成について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組
換えダイズと同等又は従来商業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。

510

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、いずれのアミノ酸も対照の
非組換えダイズと同等又は従来商業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。

515

④ ビタミン類

種子中のビタミン E について分析した結果、対照の非組換えダイズとの間
で統計学的有意差が認められたが、従来商業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。

520

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及びイソフラボン(ダイゼイン、ゲニステイ
ン及びグリシテイン) 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と同等又は従来商業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。

525

（6）外界における生存及び増殖能力に関する事項

2005 年~2011 年の間に、MON87708 ダイズのは場試験は米国を中心として延
べ 942 ヶ所で行われているが、MON87708 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。

530

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

535 MON87708 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

540 MON87708 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

2011 年 1 月に欧州食品安全局（EFSA）へ食品、飼料及び輸入のための申請を行った。

545 2011 年 10 月に米国食品医薬局（FDA）において食品・飼料としての安全性審査が終了した。

2012 年 5 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準局（FSANZ）において安全性審査が終了した。

550 2012 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審査が終了した。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

555 アメリカにおいては、従来ダイズに除草剤ジカンバをダイズ播種・発芽前の除草及び収穫直前にダイズの乾燥を促進する目的で使用していた。MON87708 ダイズでは、播種前から生育初期（R1 期：開花始）までの期間に除草剤ジカンバ散布が可能であるが、乾燥促進に使用されることはない。

MON87708 ダイズへの使用が想定される除草剤ジカンバ及びその代謝物について MON87708 ダイズへの残留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(参考資料 17、18)。

560 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON87708 ダイズの種子の製法及び管理方法は従来ダイズと同様である。

7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

565 該当しない。

IV 審議結果

570 除草剤ジカンバ耐性ダイズ MON87708 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 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Altom, J.D. and Stritzke, J. F. 1973. Degradation of Dicamba, Picloram, and Four Phenoxy Herbicides in Soils. *Weed Science* 21: 556-560.
2. Ahrens, W.H. 1994. *Herbicide Handbook*. Weed Society of America, Champaign, IL: 352.
3. Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 5,633,435, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
4. Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
5. Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L. Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies. *Science* 316: 1185-1188.
6. Beversdorf, W.D. 1993. Soybean. Pages 17-25 in *Traditional Crop Breeding Practices: An Historical Review to Serve as a Baseline for Assessing the Role on Modern Biotechnology*. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
7. Caviness, C.E. 1966. Estimates of natural cross-pollination in Jackson soybeans in Arkansas. *Crop Science* 6: 211-212.
8. Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Purification and characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 437: 20-28.
9. Comai, L., N. Larson-Kelly, J. Kiser, C.J.D. Mau, A.R. Pokalsky, C.K. Shewmaker, K. McBride, A. Jones and D.M. Stalker. 1988. Chloroplast transport of a ribulose biphosphate carboxylase small subunit-5-enolpyruvyl 3-phosphoshikimate synthase chimeric protein requires part of the mature small subunit in addition to the transit peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 263: 15104-15109.
10. 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.
11. D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasiński and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
12. Dorrance, A.E., M.A. Draper and D. Hershman. 2007. Using foliar fungicides to manage soybean rust. The Ohio State University, Columbus, Ohio.
<http://oardc.osu.edu/soyrustrust/2007edition/fungisoyrust.pdf> [Accessed May 12, 2010].
13. Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
14. Emanuelsson, O., H. Nielsen and G. von Heijne. 1999. ChloroP, a neural network-based

- method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Science* 8: 978-984.
15. Faghihi, J. and V.R. Ferris. 2006. Soybean Cyst nematode. E210-W. Department of Entomology, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
 16. 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.
 17. Fluhr, R., P. Moses, G. Morelli, G. Coruzzi and N.-H. Chua. 1986. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *The EMBO Journal* 5: 2063-2071.
 18. Freer, D. S. 1976. The benzoic acid herbicides. In: *Herbicides (chemistry, degradation and mode of action)*. Kearney, P.C. and Kaufman, D.D., eds., pp 541-594. Marcel Dekker, New York.
 19. Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.
 20. Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
 21. HRAC. 2009. Classification of herbicides according to mode of action. Herbicide Resistance Action Committee.
<http://www.hracglobal.com/Publications/ClassificationofHerbicideModeofAction/tabid/222/Default.aspx> [Accessed June 26, 2010].
 22. Hymowitz, T. 2004. Speciation and cytogenetics. Pages 97-136 in *Soybeans: Improvement, Production, and Uses*. Third Edition. H.R. Boerma and J.E. Specht (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
 23. 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.
 24. ILSI. 2006. Crop Composition Database Version 3.0. International Life Science Institute, Washington, D.C. http://www.cropcomposition.org/cgi-perl/search6_ora.cgi [Accessed March 2, 2010].
 25. 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.
 26. Krueger, J. P., Butz, R. G., Atallah, Y. H. and Cork, D. J. 1989. Isolation and Identification of Microorganisms for the Degradation of Dicamba. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 37: 534-538.
 27. Krueger, J. P., Butz, R. G. and Cork, D. J. 1991. Aerobic and anaerobic soil Metabolism of Dicamba. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 39: 995-999.

28. Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 31-67.
29. Maiti, I.B. and R.J. Shepherd. 1998. Isolation and expression analysis of peanut chlorotic streak caulimovirus (PCISV) full-length transcript (FLt) promoter in transgenic plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 440-444.
30. Mies, D.W. and T. Hymowitz. 1973. Comparative electrophoretic studies of trypsin inhibitors in seed of the genus *Glycine*. *Botanical Gazette* 134: 121-125.
31. 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.
32. Niepel, M. and D.R. Gallie. 1999. Identification and characterization of the functional elements within the tobacco etch virus 5' leader required for cap-independent translation. *Journal of Virology* 73: 9080-9088.
33. OECD. 2000. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) merr. (soybean). ENV/JM/MONO(2000)9. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.15. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
34. OECD. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: Key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO(2001)15. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.2. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
35. 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, Boca Raton, Florida.
36. Pedersen, P. 2007. Insects and diseases. Iowa State University Extension, Ames, Iowa. <http://extension.agron.iastate.edu/soybean/topicpage2.html> [Accessed June 2, 2010].
37. 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.
38. Raper, C.D. and P.J. Kramer. 1987. Stress physiology. Pages 589-641 in *Soybeans: Improvement, production, and uses*. Second Edition. J.R. Wilcox (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
39. Rensing, S.A. and U.-G. Maier. 1994. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *Journal of Molecular Evolution* 39: 80-86.
40. Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
41. SMIC. 2006. Fact sheet: Soybean processing. Soybean Checkoff, Soybean Meal Information Center, Ames, Iowa.
42. Smith, A. E. 1973. Transformation of Dicamba in Regina Heavy Clay. *Journal of*

- Agricultural Food Chemistry. 21: 708-710.
43. Smith, A. E. 1973. Transformation of Dicamba in Regina Heavy Clay. Journal of Agricultural Food Chemistry. 21: 708-710.
 44. Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications 94: 1207-1212.
 45. Taraban, R. H, Berry, D. F., Berry, D. A. and Walker, H. L. 1993. Degradation of Dicamba by an anaerobic consortium Enriched from Wetland Soil. Applied and Environmental Microbiology 59: 2332-2334.
 46. TeKrony, D.M., D.B. Egli and G.M. White. 1987. Seed production and technology. Pages 295-353 in Soybeans: Improvement, Production, and Uses. Second Edition. J.R. Wilcox (ed.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
 47. Wang, K.J., Y. Takahata, Y. Kono and N. Kaizuma. 2008. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). Theoretical Applied Genetics 117: 565-573.
 48. Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.
 49. 浅野 貞夫 1995 原色図鑑/芽ばえとたね 全国農村教育協会 東京 p. 62
 50. 大橋 広好 1999 マメ科. 新装版 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・亘理 俊次・富成 忠夫(編) 平凡社 東京 p.211
 51. 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 58: 51.
 52. 沼田 真・浅野 貞夫・奥田 重俊・吉沢 長人・桑原 義晴・岩瀬 徹 1975 新版・日本原色雑草図鑑 沼田真人・吉沢長人(編) 全国農村教育協会 東京 p. 107

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Information on Intermediate Plasmid Vector B
2. Plasmid lineage diagram
3. Sequence of Genetic Elements in PV GMHT4355
4. Bioinformatics Evaluation of the DMO+27 Protein in MON 87708 Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases (MSL0022584)
5. Amended Report for MSL0022670: Molecular Analysis of Dicamba-Tolerant Soybean MON87708 (MSL0023278)
6. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 87708: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0022793)
7. Western Blot Analysis of DMO Protein in Dicamba-Tolerant Soybean MON 87708 Leaf Across Multiple Generations Produced in the Greenhouse During 2007 and 2008 (MSL0021459)
8. Revised Summary: Heritability and Stability of the *dmo* Expression Cassette in Dicamba-

Tolerant Soybean MON 87708 Across Multiple Generations (RPN-08-505)

9. Assessment of Total DMO Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87708 Produced in United States Field Trials During 2008 (MSL0022510)
10. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87708: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0022682)
11. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87708 Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases (MSL0022679)
12. Assessment of the *in vitro* Digestibility of the Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0022502)
13. The Effect of Heat Treatment on Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme Immunodetection (MSL0023031)
14. Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase for Potential Endogenous Substrates (RPN-10-365)
15. Specificity of Dicamba Mono-Oxygenase (DMO) Enzyme from MON 87708 Using o-Anisic Acid as a Substrate (RPN-10-499)
16. Amended Report: Statistical Re-analysis of Compositional Data of Soybean Forage and Seed Collected from MON 87708 Grown in the United States (RAR-10-407)
17. ジカンバのジカンバ耐性大豆における代謝試験
18. Summary of the Magnitude of Residues of Dicamba in Soybean Seed after Application to MON87708 (MSL0023069)