

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

チョウ目害虫抵抗性及び
除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統

平成 27 年 3 月 2 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 | 6 |
| 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 1 |
| | (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項..... | 1 1 |
| | (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 1 |
| 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 1 |
| | 6 組換え体に関する事項..... | 1 2 |
| | (1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項..... | 1 2 |
| | (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項..... | 1 2 |
| 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 2 |
| | (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項..... | 1 4 |
| | (5) 宿主との差異に関する事項..... | 1 4 |
| | (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項..... | 1 5 |
| | (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項..... | 1 5 |
| 50 | (8) 不活化法に関する事項..... | 1 5 |
| | (9) 外国における認可等に関する事項..... | 1 5 |
| | (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 |

「チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統」 に係る安全性確認

60

I はじめに

65 チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 系統（以下「81419
ダイズ」という。）について、平成 26 年 8 月 4 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全
性に関する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 : チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ
81419 系統
性質 : チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性
申請者 : ダウ・ケミカル日本株式会社
開発者 : ダウ・アグロサイエンス社

70

81419ダイズには、グラム陽性桿菌である *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*
PS811株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子並び
に *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811
株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715株に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子が導入さ
れている。改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子からそれぞれ改変 Cry1F たん白質
及び改変 Cry1Ac たん白質が発現され、チョウ目害虫に対して殺虫活性を示すことによ
り、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。

75

また、81419 ダイズには、選択マーカーとして *Streptomyces viridochromogenes* に
由来する改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（以下「改変 *pat*
遺伝子」という。）が導入されている。改変 *pat* 遺伝子からホスフィノスリシンアセ
チルトランスフェラーゼたん白質（以下「PAT たん白質」という。）が発現され、
PAT たん白質が除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することにより、
除草剤グルホシネートへの耐性を付与する。

80

81419ダイズと非組換えダイズを比較したところ、遺伝子組換え操作により
付与された上の性質を除き、差異は認められなかった。このため、81419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
の問題となる点は認められなかった。したがって、81419ダイズは、飼料と
して摂取する家畜等の健康に影響を及ぼす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。

90 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

81419 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 Maverick である。

95 81419 ダイズには *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1F* 遺伝子、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する改変 *cry1Ac* 遺伝子及び *S. viridochromogenes* に由来する改変 *pat* 遺伝子が導入されている。

100 改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子は、それぞれ改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質を発現することにより、チョウ目害虫への抵抗性を付与する。

105 改変 *pat* 遺伝子は、PAT たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。この形質は、81419 ダイズ作出時の選抜マーカーとして利用されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

110 ダイズは、優れたたん白質の供給源であり、主に大豆油かすの形態で育すう・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

115 81419 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、OECD, 2012、ILSI, 2010、参考資料 16)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

120 81419 ダイズは、改変 Cry1F たん白質、改変 Cry1Ac たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性が付与されている。この点を除けば、81419 ダイズは非組換えダイズと差異はなく、①収穫時期 (成熟程度)、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も非組換えダイズと変わりはない。

125 (1) ~ (4) により、81419 ダイズの飼料としての安全性評価においては、非組換えダイズとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

130 81419 ダイズは、改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質を発現することにより、チョウ目害虫抵抗性が付与されており、チョウ目害虫による影響を受けずに生育することができる。そのため、チョウ目害虫防除のための殺虫剤散布量を軽減することが可能となる。また、81419 ダイズは、PAT たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されているが、この形質は選抜の際のマーカーとして使用される。81419 ダイズの飼料としての利用目的及び利用方法につい

ては非組換えダイズと相違ない。

135

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

81419 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 Maverick である。

140

(2) 遺伝的先祖に関する事項

ダイズは一般に中国北部を原産とする最も古い栽培作物のひとつであると見なされ、野生種であるツルマメ (*Glycine soja*) と同じ *Soja* 亜属に属している。細胞学的、形態学的、分子生物学的な証拠から、ツルマメがダイズの祖先野生種であると考えられている (OECD, 2000)。

145

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズに含まれる有害生理活性物質として、トリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が知られている (OECD, 2001、OECD, 2012)。

150

トリプシンインヒビターはたん白質分解酵素阻害物質であり、消化酵素であるトリプシンを不活化し、結果として摂取したたん白質の消化を阻害する。レクチンは炭水化物含有化合物に結合するたん白質で、血液凝集の原因となる赤血球凝集素として作用することが知られている。トリプシンインヒビター及びレクチンは、加熱により失活され (OECD, 2001、OECD, 2012)、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及びレクチンの量はごくわずかであると考えられる。

155

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)。

160

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

ダイズは種子植物であり、ダイズが家畜等に寄生又は定着することはない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

ダイズには、ウイルス、細菌及び糸状菌等の微生物により各種の病害が発生する。可食部である種子でも同様の微生物により、数種類の病害 (ダイズモザイクウイルス病、茎疫病及び紫斑病など) が発生する (OECD, 2000)。しかし、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

165

(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 (OECD, 2000)。

170

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

175 ダイズは、一年生の自殖性植物である。ダイズと交雑可能な近縁野生種として、我が国にはツルマメが自生している (OECD, 2000)。しかし、ダイズは自殖率が高く、一般的にダイズとツルマメの開花期が重なりにくいいため、ツルマメとダイズとの間の自然交雑率は、極めて低いことが報告されている (OECD, 2000、Nakayama and Yamaguchi, 2002、Mizuguti *et al.*, 2009)。

180 **(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、きな粉及びエクストルーダー処理大豆等が挙げられる。ダイズ由来の飼料原料として最も多く使用されているのは大豆油かすであり、植物性油かす類のうち最も代表的なものである。大豆油かすは総ての家畜に対して嗜好性が優れ、消化利用性も高く、配合飼料原料として、各家畜の飼料に古くから使用されている (伊藤ら, 2010、松木ら, 2010)。

185 **(9) 飼料の安全な利用に関する事項**

 ダイズ種子にはトリプシンインヒビター、レクチン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。

190 **(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項**

 ダイズ種子に休眠性はなく、寒さに弱いため、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。仮に、自生したとしても、物理的あるいは化学的な従来の方法で自生ダイズを防除することができる (OECD, 2000)。

195 **(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項**

 ダイズの近縁種であるツルマメは、ダイズと同様に、トリプシンインヒビター、ラフィノース、スタキオース、フィチン酸等の有害生理活性物質を含むことが報告されている (Hymowitz and Collins, 1974、Raboy and Dickinson, 1993、Natarajan *et al.*, 2007)。

200 **4 ベクターに関する事項**

205 **(1) 名称及び由来に関する事項**

 81419 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド pDAB9582 は、プラスミド pDAB2407 を基に作製された。なお、プラスミド pDAB2407 に含まれる T-DNA 領域は *Agrobacterium tumefaciens* に、外側骨格配列は *Escherichia coli* にそれぞれ由来する。

210

(2) 性質に関する事項

 プラスミド pDAB2407 の塩基数は 5,817 bp である。また、プラスミド pDAB2407 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、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。

215

(3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pDAB2407 及び pDAB9582 にはスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼを産生しスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が含まれており、各プラスミドの選択に用いられた。81419 ダイズへの導入に用いられた

220

プラスミド pDAB9582 において、*specR* 遺伝子は T-DNA 領域の外側に位置するため、81419 ダイズ中には含まれていない。
なお、81419 ダイズ中に *specR* 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 1、2)。

225

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pDAB2407 は、プラスミドの伝達を可能とする配列を含まない。

(5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pDAB2407 に含まれるすべての遺伝子の形質は明らかにされており、植物・家畜等で増殖を可能とする配列は含まれていない。

230

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子を含む挿入DNAを、プラスミド pDAB2407 を基に構築した中間プラスミドに組み込み、導入用プラスミド pDAB9582 を作成している。

235

(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

導入用プラスミド pDAB9582 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によりダイズに導入している。

240

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する。改変 *cry1Ac* 遺伝子は、*B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73 株、*B. thuringiensis* subsp. *aizawai* PS811 株及び *B. thuringiensis* subsp. *berliner* 1715 株に由来する。

245

また、改変 *pat* 遺伝子は、土壤中に存在するグラム陽性放線菌である *S. viridochromogenes* (OECD, 1999) に由来する。

250

② 安全性に関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* は、微生物農薬として長期にわたり安全に利用されており、ヒトやその他の動

物に対して病原性を有するという報告は確認されていない。

255

また、改変 *pat* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* が、ヒトや家畜等に対して病原性を有するという報告はない (OECD, 1999)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

260

挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド pDAB9582 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主である Maverick の種子を基本培地上で発芽させ、単離した子葉節に、pDAB9582 を有する *A. tumefaciens* EHA101 株を感染させ、5 日間共培養した。不定芽誘導培地、不定芽伸長培地、発根培地に抗生物質 (セフトキサシム、バンコマイシン、チカルシリン・クラブラン酸合剤) を添加することにより、*A. tumefaciens* の除菌を行った。また、各選抜培地にグルホシネートを添加することにより、形質転換個体の選抜を行った。

265

その後、選抜した個体を発根培地に移植し、発根後に植物体を鉢上げして馴化した。再分化後の植物体において、グルホシネート塗布及び導入遺伝子解析を行い、目的の遺伝子が導入されていることを確認した。さらに、一般的なダイズの育成プロセスに従って、自家受粉を行うことで、ダイズ 81419 を育成した。

270

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

275

81419 ダイズに導入された改変 *cry1F* 遺伝子は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のポリユビキチン 10 プロモーター (*AtUbi10*) により発現が制御されている。

改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子は、キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来の *CsVMV* プロモーター (*CsVMV*) によりその発現が制御されている。

280

② ターミネーターに関する事項

改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF23 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF23 3' UTR*) により転写が終結する。

285

改変 *pat* 遺伝子は、アグロバクテリウムのプラスミド pTi15955 に由来する ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位を含む 3' 末端非翻訳領域からなるターミネーター (*AtuORF1 3' UTR*) により転写が終結する。

290

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 pDAB9582 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

挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び機能

| 構成要素 | 由来及び機能 |
|--------------------------------|--|
| 改変 <i>cry1F</i> 遺伝子発現カセット | |
| <i>AtUbi10</i> プロモーター | シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のポリユビキチン 10 (<i>UBQ10</i>) プロモーター。イントロン及び 5' 末端の翻訳されない配列を含む (Norris <i>et al.</i> , 1993)。植物体の全体において遺伝子の転写を開始させる。 |
| 改変 <i>cry1F</i> 遺伝子 | 改変 <i>Cry1F</i> たん白質をコードする遺伝子。 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> PS811 株の <i>cry1F</i> 遺伝子に由来するコアたん白質コード領域と C 末端側コード領域 (<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i> 1715 株の <i>cry1Ab</i> 遺伝子及び <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> PS811 株の <i>cry1Ca3</i> 遺伝子にそれぞれ由来する) からなる。植物における発現を高めるため塩基配列が改変されている。アミノ酸配列は、C 末端側領域において 604 番目のフェニルアラニンがロイシンに、608 番目のチロシンがセリンに、619 番目のグルタミン酸がアラニンに、640 番目のグルタミンがアルギニンに置換されている。 |
| <i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター | アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) のプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点とポリアデニル化部位からなる 3' 末端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。 |
| 改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子発現カセット | |
| <i>CsVMV</i> プロモーター | キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来のプロモーター。5' 末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。植物体の全体において遺伝子の転写を開始させる。 |
| 改変 <i>cry1Ac</i> 遺伝子 | 改変 <i>Cry1Ac</i> たん白質をコードする遺伝子。 <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD73 株の <i>cry1Ac</i> 遺伝子に由来するコアたん白質コード領域と C 末端側コード領域 (<i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>berliner</i> 1715 株の <i>cry1Ab</i> 遺伝子及び <i>B. thuringiensis</i> subsp. <i>aizawai</i> PS811 株の <i>cry1Ca3</i> 遺伝子にそれぞれ由来する) からなる。植物における発現を高めるため塩基配列が改変されている。アミノ酸配列は、C 末端側領域において 616 番目のチロシンがセリンに、627 番目のグルタミン酸がアラニンに、648 番目のグルタミンがアルギニンに置換されている。 |
| <i>AtuORF23</i> 3' UTR ターミネーター | アグロバクテリウム (<i>A. tumefaciens</i>) のプラスミド pTi15955 由来の ORF23 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3' 末 |

| | |
|-------------------------------|--|
| | 端非翻訳領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。 |
| 改変 <i>pat</i> 遺伝子発現カセット | |
| <i>CsVMV</i> プロモーター | キャッサバベインモザイクウイルス (Cassava Vein Mosaic Virus) 由来のプロモーター。5'末端非翻訳領域を含む (Verdaguer <i>et al.</i> , 1996)。植物体の全体において遺伝子の転写を開始させる。 |
| 改変 <i>pat</i> 遺伝子 | グラム陽性放線菌である <i>S. viridochromogenes</i> 由来の <i>pat</i> 遺伝子を植物における発現に適したコドンに改変した遺伝子で、PAT たん白質を発現させる。アミノ酸配列は改変されていない。 |
| <i>AtuORF1 3' UTR</i> ターミネーター | アグロバクテリウム(<i>A.tumefaciens</i>)のプラスミド pTi15955 由来の ORF1 の転写終結点及びポリアデニル化部位からなる 3'末端非翻訳領域(Barker <i>et al.</i> , 1983)。遺伝子の転写を終結させる。 |

① 改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子の機能

300

土壤中に一般的に存在するグラム陽性菌である *B. thuringiensis* が産生する結晶性のたん白質 (Cry たん白質) であるプロトキシンは、感受性昆虫に摂食されると腸管内のプロテアーゼにより消化され、殺虫活性のある毒素となる。この活性毒素 (コアたん白質) は、感受性昆虫の中腸上皮にある特異的な受容体と結合し、不可逆的に細胞膜に侵入する。さらに、いくつかの受容体と毒素の複合体による凝集体が形成され、これらが中腸細胞膜に細孔構造をつくることによって、細胞の破壊が誘導され昆虫を死に至らしめる (OECD, 2007)。

305

ダイズ 81419 系統で発現する改変 Cry1F たん白質は、ダイズを加害するチョウ目害虫のうち、ベルベットビーンキャタピラー、ソイビーンルーパー、タバコバッドワーム、フォールアーミーワームに対して殺虫活性を示し、また、改変 Cry1Ac たん白質は、ベルベットビーンキャタピラー、ソイビーンルーパー、タバコバッドワームに対して殺虫活性を示す。

310

② 改変 *pat* 遺伝子の機能

315

改変 *pat* 遺伝子によって発現する PAT たん白質は、グルホシネートの L 型異性体を、植物毒性のない代謝物である *N*-アセチル-L-グルホシネート (2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコ-ブタン酸) に迅速に変換する。

320

グルタミン酸の構造類似体であるグルホシネートの L 型異性体は、細菌や植物のグルタミン合成酵素の拮抗阻害剤であり、除草剤としての活性を有する。したがって、除草剤グルホシネートに非耐性の植物では、グルタミン合成酵素阻害のために大量の毒性アンモニアが細胞中に蓄積し、最終的に植物細胞死が起こる。一方、*N*-アセチル-L-グルホシネートはグルタミン合成酵素を阻害しないため、PAT たん白質を発現する遺伝子組換え植物では植物毒素の生理学的影響を受けず、除草剤グルホシネートへの耐性を示す (OECD, 2002)。

325 (5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pDAB9582 に含まれる遺伝子は、その性質が明らかになっており、塩基配列解析により、挿入 DNA 領域に目的以外の遺伝子は含まれていないことを確認している。

330 (6) コピー数に関する事項

81419 ダイズに導入された遺伝子のコピー数を決定し、挿入 DNA 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、81419 ダイズはゲノム中に 1 コピーの挿入 DNA 領域を持ち、導入用プラスミドの外側骨格配列が存在しないことが確認された (参考資料 1、2)。

335 また、挿入 DNA の構成を確認し、挿入 DNA 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、挿入 DNA は完全な形でダイズゲノム中に挿入されており、その近傍配列はダイズゲノム由来であることが確認された。一方で、挿入 DNA 領域の 5' 末端において 135bp が新たに挿入されていること、また、3' 末端において 9bp が新たに挿入されていること、ダイズゲノムから 340 57bp が欠失していることが明らかになった。(参考資料 3)。しかし、近傍配列の BLASTx 解析の結果、挿入 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 4)。

(7) 安定性に関する事項

345 81419 ダイズに導入された改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の 81419 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、導入された改変 *cry1F* 遺伝子、改変 *cry1Ac* 遺伝子及び改変 *pat* 遺伝子が複数世代にわたり安定して 350 遺伝していることが確認された (参考資料 1)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

81419 ダイズにおける改変 Cry1F たん白質、改変 Cry1Ac たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA 法により測定した (参考資料 5)。試験には米国の 10 ヶ所のは場から異なる生育時期に採取した 81419 ダイズの葉、茎葉、根及び種子を 355 供試した。測定の結果、供試したすべての組織サンプルから改変 Cry1F たん白質、改変 Cry1Ac たん白質及び PAT たん白質の発現が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

360 導入用プラスミド pDAB9582 にはスペクチノマイシン耐性を付与する *specR* 遺伝子が挿入 DNA 領域の外側に含まれているが、81419 ダイズ中に *specR* 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 1)。

(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

365 に関する事項

挿入遺伝子領域の 5' 末端及び 3' 末端の近傍配列について、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。30 アミノ酸以上からなる ORF の存在を、6 つの読み枠について、ストップコドンからストップコドンで検索した結果、50 個の ORF が検出された。この 50 個の ORF が既知の毒素たん白質と同一性を有するか確認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん白質を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて同一性検索を行った。その結果、既知の毒素たん白質との同一性は確認されなかった(参考資料 4)。

375 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

81419 ダイズは、改変 *cry1F* 遺伝子及び改変 *cry1Ac* 遺伝子が導入されており、それぞれ改変 Cry1F たん白及び改変 Cry1Ac たん白が発現することによりチョウ目害虫への抵抗性が付与されている。また、81419 ダイズは、改変 *pat* 遺伝子が導入されており、PAT たん白質が発現することにより除草剤グルホシネート耐性が付与されている。これらの点を除けば、81419 ダイズは非組換えダイズとその形態及び生育特性において差異は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

385 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

81419 ダイズで発現する改変 Cry1F たん白質、改変 Cry1Ac たん白質及び PAT たん白質が既知の毒素たん白質と同一性を有するか確認するため、GenBank non-redundant protein データベースに登録されている毒素たん白質を含む全ての既知たん白質のアミノ酸配列を対象に、BLASTp アルゴリズムを用いて同一性検索を行った。その結果、改変 Cry1F たん白質、改変 Cry1Ac たん白質及び PAT たん白質と既知の毒素たん白質との間に同一性は認められなかった(参考資料 7、8、9)。

(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 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質

改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質の物理化学的処理に対する感受性を調べるため、*Pseudomonas fluorescens* で発現させた改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*P. fluorescens* で発現させた改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質と 81419 ダイズ中で発現する同たん白質は、ラテラルフローテストストリップ分析、SDS-PAGE 分析、ウエスタンブロット分析、グリコシル化の有無、MALDI-TOF MS 及び MS/MS によるアミノ酸配列解析により同等性が確認されている(参考資料 10)。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

405 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質の人工胃液中での消化性を、
SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により評価した。その結果、人
工胃液中で反応開始 1 分後には改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質
410 のバンドは検出されなくなった。このことから、改変 Cry1F たん白質及び改
変 Cry1Ac たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認された（参
考資料 12、13）。

イ 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

415 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質の人工腸液中での消化性を、
SDS-PAGE 分析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 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質（約 130kDa）は、反応開始 10 分
間以降、トリプシン耐性コアたん白質（約 65～68kDa）に消化され、人工腸液による
420 処理時間を通じて安定であった。よって、改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac
たん白質は、人工腸液中で速やかに消化されコアたん白質になると考えられた
（参考資料 14）。

ウ 加熱処理

425 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質の加熱処理に対する安定性
を、SDS-PAGE 法及び ELISA 法により評価した。その結果、91℃、60 分の
加熱に対しても分子量の変化は生じないものの、免疫反応性は 91℃、60 分の
加熱により失われたことから、改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白
質は熱に不安定であると考えられた（参考資料 15）。

② PAT たん白質

430 PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性については、以下のア～ウを
検討した結果が報告されている。なお、試験には 81419 ダイズで産生される
PAT たん白質と同一のアミノ酸配列である *E.coli* より産生した PAT たん白質
が用いられている。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

435 PAT たん白質は人工胃液中で 30 秒以内に消化されることが SDS-PAGE 分
析によって確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

イ 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

440 PAT たん白質は人工腸液中で 30 秒以内に消化されることがウエスタンブロ
ット分析によって確認されている（Hérouet *et al.*, 2005）。

ウ 加熱処理

PAT たん白質を用いた加熱処理による変性試験において、SDS-PAGE 分析
の結果、90℃、60 分の加熱処理でも分子量に変化がなかったことが報告され

445 ているが (Hérouet *et al.*, 2005)、50°C、10 分の加熱処理により酵素活性が失
われることが確認されている (Wehrmann *et al.*, 1996)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質の代謝経路への影響

450 改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質は、いずれも *B.*
thuringiensis に由来する殺虫性たん白質 (Bt たん白質) であり、これらのたん
白質が殺虫活性を発揮するメカニズムについては数多くの研究がなされており
(OECD, 2007)、これまで Bt たん白質が他の機能を有するとの報告はない。よ
って、改変 Cry1F たん白質及び改変 Cry1Ac たん白質は、酵素活性をもつとは
455 考えられず、植物体の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

② PAT たん白質の代謝経路への影響

460 PAT たん白質は除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートの
遊離アミノ基を極めて特異的にアセチル化する酵素であり、他の L 型アミノ酸や
D-グルホシネートをアセチル化することはない。また、PAT たん白質は L 型ア
ミノ酸が過剰に存在する場合においても、L-グルホシネートをアセチル化するそ
れ自身の活性に影響を受けることはない (OECD, 1999)。したがって、PAT た
ん白質が植物体の他の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

465 (5) 宿主との差異に関する事項

81419 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 10 ヶ所のほ場において栽培した 81419 ダイズ及び対照の非組換えダイズの
種子について、①主要構成成分、②脂肪酸、③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミ
ン及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 16)。また、参考品種として、
470 81419 ダイズ及び対照の非組換えダイズと成熟期が同程度である 6 種の非組換え
自社商業品種を供試した。

① 主要構成成分

475 種子中の水分、たん白質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維
(ADF)、中性デタージェント繊維 (NDF) 及び総食物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文献に記載された分析値
(OECD, 2012) の範囲内であった。

② 脂肪酸

480 種子中の各脂肪酸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
ダイズと同等又は文献に記載された分析値 (ILSI, 2010) の範囲内であった。

③ アミノ酸

種子中の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組

485 換えダイズと同等又は文献に記載された分析値 (ILSI, 2010) の範囲内であった。

④ ミネラル

種子中の各ミネラルについて分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えダイズと同等であった。

490

⑤ ビタミン

種子中の各ビタミン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と同等、文献に記載された分析値 (OECD, 2012) の範囲内又は自社商業品種の分析値の範囲内であった。

495

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、トリプシンインヒビター及びイソフラボン (総ダイゼイン、総ゲニステイン及び総グリシテイン) 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文献に記載された分析値 (OECD, 2001、OECD, 2012) の範囲内であった。

500

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国、ブラジル及びアルゼンチンで行われたほ場試験の結果、81419ダイズの外界における生存及び増殖能力は、非組換えダイズと同等であることが確認されている。

505

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

81419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。

510

(8) 不活化法に関する事項

81419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。

515

(9) 外国における認可等に関する事項

2013年5月に欧州食品安全機関 (EFSA) に食品及び飼料としての安全性確認の申請が行われた。

2014年2月に米国食品医薬局 (FDA) において食品及び飼料としての安全性確認が終了した。

520

2014年5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確認が終了した。

2014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) において飼料・環境に対する安全性確認が終了した。

525

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

81419 ダイズの栽培方法は、チョウ目害虫の防除の為の薬剤が不要であることを除いて、非組換えダイズと同様である。なお、81419 ダイズには除草剤グルホシネート耐性の形質も付与されているが、その目的は形質転換体選抜の際にマーカーとして利用することであり、栽培時にはグルホシネートは使用されない。

530

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

81419 ダイズの種子の製法及び管理方法は非組換えダイズと同様である。

535

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

540

チョウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ 81419 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、飼料として摂取する家畜への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

545

参考文献

1. Barker, R.F.; Idler, K.B.; Thompson, D.V.; Kemp, J.D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology*. 2(6), p.335-350.
2. Hérouet, Corinne; Esdaile, David J.; Mallyon, Bryan A.; Debruyne, Eric; Schulz, Arno; Currier, Thomas; Hendrickx, Koen; Klis, Robert-Jan van der; Rouan, Dominique. 2005. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 41(2), p.134-149.
3. Hymowitz, T.; Collins, F. I. 1974. Variability of Sugar Content in Seed of *Glycine max* (L.) Merrill and *G. soja* Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal*. 66(2), p.239-240.
4. ILSI. 2010. ILSI Crop Composition Database. Version 4.2. <https://www.cropcomposition.org/query/index.html>, (参照 2013-11-14).
5. Mizuguti, Aki; Yoshimura, Yasuyuki; Matsuo, Kazuhito. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management*. 9(1), p.93-96.
6. Nakayama, Yuichiro; Yamaguchi, Hirofumi. 2002. Natural hybridization in wild soybean (*Glycine max* ssp. *soja*) by pollen flow from cultivated soybean (*Glycine max* ssp. *max*) in a designed population. *Weed Biology and Management*. 2(1), p. 25-30.
7. Natarajan, Savithiry; Xu, Chenping; Bae, Hanhong; Bailey, Bryan A. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean

- genotypes. *Journal of Plant Physiology*. 164(6), p. 756-763.
8. Norris, S. R.; Meyer, S. E.; Callis, J. 1993. The Intron of *Arabidopsis thaliana* Polyubiquitin Genes Is Conserved in Location and Is A Quantitative Determinant of Chimeric Gene Expression. *Plant Molecular Biology*. 21(5), p. 895-906.
 9. OECD. 1999. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11.
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815628.pdf>, (参照 2013-11-14).
 10. OECD. 2000. Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15.
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815668.pdf>, (参照 2013-11-14).
 11. OECD. 2001. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. <http://www.oecd.org/dataoecd/15/60/46815135.pdf>, (参照 2013-11-14).
 12. OECD. 2002. Module II: Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin)-Tolerant Transgenic Plants. 22p. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.25).
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815748.pdf>, (参照 2013-11-14).
 13. OECD. 2007. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis*-Derived Insect Control Proteins. (Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42).
<http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815888.pdf>, (参照 2013-11-14).
 14. OECD. 2012. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients, Toxicants and Allergens. 48p. (Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25).
[http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocument/?cote=ENV/JM/MONO\(2012\)24&doctlanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocument/?cote=ENV/JM/MONO(2012)24&doctlanguage=en), (参照 2014-10-7).
 15. Raboy, Victor; Dickinson, David B. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. *Crop Science*. 33(6), p.1300-1305.
 16. Verdaguer, B.; de Kochko, A.; Beachy, R. N.; Fauquet, C. 1996. Isolation and expression in transgenic tobacco and rice plants, of the cassava vein mosaic virus (CVMV) promoter. *Plant Molecular Biology*. 31(6), p. 1129-1139.
 17. Wehrmann, Axel; Vliet, Adri Van; Opsomer, Chris; Botterman Johan, Schulz, Arno. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*. 14(10), p. 1274-1278.
 18. 伊藤 博史. 松木 順子. 石橋 晃. 2010. 飼料学(66) –II マメ類 1 大豆–. 畜産の研究. 64(6), p. 650-656.
 19. 松木 順子. 伊藤 博史. 熊倉 克元. 石橋 晃. 2010. 飼料学(65) –II マメ類 1 大豆–. 畜産の研究. 64(5), p. 541-546.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Guttikonda, S. 2012. Molecular characterization of DAS-81419-2 soybean. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110813, 54p.
2. Guttikonda, S.; Ring, Shane. 2013. Supplemental Molecular Characterization of DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 120935, 28p.
3. Guttikonda, Satish; Richey, Kimberly. 2012. Cloning and Characterization of the DNA Sequence for the Insert and Its Flanking Border Regions of DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 102126, 42p.
4. Guttikonda, S. 2013. Bioinformatics Analysis of the Insert and Its Flanking Border Sequences in DAS-81419-2 Soybean (Updated August, 2013). Dow AgroSciences LLC. Study ID: 131123, 30p.
5. Maldonado, P.M. 2012. Protein Expression of a Transformed Soybean Cultivar Containing Cry1Ac, Cry1F, and Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) - Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110000.02, 103p.
6. Rapier, K.L.; Gao, Zhifang. 2013. Analysis of a Reading Frame Containing the Partial *cry1Ac* in DAS-81419-2 Soybean. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 120496, 33p.
7. Gao, Z. 2013. Sequence Similarity Assessment of Cry1F to Known Toxins by Bioinformatics (Update, March 2013). Dow AgroSciences LLC. Study ID: 130617, 16p.
8. Rapier, K.L. 2013. Similarity Assessment of Cry1Ac Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis (Update, March, 2013). Dow AgroSciences LLC. Study ID: 130613, 18p.
9. Richey, K.A. 2013. Sequence Similarity Assessment of the PAT Protein to Known Toxins by Bioinformatics Analysis (Update, March, 2013). Dow AgroSciences LLC. Study ID: 130615, 14p.
10. Schafer, B.W.; Oman, T.J.; Clement, J.M.; Juba, A.N.; Embrey, S.K. 2012. Characterization of the Full Length Cry1F Protein Derived from Transgenic Soybean Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110841, 63p.
11. Schafer, B.W.; Oman, T.J.; Clement, J.M.; Juba, A.N.; Embrey, S.K. 2012. Characterization of the Cry1Ac Protein Derived from Transgenic Soybean Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110840, 65p.
12. Korjagin, V.A. 2004. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Cry1F (synpro) Produced by *Pseudomonas fluorescens* DR 1647. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 040097, 22p.
13. Korjagin, V.A. 2001. In Vitro Simulated Gastric Fluid Digestibility Study of Microbially Derived Cry1Ac (synpro). Dow AgroSciences LLC. Study ID: 010026, 27p.
14. Korjagin, V.A.; Gao, Y. 2005. In Vitro Simulated Intestinal Fluid Digestibility Study of Insecticidal Crystal Proteins Cry1Ac and Cry1F. Dow AgroSciences LLC. Study ID: GH-C 5778, 52p.
15. Shan, G.; Embrey, S.K. 2005. Heat Lability of Insecticidal Crystal Proteins Cry1Ac and Cry1F. Dow AgroSciences LLC. Study ID: GH-C 5777, 35p.
16. Fast, B.J.; Johnson, T.Y. 2012. Nutrient Composition of a Transformed Soybean Cultivar

Expressing Cry1Ac, Cry1F, and PAT: Event DAS-81419-2. Dow AgroSciences LLC. Study ID: 110000.01, 476p.