

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グリホサート及び
イソキサフルトール耐性ダイズ
FG72 系統**

**平成 28 年 8 月 9 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	4
II	確認対象飼料の概要	4
III	審議内容	5
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	5
(1)	遺伝的素材に関する事項	5
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	5
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	5
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	5
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	6
(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	6
(2)	遺伝的先祖に関する事項	6
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	6
(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	7
(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	7
(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	8
（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	14
（６）コピー数に関する事項	14
（７）安定性に関する事項.....	14
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	14
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	15
（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	15
6 組換え体に関する事項.....	15
（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	15
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項.....	15
（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	16
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	18
（５）宿主との差異に関する事項	19
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	20
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	20
（８）不活化法に関する事項	20
（９）外国における認可等に関する事項	20
（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項	20
（11）種子の製法及び管理方法に関する事項	21
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	21
IV 審議結果	21
V 参考文献及び参考資料	21

「除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72 系統」に係る 安全性確認

I はじめに

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72 系統（以下「FG72 ダイズ」という。）について、平成 26 年 3 月 12 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：除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72 系統

性 質：除草剤（グリホサート及びイソキサフルトール）耐性

申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Bayer CropScience（ドイツ）

FG72 ダイズは、トウモロコシ *Zea mays* 由来の改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（以下「*2mepsps* 遺伝子」という。）及び *Pseudomonas fluorescens* 由来の改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子（以下「*hppdPfW336* 遺伝子」という。）が導入されたダイズである。

除草剤グリホサートは 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下、「EPSPS たん白質」という。）の働きを阻害することで除草活性を示すが、*2mepsps* 遺伝子により発現する改変 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（以下「2mEPSPS たん白質」という。）は、グリホサートの影響を受けないため、植物にグリホサート耐性を付与する。また、除草剤イソキサフルトールは、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（以下、「HPPD たん白質」という。）の働きを阻害することで除草活性を示すが、*hppdPfW336* 遺伝子により発現する改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（以下「HPPD W336 たん白質」という。）は、イソキサフルトールによる活性阻害を受けないため、植物にイソキサフルトール耐性を付与する。

FG72 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、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、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、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。

なお、ダイズは主に大豆油かすとして家畜等の飼料に使用されている。

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

FG72 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr) の商業品種 Jack である。

FG72 ダイズには、トウモロコシ (*Zea mays*) 由来の *2mepsps* 遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* 由来の *hppdPFW336* 遺伝子が導入されている。

2mepsps 遺伝子から産生される 2mEPSPS たん白質は、除草剤グリホサート耐性を付与する。また、*hppdPFW336* 遺伝子から産生される HPPD W336 たん白質は、除草剤イソキサフルトール耐性を付与する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

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鶏用、豚用、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

FG72 ダイズ及び非組換えダイズの構成成分等の量は明らかになっており、比較が可能である (Kakade, 1972、CRC, 1989、Hui, 1992、Scherz, 1994、Douglas, 1996、OECD, 2001、USDA-IOWA, 2001、ILSI, 2007、参考資料 38)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

FG72 ダイズは、2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質を発現することにより、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールに対する耐性が付与されている。この点を除けば、FG72 ダイズと非組換えダイズと差異はなく、使用方法について、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も非組換えダイズとの相違はない。

(1) ~ (4) より、FG72 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

FG72 ダイズは、*2mepsps* 遺伝子から産生される 2mEPSPS たん白質及び *hppdPFW336* 遺伝子から産生される HPPD W336 たん白質により、除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性が付与されており、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールが散布されても影響を受けずに生育することができる。そのため、生育時期を問わず、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールを散布することができ、効率的な雑草防除が可能になる。

なお、FG72 ダイズの飼料としての利用目的及び利用方法は、非組換えダイズと相違ない。

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

FG72 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr) の商業品種 Jack である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

ダイズは、中国北部及び中部が原産であり、現在は世界各地で広く栽培されているが、野生の状態では確認されていない (OECD, 2000)。soja 亜属の野生種 ツルマメ (*G. soja* L.) が、ダイズの祖先種として考えられており、中国、ロシアの隣接地域、朝鮮、日本及び台湾に分布している (OECD, 2000)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズには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、イソフラボン類、ラフィノース、スタキオース及びフィチン酸が含まれ (OECD, 2001)、それらの含有量は明らかになっている。

トリプシンインヒビターはたん白質分解酵素トリプシンの阻害物質であり、消化酵素であるトリプシンを不活化し、たん白質の消化を阻害する (OECD, 2001) が、加熱により失活する。

レクチンは赤血球凝集素としての働きを有するため、血液凝固の原因の一つとなるが、脱脂や粉末を炒るといった加熱を必要とする加工によりダイズ中のレクチン活性が 100 分の 1 に減少する (Padgett et al., 1996 ; OECD, 2001)。

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家畜等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、家畜等に対する寄生性又は定着性は知られていない。

(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、糸状菌等の感染によって種々の病害 (モザイクウイルス病、斑点細菌病、紫斑病等) が発生する (OECD, 2000) が、これらが家畜等に対する病原性を示すことは知られていない。

(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

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)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

ダイズは、一年生の自殖性植物である。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ものの、ダイズ及びツルマメ間の自然交雑率は極めて低いことが報告されている (Nakayama et al., 2002, Mizuguti et al., 2009, Mizuguti et al., 2010)。

121 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

122 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
123 ルーダー処理大豆等が挙げられる。そのうち大豆油かすは飼料原料として最も多
124 く使用されており、各家畜等の飼料に広く使用されている（伊藤ら、2010、松
125 木ら、2010）。

126
127 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

128 ダイズ種子には、トリプシンインヒビター、レクチン等が含まれているが、こ
129 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
130 め、ダイズは飼料として安全に利用されている。

131
132 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

133 ダイズ是一年生の短日植物であり、自家受粉により種子で繁殖する。一般には
134 10℃以下では発芽は極めて悪く、通常の貯蔵条件下でも発芽力は3年後にはほと
135 んど失われる（昆野、2001）。ダイズの栽培地域にはそれぞれの気象条件に適
136 した作型が存在し、播種時期や収穫時期が必然的に決まっており、ダイズの生
137 存・増殖能力は気象条件により大きく制限されている（後藤、2001）。

138
139 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

140 ダイズの近縁種であるツルマメ（*G. soja* L.）は、ダイズと同様、有害生理活
141 性物質として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
142 酸を含むことが報告されている(Hymowitz *et al.*, 1974、Raboy *et al.*, 1993、
143 Natarajan *et al.*, 2007)。

144
145 4 ベクターに関する事項

146 (1) 名称及び由来に関する事項

147 FG72 ダイズの作出において用いられた DNA 断片は、プラスミド pSF10 か
148 ら制限酵素処理により切り出された断片である。プラスミド pSF10 は、プラス
149 ミド pMCS5 を基本骨格として作製されている(参考資料 1)。

150
151 (2) 性質に関する事項

152 プラスミド pMCS5 の塩基数は、3081bp である。また、プラスミドの塩基配
153 列及び制限酵素切断部位は明らかとなっており、既知の有害な塩基配列を含まな
154 い(参考資料 1)

155
156 (3) 薬剤耐性に関する事項

157 プラスミド pMCS5 は、アンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子を有し、プラ
158 スミドが挿入された大腸菌を選抜するためのマーカーとして用いられているが、
159 形質転換に用いられた DNA 断片には同遺伝子は含まれていない。なお、*bla* 遺
160 伝子が FG72 ダイズに含まれていないことはサザンブロット分析により確認さ
161 れている(参考資料 6,7)

162 (4) 伝達性に関する事項

163 プラスミド pMCS5 には伝達性因子は含まれていない。

165 (5) 宿主依存性に関する事項

166 プラスミド pMCS5 の宿主域は、大腸菌(*E. coli*)等数種のグラム陰性細菌に限
167 られており、植物、家畜等が宿主となることはない。

169 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

170 *2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPfW336* 遺伝子発現カセットを含む
171 DNA 領域をプラスミド pMCS5 に組み込み、導入用プラスミド pSF10 を作成し
172 ている(参考資料 3)。

174 (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

175 導入用プラスミド pSF10 の挿入 DNA 領域をパーティクルボンバードメント
176 法(Finer *et al.*,1991; Finer *et al.*,1992)によりダイズに導入している。

178 5 挿入遺伝子に関する事項

179 (1) 供与体に関する事項

180 ① 名称、由来及び分類に関する事項

181 *2mepsps* 遺伝子は、トウモロコシ(*Z. mays* L.)に由来する。*hppdPfW336*
182 遺伝子は、*P. fluorescence* A32 株に由来する。

184 ② 安全性に関する事項

185 *2mepsps* 遺伝子の供与体であるトウモロコシ(*Z. mays*) には、長期にわた
186 り飼料として利用された歴史がある(OECD, 2002) 。なお、*2mepsps* 遺伝子
187 は平成 22 年 6 月に飼料としての安全性を確認されている除草剤耐性ワタ
188 GHB614 系統に導入されている遺伝子と同一の配列を持つ。

189 *hppdPfW336* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* は自然界に広く存在し
190 ている。輸送等のストレス条件下の魚類に感染することはあるが、ウマ、ニ
191 ワトリ等の恒温動物では病原性を持たない(OECD, 1997)。なお、*P.*
192 *fluorescens* は米国において果樹や野菜での細菌の増殖を抑えるための生物農
193 薬として安全に使用され、米国環境保護庁(EPA)は、*P. fluorescens* を有効成
194 分とする生物農薬について、ヒトや動物の健康に悪影響を及ぼすものではな
195 いと評価している(EPA, 2009)。

197 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

198 宿主品種 Jack の未熟胚から誘導したカルス塊に対し、プラスミド pSF10 か
199 ら得られた DNA 断片を用いて、パーティクルボンバードメント法により形質転
200 換を行った。形質転換後のカルス塊は、選抜マーカーとして、除草剤イソキサフ
201 ルトールの植物体内分解産物であり、HPPD たん白質活性を阻害するジケトニ

トリル (DKN) (図 1) を含む培地にて培養することで選抜した後、再生培地にて培養し、植物体 (T0 世代) を再生させた。また、T0 世代の自殖後代に除草剤グリホサートを散布し、耐性を示した個体を選抜し、さらに一般的な育成プログラムに従って自殖を行い、FG72 ダイズを得た。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

2mepsps 遺伝子のプロモーターには、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域である Ph4a748 プロモーターを用いた (Chaboute *et al.*, 1987)。

hppdPFW336 遺伝子のプロモーターには、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター由来の Ph4a748ABBC プロモーターを用いた (Chaboute *et al.*, 1987)。なお、Ph4a748ABBC プロモーターは *2mepsps* 遺伝子に用いた Ph4a748 プロモーターと由来が同じであるが、内部配列の一部を重複させ、植物細胞内でのプロモーター活性を高めている。

② ターミネーターに関する事項

2mepsps 遺伝子のターミネーターには、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻訳領域由来の 3'histonAt ターミネーターを用いた (Chaboute *et al.*, 1987)。

hppdPFW336 遺伝子のターミネーターには、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のプラスミド pTiT37 の T-DNA より得た、ノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域である 3'nos ターミネーターを用いた (Depicker *et al.*, 1982)。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

挿入 DNA の構成要素は、いずれもその由来及び機能等は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない(参考資料 3)。

(4) 性質に関する事項

挿入 DNA の構成要素の由来及び機能等について、表 1 にまとめた(参考資料 2)。*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336* の機能の詳細は表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び性質等

構成要素	由来及び機能
<i>hppdPFW336</i> 遺伝子発現カセット	
nos ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) プラスミド pTiT37 のノパリン合成酵素遺伝子の 3'非翻訳領域を含む配列 (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。転写を終結し、3'ポリアデニル化を行う。
<i>hppdPFW336</i> 遺伝子	<i>P. fluorescens</i> A32 株の HPPD たん白質をコードする遺伝子を由来とする。本遺伝子がコードするアミノ酸配列 336 番目

	のグリシンをトリプトファンへ置換することで除草剤イソキサフルトールに対する親和性を低減し、耐性を付与する (Boudec <i>et al.</i> , 2001)。
TPotp Y	ヒマワリ (<i>H. annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の RubisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に合成された配列 (Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。本ペプチドの 55 番目のアミノ酸であるシステインをチロシンへ置換している。HPPD W336 たん白質を色素体に輸送する。
5'TEV	タバコ etch ウイルスのリーダー配列を含み (Carrington <i>et al.</i> , 1990)、 <i>hppdPfW336</i> 遺伝子発現カセットの発現量を高める。
Ph4a748ABBC プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列で、植物中で構成的に <i>hppdPfW336</i> 遺伝子の転写を開始させる。また、一部の内部配列を重複することにより植物細胞内でのプロモーター活性を高めている (Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。
2mepsps 遺伝子発現カセット	
Ph4a748 プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域を含む配列 (Chaboute <i>et al.</i> , 1987)。植物中で構成的に <i>2mepsps</i> 遺伝子の転写を開始させる。
Intron1 h3At	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のヒストン H3.Ⅲ 第Ⅱ遺伝子の第一イントロン (Chaubet <i>et al.</i> , 1992)。生長の著しい植物組織での発現を高める。
TPotp C	ヒマワリ (<i>H. annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の RubisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドのコード領域を基に合成された配列 (Lebrun <i>et al.</i> , 1996)。2mEPSPS たん白質を色素体に輸送する。
<i>2mepsps</i> 遺伝子	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子 (<i>epsps</i> 遺伝子) に突然変異を導入した、2mEPSPS たん白質をコードする遺伝子。除草剤グリホサートに対する耐性を付与する (Lebrun <i>et al.</i> , 2003)。
histonAt ターミネーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のヒストン H4 遺伝子の 3'非翻訳領域 (Chaboute <i>et al.</i> , 1987) を含む配列で、転写を終結させ、3'ポリアダニル化を生じさせる。

234

235

236

237

① *2mepsps* 遺伝子の機能

epsps 遺伝子により産生される EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路の酵素の一つであり、ホスホ

238 エノールピルビン酸 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸 (S3P) から 5-エノールピ
239 ルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) を生じる反応を触媒する。除草剤グリホサ
240 ートはこの反応を阻害するため (Boocock *et al.*, 1983)、グリホサートを散
241 布された植物はたん白質の合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯
242 死する。

243 一方、*2mepsps* 遺伝子から産生される 2mEPSPS たん白質は、EPSPS た
244 ん白質のアミノ酸配列の 2 カ所を部分特異的に変異させていることで、グリホ
245 サートに対する結合親和性が低下した結果、グリホサートによる阻害を受けな
246 いため、植物はグリホサートへの耐性を示す。

247 ② *hppdPfw336* 遺伝子の機能

248 *hppd* 遺伝子から産生される HPPD たん白質は、チロシン代謝系路の酵素の
249 一つであり、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) と酸素からホモゲン
250 チジン酸 (HGA) を生じる反応を触媒する。除草剤イソキサフルトールはそ
251 の代謝産物であるジケトニトリル体 (DKN) (図 1) が HPPD たん白質の活
252 性部位に結合することにより、この反応を阻害するため、イソキサフルトール
253 を散布された植物は光合成や抗酸化システムに重要なプラストキノン及びトコ
254 フェロールの前駆体 (図 2) である HGA の生産ができなくなり
255 (DellaPenna *et al.*, 2006)、イソキサフルトールを散布された植物は枯死す
256 る。

257 一方、*hppdPfw336* 遺伝子から産生される HPPD W336 たん白質は、
258 HPPD たん白質のアミノ酸配列において 1 つのアミノ酸に変異が導入される
259 ことで、4-HPP とは結合可能な一方、分子構造の大きい DKN との結合親和
260 性が低下し、DKN による活性阻害を受けず正常代謝が行えるため、植物はイ
261 ソキサフルトール耐性を示す。
262

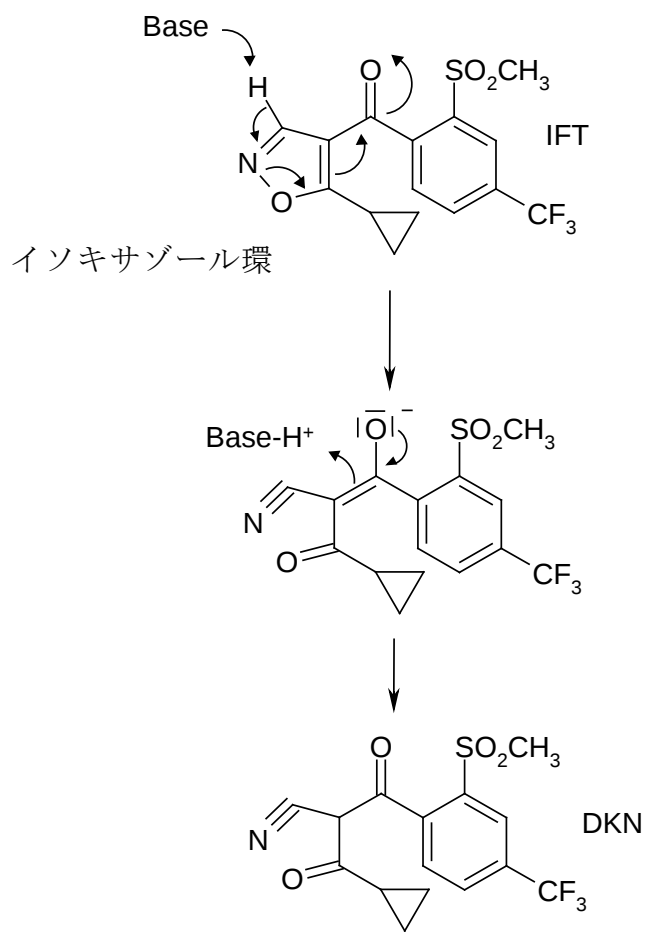


図 1 植物体内におけるイソキサフルトールの代謝

IFT (Isoxaflutole) : 5-シクロプロピル-4-(2-メチルスルフォニル-4-トリフルオロメチルベン
ゾイル) イソキサゾール

DKN (Diketoneitrile) : 2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメ
チルフェニル)プロパン-1,3-ジオン

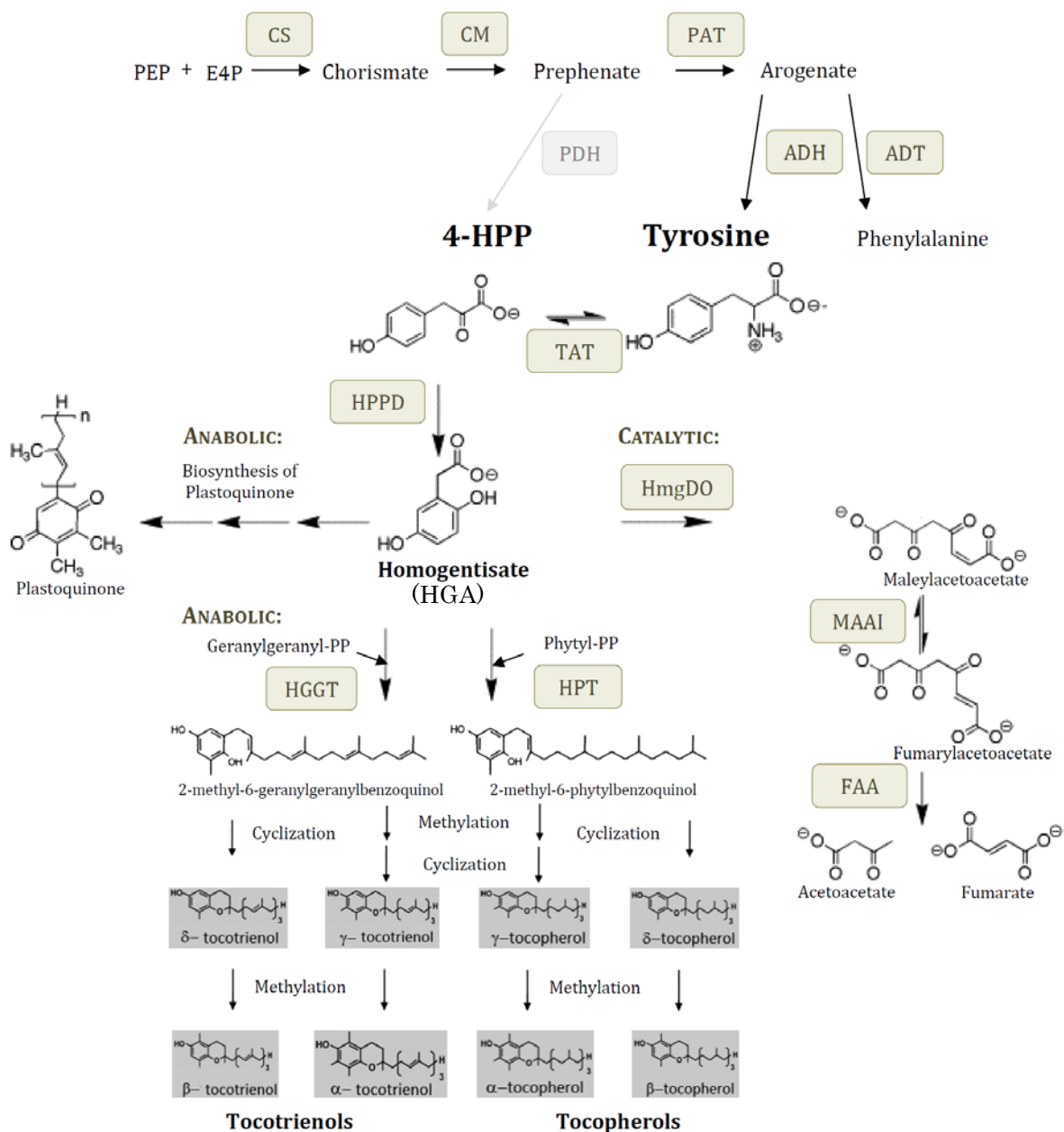


図2 チロシン代謝経路における HPPD たん白質の役割

284 (5) 純度に関する事項

285 プラスミド pSF10 の塩基配列解析により挿入 DNA の構成要素の塩基配列、
286 大きさ及び由来が明らかであり、目的外の遺伝子の混入はないことが確認されて
287 いる。

288
289 (6) コピー数に関する事項

290 FG72 ダイズに導入された遺伝子のコピー数を決定し、挿入 DNA 領域及びプ
291 ラスミド pSF10 由来の挿入 DNA 領域以外の配列の有無を確認するため、サザ
292 ンブロット分析を行った。その結果、FG72 ダイズのゲノム中には、挿入 DNA
293 領域が反復して 2 コピー挿入されていること、プラスミド pSF10 の挿入 DNA
294 領域外のプラスミド配列は導入されていないことが確認された（参考資料
295 4,6,7,29,32）。なお、FG72 ダイズの作出において、プラスミド pSF10 から制
296 限酵素処理により得られた挿入 DNA 断片を精製した上で形質転換に使用してい
297 ることから、挿入 DNA 領域外の配列が FG72 ダイズに導入される可能性は低
298 いと考えられる。

299 FG72 ダイズ中の挿入 DNA 及びその近傍配列の塩基配列について決定するた
300 め、塩基配列解析を行った。その結果、宿主ゲノムの一部の転座、挿入 DNA に
301 含まれるプロモーターPh4a748 の部分配列（158 bp）の挿入、プラスミド
302 pSF10 及び宿主ゲノムのいずれにも一致しない配列（24bp）の存在が確認され
303 た。また、挿入 DNA の導入により宿主ゲノムの 25 bp 及び 2bp の欠失が確認さ
304 れた。これらの欠失及び付加を除き、FG72 ダイズ中の導入遺伝子とプラスミド
305 pSF10 における挿入 DNA 領域の配列は一致していること及び近傍配列は宿主
306 ゲノム由来であることが確認された（参考資料 4,5,8）。

307 また、挿入 DNA の挿入部位及び転座部位に内在性遺伝子が存在した可能性に
308 ついて検証した。その結果、FG72 ダイズの挿入部位の近傍領域に推定システイ
309 ンプロテアーゼ遺伝子が存在する可能性が示された。しかし、同遺伝子の発現を
310 RT-PCR 分析により確認した結果、FG72 ダイズ及び対照の非組換えダイズの両
311 方において同遺伝子の発現が認められ、DNA の挿入による同遺伝子の発現に対
312 する影響は認められなかった（参考資料 30）。したがって、挿入 DNA の導入
313 により既知の内在性遺伝子への影響を受けた可能性は低いと考えられた。

314
315 (7) 安定性に関する事項

316 FG72 ダイズにおける挿入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、
317 4 世代の FG72 ダイズから得られた DNA を用いて、サザンブロット分析を行っ
318 た。その結果、挿入遺伝子が複数世代に安定して遺伝していることが確認された
319 （参考資料 9）。

320
321 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

322 FG72 ダイズにおける 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質の発
323 現量を確認するため、各成長期（4-8 複葉期）の各組織（葉、茎及び根）及び米
324 国の 10 か所のほ場から採取された種子を用いて酵素免疫測定法（ELISA）で測

定した。その結果、供試した全ての組織において 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質の発現が確認された（参考資料 10,11,12,13,33）。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

プラスミド pSF10 には、アンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が存在するが、形質転換にはプラスミド pSF10 から切断された *2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPfW336* 遺伝子発現カセットのみを含む断片が精製され用いられているため、FG72 ダイズ中に *bla* 遺伝子は挿入されていない。なお、FG72 ダイズ中に *bla* 遺伝子が含まれていないことはサザンブロット分析により確認されている（参考資料 6,7）。

(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

FG72 ダイズにおける挿入 DNA 及びその両近傍配列の境界領域におけるオープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。6 つの読み枠で終止コドン(TAA、TAG 及び TGA)から終止コドンまでの連続する 8 アミノ酸以上の ORF 検索を行った結果、350 個の ORF が検出された(参考資料 14)。これらの ORF について、既知の毒性たん白質¹等との FASTA アルゴリズムを用いて検索を行った結果、一部の ORF において既知の毒性たん白質に相同性を示すものがあったが、相同性を示すアミノ酸配列が短く生物学的に有意ではないことや、一致したアミノ酸数のうち完全に一致したものの割合が低いこと等から、毒性たん白質として機能する可能性は低いと考えられた(参考資料 14)。

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

FG72 ダイズは *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfW336* 遺伝子が導入されており、それぞれ 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質を発現することにより除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性が付与されている。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① 2mEPSPS たん白質

2mEPSPS たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用い、データベース(Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept)中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行った。その結果、2mEPSPS たん白質と相同性を示す既知の毒性たん白質等は認められなかった（参考資料 15）。

¹ NCBI non-redundant protein database(version NCBI_NR_V2013_1218)において toxic、toxin、ricin というキーワードで検索した結果からベクターやプラスミド等の人工的な配列等毒素ではない配列を除去して作成した Bayer toxin database に登録されている約 28000 の毒性たん白質の配列

③ HPPD W336 たん白質

HPPD W336 たん白質のアミノ酸配列について、BLASTP アルゴリズムを用い、データベース (Uniprot_Swissprot、Uniprot_TrEMBL、PDB、DAD 及び GenPept) 中に登録されている全てのたん白質との相同性検索を行った。その結果、HPPD たん白質ファミリーの病原性細菌 *Vibrio vulnificus* 由来の VLLY たん白質と *Legionella pneumophila* 菌由来の LLY たん白質との高い類似性が認められた (参考資料 16)。これらのたん白質はデータベース上では、HPPD たん白質及び溶血素と注釈がなされているものの、両たん白質が *V.vulnificus* や *L.pneumophila* の溶血活性の直接的な原因とは結論づけられていない(Rdest *et al.*, 1991; Wintermeyer *et al.*, 1994; Chang *et al.*,1997)。一方で、HPPD たん白質により産生される HGA が自発的に酸化重合することでフリーラジカルを有する血漿可溶性メラニン (Plasma soluble melanin:PSM) の一種を産出し、この PSM が *V.vulnificus* や *L.pneumophila* の溶血活性に関与しているとの報告がある(Hegedus and Nayak, 1994)。また、LLY たん白質は HPPD たん白質活性を有しており、HGA を産生すると報告されている(Steinert *et al.*, 2001)。これらより VLLY たん白質及び LLY たん白質自体が溶血素として働くのではなく、両たん白質により過剰に産出された HGA の一部が PSM になることで *V.vulnificus* *L.pneumophila* の溶血活性を示すことが考えられる。HGA の酸化重合による PSM の産出は HGA が蓄積する場合に起こりうるが、植物体内では HGA はプラストキノンやトコフェロール合成に利用されるため、蓄積されることはないとされている (DellaPenna and Pogson, 2006)。実際に、FG72 ダイズ及び非組換えダイズにおける HGA を測定したところ、いずれのサンプルでも定量限界値未満であったことから、FG72 ダイズにおいても HGA は蓄積されずに代謝されていると考えられた。

(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

遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性を確認するため、2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質について、人工胃液、人工腸液及び加熱処理を行い、以下のとおり各分析を行った。試験には、大腸菌 (*E.coli*) で生産した 2mEPSPS たん白質及び HPPD W336 たん白質をそれぞれ用いられている。これらのたん白質及び FG72 ダイズで発現している各たん白質については、分子量 (SDS-PAGE 分析)、免疫反応性 (ウェスタンブロット分析)、アミノ酸配列 (トリプシン消化ペプチド分析)、酵素活性、N-末端配列 (エドマン分解) により相同性が確認されている (参考資料 17,18)。

① 2mEPSPS たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

2mEPSPS たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウェ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 30 秒後に

は 2mEPSPS たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、2mEPSPS 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 19）。

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

2mEPSPS たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により評価した。その結果、人工腸液中で反応開始 30 秒後には 2mEPSPS たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、2mEPSPS たん白質は人工腸液中で速やかに消化されることが確認された（参考資料 21）。

ウ 加熱処理

2mEPSPS たん白質の加熱処理に対する感受性を、ウェスタンブロット分析により評価した。その結果、90℃で 60 分以上の加熱処理した場合、2mEPSPS たん白質のバンドのシグナル強度が減少した（参考資料 23）。

また、2mEPSPS たん白質の酵素活性を測定した結果、2mEPSPS たん白質の酵素活性は 60℃以上の加熱処理で急激に低下し、75℃の加熱処理で失活した（参考資料 24）。

② HPPD W336 たん白質

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

HPPD W336 たん白質の人工胃液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウェ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 30 秒後には HPPD W336 たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、HPPD W336 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 20）。

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

HPPD W336 たん白質の人工腸液中での消化性を、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により評価した。その結果、人工腸液中で反応開始直後には HPPD W336 たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、HPPD W336 たん白質は人工腸液中で速やかに消化されることが確認された（参考資料 22）。

ウ 加熱処理

HPPD W336 たん白質の加熱処理に対する感受性を、ウェスタンブロット分析により評価した。その結果、90℃で 60 分の加熱処理した場合においても、HPPD W336 たん白質のバンドのシグナル強度の変化は見られず、90℃、60 分以上の処理では安定であった（参考資料 25）。さらに、HPPD W336 たん白質の加熱処理に対する感受性を ELISA 法により分析した結果、HPPD W336 たん白質の免疫反応性は 75℃、30 分の加熱処理で定量限界値以下となったことから、HPPD W336 たん白質は加熱処理に対して安定で

はなく、たん白質の高次構造が変化し、抗体との結合性が低下することが示された（参考資料 31）。

また、HPPD W336 たん白質の酵素活性を測定した結果、HPPD W336 たん白質の酵素活性は 60℃以上で 2.5 分以上の加熱処理で失活した(参考資料 26)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 2mEPSPS たん白質

2mEPSPS たん白質及び EPSPS たん白質について、基質である PEP 及び S3P への親和性を確認するため、Km 値を測定したところ、ほぼ同等であった。このことより、両たん白質の間でそれぞれの基質に対する結合部位に変化はなく、2mEPSPS たん白質においては、変異により基質特異性を保持しながら、それ以外の部位に変異が生じてグリホサートに対する高い耐性が誘導されたと考えられた。また、2mEPSPS たん白質が既存の EPSPS 活性に加算されることにより従来よりも増大しても、EPSPS たん白質はシキミ酸合成経路の律速酵素ではないため、同経路の最終生成物である芳香族化合物の生産量に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる(Weiss and Edwards, 1980;Herrmann, 1983;Herrmann、1995a,b;Heldt, 2000;Buchanan, 2005)。したがって、2mEPSPS たん白質が宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

② HPPD W336 たん白質

HPPD W336 たん白質は、チロシン代謝経路における 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) からホモゲンチジン酸 (HGA) への反応を触媒する酵素である。そこで、チロシン代謝経路において、HGA の上流、及び下流の代謝産物に対する影響を考察した。

チロシン代謝は厳密に制御されており、チロシン量の上昇は、HPPD 阻害型除草剤の毒性の理由の一つと考えられている(Prisbylla *et al.*, 1993;Pallett *et al.*, 1998)が、チロシン含量について、FG72 ダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は見られず、チロシンが前駆体となっている他の経路への影響はないと考えられる。またチロシン以外の全てのアミノ酸含量についても、FG72 ダイズと非組換えダイズとの間に統計学的有意差は見られず、FG72 ダイズにおいて HPPD たん白質を過剰発現させてもフェニルアラニンやトリプトファンなどチロシン生合成に関連する他のアミノ酸含量や代謝経路に影響がないことを示している。

また、HPPD たん白を単独で過剰発現させても総トコフェロール量はほとんど変化させないことが報告されている(Tsegaye *et al.*,2002;Falk *et al.*,2003;Raclaru *et al.*,2006;Farre *et al.*,2012)。FG72 ダイズにおいても、HPPD W336 たん白質の発現により HPPD たん白質の総量が増加するが、HGA 含量の増加は認められておらず(参考資料 34)、その下流のトコフェロール含量も文献値の範囲内であった。

また、HPPD たん白質の基質として、4-HPP の他にフェニルピルビン酸

(PP)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC) 及び 2-オキソ-5-チアヘキサン酸 (KMTB) の 4 種の化合物が植物体内に存在する基質として報告されている(Lindstedt *et al.*, 1977、参考資料 35)。これら 4 物質と HPPD W336 たん白質との反応活性を比較した結果、4-HPP と比較して HPPD W336 たん白質との反応活性が極めて低いことから、植物体内の 4-HPP 存在下においてこれら 4 物質が HPPD W336 たん白質の基質として利用されることはないと考えられた。

したがって、*hppdPfW336* 遺伝子の導入に伴い HPPD W336 たん白質の発現により HPPD 活性が増加しても、チロシン異化経路に影響を及ぼさず、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた (参考資料 36,37)。

(5) 宿主との差異に関する事項

FG72 ダイズと非組換えダイズとの差異を評価するため、米国の 10 か所のほ場において栽培された FG72 ダイズ及び非組換えダイズの種子を用いて、①主要構成成分、②アミノ酸、③脂肪酸、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 38)。FG72 ダイズについては、除草剤無散布区及び除草剤(グリホサート及びイソキサフルトール)散布区を設定した。FG72 ダイズへの除草剤散布については、グリホサート (1060 g/ha) 及びイソキサフルトール (70 g/ha) を散布した。

① 主要構成成分

種子の水分、粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、中性デタージェント繊維及び酸性デタージェント繊維について分析を行った結果、いずれの成分も対照の非組換えダイズと同等又は商業栽培品種の文献値の範囲内であった。

② アミノ酸

種子の各アミノ酸について分析を行った結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えダイズと同等であった。

③ 脂肪酸

種子の各脂肪酸について分析を行った結果、リグノセリン酸以外の脂肪酸は対照の非組換えダイズと同等又は商業栽培品種の文献値の範囲内であった。FG72 ダイズの除草剤散布区のリグノセリン酸については、文献値の範囲を超えていたが、文献値が単一値であり、また、その差は僅かであったことから、非組換えダイズと同程度と考えられた。

④ ミネラル

種子の各ミネラルについて分析を行った結果、いずれのミネラルも対照の非組換えダイズと同等又は商業栽培品種の文献値の範囲内であった。

⑤ ビタミン

種子の各ビタミンについて分析を行った結果、いずれのビタミンも対照の非組換えダイズと同等又は商業栽培品種の文献値の範囲内であった。

⑥ 有害生理活性物質

種子の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、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース及び各イソフラボンについて分析を行った結果、いずれの物質も対照の非組換えダイズ以下若しくはその範囲内又は商業栽培品種の文献値の範囲内であった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

生存及び増殖能力について、FG72 ダイズと非組換えダイズとの間に相違は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

生存及び増殖能力の制限要因について、FG72 ダイズと非組換えダイズとの間に相違は認められなかった。

(8) 不活化法に関する事項

物理学的防除（耕耘）や化学的防除（グルホサート及びイソキサフルトール以外の除草剤散布）など、ダイズを枯死させる従来の方法によって FG72 ダイズは不活化される。

(9) 外国における認可等に関する事項

2011 年 7 月 欧州食品安全機関(EFSA)に食品・飼料としての安全性確認の申請が行われた。

2012 年 2 月、オーストラリア・ニュージーランド食品基準局 (FSANZ) において食品、飼料としての安全性確認が終了した。

2012 年 6 月 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・飼料に係る安全性確認が終了した。

2012 年 8 月 米国食品医薬局 (FDA) において食品・飼料としての安全性確認が終了した。

2013 年 8 月 米国農務省 (USDA) において無規制栽培の審査が終了した。

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

FG72 ダイズの栽培方法については、除草剤グルホサート及びイソキサフルトールが散布可能な点を除き、非組換えダイズとの相違はない。

また、FG72 ダイズへの使用が想定される除草剤グルホサート、イソキサフル

トールとそれらの主要な代謝産物(アミノメチルスルホン酸(AMPA)、DKN)について FG72 ダイズへの残留及びそれらの摂取が家畜等の健康に及ぼす影響を検討した結果、安全上の問題は認められなかった(参考資料 27)。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

FG72 ダイズにおける種子の製法及び管理方法については、非組換えダイズとの相違はない。なお、FG72 ダイズの挿入 DNA の周辺配列を利用したプライマーを用いた PCR 分析による FG72 ダイズを特異的に識別する方法が確立されている(参考資料 28)。

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

IV 審議結果

除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72 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等への安全上の問題はないと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Boocock, M. R., Coggins, J. R. 1983. Kinetics of 5-enolpyruvylshikimate- 3-phosphate synthase inhibition by glyphosate. FEBS LETTERS 154: 127-133.
- 2 Boudec, P., Rodgers, M., Dumas, F., Sailland, A., Bourdon, H. 2001. Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants which contain such a gene and which are tolerant to herbicides. U.S. Patent US 6,245,968 B1.
- 3 Buchanan B. B., Gruissem, W. 2005. 植物の生化学・分子生物学 学会出版センター p.342-358.
- 4 Carrington, J. C., Freed, D. D. 1990. Cap-independent enhancement of the translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology 64: 1590-1597.
- 5 Chaboute, M. E., Chaubet, N., Philipps, G., Ehling, M., Gigot, C. 1987. Genomic organization and nucleotide sequence of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 8: 179-191.
- 6 Chaubet, N., Clement, B., Gigot, C. 1992. Genes encoding a histone H3.3-like variant in *Arabidopsis* contain intervening sequences. Journal of Molecular Biology 225: 569-574.
- 7 CRC. 1989. Vaidehi, M. P., Kadam, S. S., Soybean In: Handbook of world food legumes. Vol.III. CRC press inc. Boca Raton, Florida, USA. P.1-21

- 8 DellaPenna, D., Pogson, B. J. 2006. Vitamin synthesis in plant: tocopheroles and carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 711-738.
- 9 Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P. 1982. Goodman, H. M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular & Applied Genetics* 1: 561-573.
- 10 Douglas, J. S. 1996. Recommended compositional and nutritional parameters to test in soybean. Technical assessment services, Washington DC, USA.
- 11 EPA. Biopesticide and Pollution Prevention Division. 2009. *Pseudomonas fluorescens* Final Registration Review Decision Registration Review Case 6006. Docket Number EPA-HQ-2007-0567. <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPP-2007-0567-0014;oldLink=false> (accessed 2012-4-3) .
- 12 Finer, J. J., McMullen, M. D. 1991. Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 27: 175-182.
- 13 Finer J. J., Vain, P., Jones, M. W., McMullen, M. D. 1992. Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Reports* 11: 323-328.
- 14 Hui, Y. H. 1992. *Encyclopedia of food science and technology*. Vol. 4. John Wiley & sons inc. New York. P2389-2396.
- 15 Hymowitz, T., Harlan, J. R. 1983. Introduction of soybeans to north America by Samuel Bowen in 1765. *Economic Botany* 37: 371-379.
- 16 ILSI. 2007. Crop composition database search results version 3.0.
- 17 Kakade, M. L., Simons, N. R., Liener, I. E., Lambert, J. W. 1972. Biochemical and nutritional assessment of different varieties of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 20: 87-90.
- 18 Lebrun, M., Leroux B., Sailland A. 1996. Chimeric gene for the transformation of plants. U.S. Patent 5,510,471.
- 19 Lebrun, M., Sailand, A. Freyssinet, G. 2003. Mutated 5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate synthase, gene docing for said protein and transformed plants containing said gene. U.S. Patent US 6,566,587.
- 20 Lindstedt, S., Odelhög, B., Rundgren, M. 1977. Purification and some properties of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas* sp. P.J.874. *Biochemistry* 16: 3369-3377.
- 21 Mizuguti A., Yoshimura Y., and Matsuo K. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
- 22 Mizuguti A., Ohigashi, K., Yoshimura, Y., Kaga, A., Kuroda, Y., Matsuo, K. 2010. Hybridization between GM soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) and wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environmental Biosafety Research* 9: 13-23.
- 23 Nakayama Y., and Yamaguchi H. 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: 25-30.
- 24 Natarajan, S., Xu C., Bae H., Bailey B. A. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. Journal of Plant Physiology 164: 756-763
 - 25 OECD. 1997. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.6. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. OCDE/GDF/ (97) 22.
 - 26 OECD. 2000. Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.15. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (Soybean) . ENV/JM/MONO (2000) 9.
 - 27 OECD. 2001. Series on the safety of novel foods and feed No.2. Consensus document on compositional considerations for new varieties of Soybean: Key Food and Feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO (2001) 15.
 - 28 OECD. 2002. Series on the safety of novel foods and feeds, No.6. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*) : Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO (2002) 25.
 - 29 Raboy, V. and Dickinson, D.B. 1993. Phytic acid levels in seeds of *Glycine max* and *G. soja* as influenced by phosphorus status. Crop Science, 33:1300-1305
 - 30 Scherz, H., Senser, F. 1994. Food composition and nutrition tables. 5th ed. CRC press BocaRaton. Florida. USA.
 - 31 USDA-IOWA. 2001. U.S. Department of Agriculture, Agricultural research service. USDA-IOWA state university database on the isoflavone content of foods, release 1.2-2000. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp> (accessed 2001-5-15)
 - 32 伊藤 博史. 松木 順子. 石橋 晃. 飼料学(66) -Ⅱ マメ類 1 大豆-. 畜産の研究. 2010, 64(6), p. 650-656.
 - 33 後藤寛治. 2001. “ダイズの起源と特性”. 転作全書 第二巻 ダイズ・アズキ, 農山漁村文化協会 p.31-41.
 - 34 松木 順子. 伊藤 博史. 熊倉 克元. 石橋 晃. 飼料学(65) -Ⅱ マメ類 1 大豆-. 畜産の研究. 2010, 64(5), p. 541-546.

583

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 1 S. Verhaeghe. 2009. Origin of vector pSF10 and map of the parent vector (ベクター pSF10 の起源及びその親となるベクターのマップ)
- 2 I.Criel. 2009. Description of Vector pSF10 (ベクターpSF10 の説明)
- 3 S. Verhaeghe. 2009. Sequence of vector pSF10 (ベクターpSF10 の塩基配列)
- 4 S. Verhaeghe. 2009. Detailed insert characterization of *Glycine max* transformation event FG72 by Southern blot analysis (サザンブロット分析による *Glycine max* の組換え体 FG72 系統の挿入部位の詳細な解析)
- 5 S. Verhaeghe. 2009. Full DNA sequence of event insert and integration site of

Glycine max transformation event FG72 (*Glycine max* の組換え体 FG72 系統に挿入された全 DNA 塩基配列及び組込み部位)

- 6 S. Verhaeghe. 2009. Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequences in *Glycine max* transformation event FG72 (*Glycine max* の組換え体 FG72 系統においてベクター由来の配列が存在するかの確認)
- 7 S. Verhaeghe. 2010. Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Glycine max* transformation event FG72 (*Glycine max* の組換え体 FG72 系統におけるベクター由来の配列の不在の確認)
- 8 S. Verhaeghe. 2009. Bioinformatics analysis of *Glycine max* transformation event FG72 (*Glycine max* の組換え体 FG72 系統のバイオインフォマティクス解析)
- 9 S. Verhaeghe. 2009. Structural stability analysis of *Glycine max* event FG72 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments (異なる世代、異なる遺伝的背景及び異なる環境で栽培した *Glycine max* 組換え体 FG72 系統の構造的安定解析)
- 10 V. Habex, J. Debaveye. 2009. Validation of the quantitative HPPD and EPSPS ELISAs in soybean leaf, stem, root and seed tissue (ダイズの組織、葉、茎、根及び種子における HPPD 及び EPSPS の ELISA 分析での量的妥当性の確認)
- 11 V. Habex, J. Debaveye. 2009. Expression analysis of HPPD W336 and 2mEPSPS in transgenic soybean event FG72 (ダイズ組換え体 FG72 系統における HPPD W336 たん白質及び 2mEPSPS たん白質の発現分析)
- 12 T. C. Currier, A. M. Harbin. 2011. Analysis of the raw agricultural commodity of soybean event FG72 2mEPSPS protein. USA. 2010 (USA、2010 年のダイズ FG72 系統の未加工農産物における 2mEPSPS たん白質の分析)
- 13 M. R. Poe. 2009. Analyses of the raw agricultural commodity of soybean event FG72 for HPPD W336 and 2mEPSPS proteins. USA. 2009 (USA、2009 年のダイズ FG72 系統の未加工農産物における HPPD W336 たん白質及び 2mEPSPS たん白質の分析)
- 14 A. Capt. 2015. Soybean transformation event FG72. Identification and sequence homology search of open reading frame (ORF) sequences. version 2. (ダイズの形質転換イベント FG72 系統、オープンリーディングフレーム(ORF)の同定と相同性検索)
- 15 A. Capt. 2008. 2mEPSPS protein amino acid sequence homology search with known toxins (2mEPSPS たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
- 16 J. B. Rascole. 2011. HPPD W336 protein amino acid sequence homology search with known toxins (HPPD W336 たん白質におけるアミノ酸配列の既知毒素たん白質との相同性検索)
- 17 A. Martone. 2009. Structural and functional equivalence of the 2mEPSPS protein produced in *Escherichia coli* to 2mEPSPS in FG72 soybean, *Glycine max*, USA, 2009 (*Escherichia coli* 及び *Glycine max*, ダイズ FG72 系統で作られた 2mEPSPS たん白質の構造的、機能的同等性)
- 18 A. Martone. 2009. Structural and functional equivalence of the HPPD W336 protein produced in *Escherichia coli* to HPPD W336 in FG72 soybean, *Glycine max*, USA,

- 2009 (*Escherichia coli* 及び *Glycine max*, ダイズ FG72 系統で作られた HPPD W336 たん白質の構造的、機能的同等性)
- 19 D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein, *In vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid (2mEPSPS たん白質 人工胃液における消化性試験)
 - 20 J. B. Rasclé. 2009. HPPD W336 protein, *In vitro* digestibility study in human gastric fluid (HPPD W336 たん白質 人工胃液における消化性試験)
 - 21 D. Rouquie. 2011. 2mEPSPS protein, *In vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid (2mEPSPS たん白質 人工腸液における消化性試験)
 - 22 J. B. Rasclé. 2009. HPPD W336 protein, *In vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (HPPD W336 たん白質 人工腸液における消化性試験)
 - 23 D. Rouquie. 2007. 2mEPSPS protein, Heat stability study (2mEPSPS たん白質 熱安定性試験)
 - 24 M. L. Healy, E. Schönbrunn. 2006. Biochemical characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (wtEPSPS) and its mutated glyphosate-resistant form (2mEPSPS) {5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (wtEPSPS) 及びそのグリホサート耐性変異型 (2mEPSPS) の生化学的特性}
 - 25 J. B. Rasclé. 2009. HPPD W336 protein, Heat stability study (HPPD W336 たん白質 熱安定性試験)
 - 26 V. Habex. 2011. The modified 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene product (HPPD W336) description and characterization {改変型 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子産物 (HPPD W336) の解説及び特性}
 - 27 E. C. Beedle, K. A. Dallstream. 2010. Balance® Pro 480 SC and Glyphos® – Magnitude of the Residue in/on Soybeans (ダイズ上もしくはダイズ内における Balance Pro 480® 及び Glyphos® の最大残留値)
 - 28 N. Vanhoutte. 2010. Information on Real-Time PCR method for quantitation of soybean GM event FG72 (組換えダイズ FG72 系統における定量のためのリアルタイム PCR 法)
 - 29 S. Verhaeghe. 2013. Similarity analysis of the soybean FG72 insert sequence to pSF10 vector backbone probes (ダイズ FG72 系統の挿入配列と pSF10 ベクター由来の配列を確認するプローブの相同性解析)
 - 30 S. Verhaeghe. 2013. Expression analysis of a cysteine protease gene in *Glycine max* transformation event FG72 (*Glycine max* の形質転換体 FG72 におけるシステインプロテアーゼの発現解析)
 - 31 A.-J. Wu. 2013. The effect of temperature on microbially produced HPPDW336 assessed by ELISA (ELISA による微生物由来の HPPDW336 への温度の影響)
 - 32 K. Mertens. 2014. Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Glycine max* FG72 generation T2 (*Glycine max* の FG72 系統の T2 世代におけるベクター由来の配列の不在の確認).
 - 33 C. Dharmasri and S. New. 2014. FG72 soybean- protein expression analyses of field samples grown in USA during 2013 (FG72 系統-2013 年の米国におけるほ場で栽培したサンプルのたん白質の発現解析).

- 34 S. J. W. Mackie. 2012. Homogentisic acid composition of seed from FG72 soybean and its non-transgenic counterpart. USA. 2011. (FG72 系統とその対照の非組換えダイズ種子中のホモゲンチジン酸含量)
- 35 R. Dreesen. 2015. Literature survey on potential alternative substrates for HPPD. (HPPD の可能性のある代替の基質に関する文献調査)
- 36 B. Laber. 2015. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens*. Enzymatic characterization of the wild-type and G336W mutant enzymes. (*Pseudomonas fluorescens* の 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 ジオキシゲナーゼの野生型と G336W 変異型酵素の特性)
- 37 R. Dreesen. 2015. Substrate specificity of the wild type HPPD and HPPD W336 proteins from *Pseudomonas fluorescens*. (野生型の HPPD と *Pseudomonas fluorescens* 由来の HPPD W336 たん白質基質特異性)
- 38 R. Oberdörfer. 2015. Summary document, Nutritional impact assessment report for the double-herbicide-tolerant soybean (transformation event FG72) (要約文書 : 2 重除草剤耐性ダイズ (組換えダイズ FG72 系統) における栄養影響評価)