

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ダイズ MON87751 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

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統」に係る安全性確認	3
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
(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	3
(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
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	4
(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	4
(4) 寄生性及び定着性に関する事項	5
(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	5
(9) 飼料の安全な利用に関する事項	5
(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
(3) 薬剤耐性に関する事項	6
(4) 伝達性に関する事項	6
(5) 宿主依存性に関する事項	6
(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
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	7
(3) 構造に関する事項	8
(4) 性質に関する事項	8
(5) 純度に関する事項	10

(6) コピー数に関する事項.....	1 0
(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
(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
(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 3
(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
(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 5
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 5
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 5
IV 審議結果.....	1 5
V 提出資料で引用された参考文献.....	1 6

1 「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統」に係る安全性確認

2
3 I はじめに

4 チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 ダイズ（以下「MON87751 ダイズ」とい
5 う。）について、平成 28 年 4 月 12 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の
6 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
7 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。
8

9 II 確認対象飼料の概要

飼料名 : チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統
性 質 : チョウ目害虫抵抗性
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

10
11 MON87751 ダイズには、グラム陽性細菌 *Bacillus thuringiensis* に由来する
12 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子が導入されている。*cry1A.105* 遺伝子及び
13 改変 *cry2Ab2* 遺伝子からそれぞれ Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質が
14 発現され、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。

15 MON87751ダイズと既存のダイズを比較したところ、遺伝子組換え技術を用
16 いて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、
17 MON87751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
18 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、MON87751ダ
19 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
20 えられた。

21 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。
22

23 III 審議内容

24 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

25 (1) 遺伝的素材に関する事項

26 MON87751 ダイズの宿主植物はマメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine*
27 *max* (L.) Merr. の商業品種 A3555 である。

28 MON87751 ダイズには、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry1A.105* 遺伝子
29 及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子が導入されている。*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2*
30 遺伝子は、それぞれ Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質を発現し、
31 チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。
32

33 (2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

34 ダイズの飼料としての利用形態は、ダイズ（種子）、大豆油かす、きな粉及びエ
35 クストルーダー処理大豆等が挙げられる（伊藤ら、2010）。そのうち大豆油かすは最
36 も飼料原料として多く使用されており、各家畜等の飼料に広く使用されている（松

37 木ら, 2010)。

38
39 (3) 飼料の構成成分等に関する事項

40 MON87751 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
41 なっており、比較が可能である (OECD, 2001、ILSI, 2016、参考資料 17)。

42
43 (4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

44 MON87751 ダイズは Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質を発現す
45 ることにより、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。この点を除けば、
46 MON87751 ダイズは既存のダイズと同じであり、①収穫時期と貯蔵方法、②家畜
47 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
48 換えダイズと変わりはない。

49
50 以上 (1) ~ (4) により、MON87751 ダイズの飼料としての安全性評価におい
51 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。

52
53 2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

54 MON87751 ダイズは、Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質を発現し、
55 チョウ目害虫に対して抵抗性を示すことから、チョウ目害虫防除のための殺虫剤の使
56 用量を削減し、チョウ目害虫の食害による収量の減少を防ぐことができる。また、殺
57 虫スペクトラムがある程度重複している 2 つのたん白質を同時に発現させること
58 により、抵抗性害虫が発生する確率をより低くすることが期待される。

59
60 3 宿主に関する事項

61 (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

62 MON87751 ダイズの宿主は、マメ科 *Glycine* 属 *Soja* 亜属に属する *Glycine*
63 *max* (L.) Merr. の商業品種 A3555 である。

64
65 (2) 遺伝的先祖に関する事項

66 ダイズは一般に中国中北部を原産とする最も古い栽培作物のひとつと考えられ
67 ている。ダイズ及びツルマメ (*Glycine soja*) は、*Soja* 亜属に属している。細胞学
68 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
69 と考えられている (OECD, 2000)

70
71 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

72 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
73 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
74 (OECD, 2012)。

75 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
76 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

77 り不活化され、実際に摂取するダイズ製品中に含まれるトリプシンインヒビター
78 の量はごくわずかであると考えられる。

79 レクチンは、細胞膜を構成する糖タンパクや糖脂質の糖と結合することで、細胞
80 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
81 を阻害し、場合によっては死をもたらすこともあるが、トリプシンインヒビター
82 同様、レクチンの活性も加熱により大きく減少することが報告されている。したがって、
83 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
84 と考えられる。

85 なお、ダイズは長い食経験の中で、これまでにヒトや家畜等の健康に影響を及
86 ぼしたという報告はない (OECD, 2012)。

87
88 (4) 寄生性及び定着性に関する事項

89 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。

90
91 (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

92 ダイズ植物体には、ウイルス、細菌及び糸状菌により各種の病害が発生する。
93 可食部の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、
94 茎疫病、紫斑病など) が発生する (OECD, 2000)。しかし、これらの病原体のヒト
95 や家畜等に対する病原性は報告されていない。

96
97 (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

98 ダイズは栽培作物であり、雑草性はないと考えられる (OECD, 2000)。

99
100 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

101 ダイズと交雑可能な近縁野生種として、わが国にはツルマメが自生している
102 (OECD, 2000)。しかし、ダイズは自殖率が高く、しかも一般的にダイズとツルマ
103 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
104 て低いことが報告されている (OECD, 2000; Nakayama and Yamaguchi, 2002;
105 Mizuguti et al., 2009)。

106
107 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

108 ダイズの飼料としての利用形態は、ダイズ (種子)、大豆油かす、大豆皮、きな
109 粉及びエクスト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ダイズ
110 由来の飼料原料として最も多く使用されており、各家畜等の飼料に広く使用され
111 ている (伊藤ら, 2010; 松木ら, 2010)。

112
113 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

114 ダイズ種子にはトリプシンインヒビター、レクチン及びフィチン酸等の有害生
115 理活性物質が含まれるが、これらは加工段階で適切な加熱処理を施すことにより、
116 不活性化することができるため、大豆油かすは飼料として安全に使用されている。

117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157

(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、越冬して次の生育期まで生存する可能性は低い (OECD, 2000)。仮に、自生したとしても、物理的あるいは化学的な方法で自生ダイズを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)。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MON87751 ダイズの作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMIR13196 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 等を基に作成された。

(2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR13196 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、既知の有害塩基配列は含まない (参考資料1)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR13196 の外側骨格領域にはネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II をコードし、ネオマイシン及びカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれており、*Escherichia coli* 中での選択マーカーとして使用された。また、同じく外側骨格領域にアミノグリコシド改変酵素 3''(9)-*O*-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードし、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれており、*E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選択マーカーとして使用された。

なお、MON87751 ダイズ中に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を確認している。

(4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR13196 は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

導入用プラスミド PV-GMIR1319 には、プラスミド pBR322 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* 及び広宿主域プラスミド RK2 由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pRi* が組み込まれているが、導入用プラスミド PV-

158 GMIR1319 が植物や家畜等で増殖することはできない。

159

160 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

161 pBR322を基に、*cry1A.105*遺伝子発現カセット及び改変*cry2Ab2*遺伝子発現カ
162 セットを含むT-DNAI領域及び*splA*遺伝子発現カセット及び*aadA*遺伝子発現カセ
163 ットを含むT-DNAII領域を導入し、導入用プラスミドPV-GMIR13196を作製して
164 いる。

165

166 (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

167 MON87751 ダイズは、*cry1A.105* 遺伝子発現カセット及び改変 *cry2Ab2* 遺伝
168 子発現カセットを含む T-DNAI 領域をアグロバクテリウム法により従来ダイズ品
169 種 A3555 の幼芽の頂端分裂組織に導入することにより作出している。

170

171 5 挿入遺伝子に関する事項

172 (1) 供与体に関する事項

173 ① 名称、由来及び分類に関する事項

174 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は *B. thuringiensis* に由来する。

175

176 ② 安全性に関する事項

177 *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis*
178 は土壌中に一般的に存在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等への病原性
179 やアレルギー性は報告されていない。

180

181 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

182 挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド PV-GMIR13196 を用い、アグ
183 ロバクテリウム法により行った。宿主である非組換えダイズ品種 A3555 の幼芽の
184 頂端分裂組織と、導入プラスミド PV-GMIR13196 を含むアグロバクテリウムを共
185 置培養することにより形質転換を行った後、スペクチノマイシン、カルベニシリ
186 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た組織培養培地に
187 移し、形質転換されていない細胞の生育を阻害し、形質転換に用いたアグロバク
188 テリウム菌体を除去した。

189 その後、選抜された細胞から植物体を再分化させ、発芽及び根の形成を促す植
190 物成長調整剤を含む培地に移し、根をつけた個体のうち正常な表現型を示す個体
191 を選抜し、土壌に移植した後、生育させた。

192 得られた再分化個体 (R0) を自殖させ、R1 世代を作出した。R1 世代の個体につ
193 いて、T-DNAII 領域を持たず、T-DNAI 領域をホモで有する個体を定量 PCR 分析
194 により選抜し、その中から、形態特性及び導入遺伝子解析の結果に基づき、最終
195 的な商品化系統として MON87751 ダイズを選抜した。

196

197 (3) 構造に関する事項

198 ① プロモーターに関する事項

199 MON87751 ダイズに導入された *cry1A.105* 遺伝子はシロイヌナズナ
200 (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *RbcS4* プロモーターによりその発現を制御されてい
201 る。*RbcS4* プロモーターは、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する(Krebbbers et
202 al., 1988; De Almeida et al., 1989)。

203 また同じく MON87751 ダイズに導入された改変 *cry2Ab2* 遺伝子はシロイヌ
204 ナズナ (*A. thaliana*)由来の *Act2* プロモーターによりその発現を制御されてい
205 る。*Act2* プロモーターは、植物細胞内での恒常的な転写を誘導する(An et al.,
206 1996)。

207

208 ② ターミネーターに関する事項

209 *cry1A.105* 遺伝子はタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) に由来する、リ
210 ン酸トランスポーターをコードする *PT1* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域からなるター
211 ミネーターにより (Liu et al., 1998)、mRNA のポリアデニル化を誘導し、転
212 写が締結する。

213 改変 *cry2Ab2* 遺伝子はイネ (*Oryza sativa*)に由来する、メタロチオネイン様
214 たん白質をコードする *Mt* 遺伝子の 3'末端非翻訳領域からなるターミネーターに
215 より、(GenBank, 2014)、mRNA のポリアデニル化を誘導し、転写が終結する
216 (Hunt, 1994)。

217

218 ③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

219 導入用プラスミド PV-GMIR13196 の各構成要素の機能は既に明らかになっ
220 ており、既知の有害塩基配列は含まない。

221

222 (4) 性質に関する事項

223 導入用プラスミド PV-GMIR13196 の各構成要素、由来及び機能について表 1
224 に示した。*cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子については詳細を表外に記
225 載した。

226

227 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>cry2Ab2</i> 遺伝子発現カセット	
<i>Act2</i> プロモーター	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>) の <i>act2</i> 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン (An et al., 1996)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) の葉緑体輸送ペプチド領域をコードしている <i>ShkG</i> 遺伝子のターゲティング配列

	(Klee et al., 1987; Herrmann, 1995)。改変 Cry2Ab2 たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cry2Ab2</i> 遺伝子	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の改変 Cry2Ab2 たん白質をコードする配列で、チョウ目昆虫に対する抵抗性を付与する (Donovan, 1991)。
<i>Mt</i> ターミネーター	イネ (<i>Oryza sativa</i>) のメタロチオネイン様たん白質をコードする <i>Mt</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で (GenBank accession AK105219)、mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
<i>cry1A.105</i> 遺伝子発現カセット	
<i>RbcS4</i> プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのプロモーター及びリーダー配列 (Krebbbers et al., 1988; De Almeida et al., 1989)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
<i>RbcS4</i> ターゲティング配列	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) の <i>ats1A</i> 小サブユニットをコードする <i>rbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列 (Wong et al., 1992)。たん白質を葉緑体へ輸送する。
<i>cry1A.105</i> 遺伝子	<i>B. thuringiensis</i> の Cry1Ab たん白質、Cry1F たん白質及び Cry1Ac たん白質のコード配列で、殺虫活性を示すキメラたん白質をコードする (U.S. EPA, 2010)。
<i>Pt1</i> ターミネーター	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) のリン酸トランスポーターをコードする <i>PT1</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域で (Liu et al., 1998)、mRNA のポリアデニル化を誘導する。

228

229

① *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子の機能

230

土壌中に一般的に存在するグラム陽性細菌である *B. thuringiensis* が孢子形成時に産生する結晶たん白質 (Cry たん白質) は、プロトトキシン (毒前駆体) として産生され、標的とする昆虫体内で結晶封入体からたん白質分解酵素により活性を持つ毒素 (コアたん白質) へと変換され、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合し、細胞膜に侵入する。さらに、中腸上皮細胞膜に陽イオン選択的小孔を形成することで、昆虫の消化プロセスを阻害し、殺虫活性を示す。

231

232

MON87751 ダイズ中で発現する Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質はチョウ目昆虫に対して特異的に殺虫活性を示す (Höfte and Whiteley, 1989)。

233

234

MON87751 ダイズ中で発現する Cry1A.105 たん白質は 1,181 個のアミノ酸からなり、分子量は約 133kDa である。Cry1A.105 たん白質は標的であるチョウ目害虫に対する殺虫活性を高めるため、異なる Bt たん白質のドメインを組み合わせるにより作製された。Cry1A.105 たん白質は 3 つのドメインを持ち、Cry1Ab たん白質又は Cry1Ac たん白質由来のドメイン I 及び II、Cry1F たん白質由来のドメイン III、Cry1Ac たん白質由来の C 末端ドメイン

235

236

237

238

239

240

241

242

243

244

245 からなるキメラたん白質である。

246 一方、MON87751 ダイズで発現する改変 Cry2Ab2 たん白質は 619 個のア
247 ミノ酸からなり、分子量は約 62kDa である。MON87751 ダイズで発現する
248 改変 Cry2Ab2 たん白質の N 末端アミノ酸配列解析の結果、野生型 Cry2Ab2
249 たん白質の N 末端と比較して、CTP2 とともに N 末端から 15 アミノ酸が切
250 断されていることが確認された。しかし、MON87751 ダイズで発現する改変
251 Cry2Ab2 たん白質の切断された N 末端のアミノ酸は、標的昆虫への特異性と
252 殺虫活性に関わるトリプシン耐性コアたん白質には含まれていないため、た
253 ん白質の特異性に影響はないものと考えられる。

254

255 (5) 純度に関する事項

256 導入用プラスミド PV-GMIR13196 に含まれる遺伝子は、塩基配列解析により、
257 T-DNA 領域内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。

258

259 (6) コピー数に関する事項

260 MON87751 ダイズ中に導入された遺伝子の挿入箇所数、コピー数、及び外側骨
261 格配列の有無を次世代シーケンス技術¹及びバイオインフォマティクスによる接
262 合領域の解析 (Next Generation Sequencing/Junction Sequence Analysis:
263 NGS/JSA)² 並びに導入遺伝子領域の PCR 分析及び塩基配列解析により確認した
264 (参考資料 4)。その結果、MON87751 ダイズ中の導入用プラスミド PV-
265 GMIR13196 の T-DNAI 領域はゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されており、導
266 入用プラスミド PV-GMIR13196 由来の外側骨格領域は存在しないことが確認され
267 た(参考資料 5)。

268 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
269 するため、挿入 DNA 及び近傍領域の塩基配列解析を行った。その結果、
270 MON87751 ダイズ中の挿入 DNA と、導入用プラスミド PV-GMIR13196 の T-
271 DNAI 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された。また、
272 MON87751 ダイズの挿入 DNA の 3'末端とダイズゲノム内在性配列の間に 1bp の
273 挿入、導入遺伝子の挿入部位においてダイズゲノム内在性配列に 7bp の欠損、導
274 入遺伝子の 5'末端近傍配列においてダイズゲノム内在性配列に 16bp の欠失が認め
275 られた。しかし、近傍配列の BLASTn 及び BLASTx 検索による解析結果から、挿
276 入 DNA の導入により既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた(参考資料
277 5)。

¹ 次世代シーケンス技術 (NGS) は、膨大な塩基配列を一斉に解析できる技術の総称である。本解析は NGS のうち Illumina を用いた手法であり、ゲノムをランダムに切断して多数のフラグメントを作成し、それぞれのフラグメントを増幅した後に塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。

² NGS/JSA は、次世代型及び従来型のシーケンス解析とバイオインフォマティクスを用いた分子生物学的評価の手法である。NGS/JSA では、まず、NGS により MON87751 系統のゲノムの全領域に相当する配列を 100bp 程度のフラグメントとして増幅してその塩基配列を解析し、次に、これらのフラグメントの情報を用い、JSA によって T-DNA 領域の導入箇所数と非意図的断片の有無を決定する手法である (Kovalic et al., 2012)。

278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317

(7) 安定性に関する事項

MON87751 ダイズ中の導入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 MON87751 ダイズから得られたゲノム DNA を用いて、NGS/JSA を実施したところ、MON87751 ダイズの導入遺伝子が、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。

また、Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の複数世代にわたる安定性を確認するため、5 世代の MON87751 ダイズの組織サンプルを用いて、ウエスタンブロット分析を実施したところ、Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質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 6)。

さらに、導入遺伝子の分離様式及び安定性を確認するために、3 世代の MON87751 ダイズを用いて PCR 分析により T-DNAI 領域の有無を確認した結果、3 世代の MON87751 ダイズにおける分離比の観測値と期待値の間に統計学的な有意差は認められなかったことから、T-DNAI 領域は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 7)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON87751 ダイズにおける Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 8)。試験には 2012 年に米国の 5 ヶ所の試験ほ場から収集された葉、根、地上部、種子及び花粉/葯を供試した。その結果、葉、地上部、種子及び花粉/葯から Cry1A.105 たん白質が検出された。根における Cry1A.105 たん白質の発現量は検出限界未満であった。改変 Cry2Ab2 たん白質はすべての組織サンプルから検出された。

(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-GMIR13196 には、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子 (Fraley et al., 1983) が形質転換後の選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している。また、スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *aadA* 遺伝子が形質転換後の選抜マーカーとして T-DNAII 領域に存在している。

なお、MON87751 ダイズに *nptII* 遺伝子及び *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、NGS/JSA により確認されている。

(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

MON87751 ダイズの導入遺伝子とその両末端近傍配列の境界領域について、オープンリーディングフレーム(ORF)検索を行った。ストップコドン からストップコドンまでの配列を 6 フレーム全てについて検索し、さらにその配列の中から、ダイズ内在性配列から MON87751 ダイズ中の導入遺伝子にかけて存在し、かつ、8 アミノ酸以上の ORF を持つ配列を検索した結果(参考資料 9)、12 個の ORF が

318 確認された。この 12 個の ORF が既知の毒性たん白質等との相同性検索を行った
319 結果、相同性は認められなかった。

320 また、MON87751 ダイズ中の挿入 DNA において、目的以外の新規たん白質が
321 産生される可能性を検討するため、FASTA アルゴリズムにより既知の毒性たん白
322 質等との相同性検索を行ったが、相同性は認められなかった(参考資料 10)。

323

324 6 組換え体に関する事項

325 (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

326 MON87751 ダイズへ導入された *cry1A.105* 遺伝子及び改変 *cry2Ab2* 遺伝子は、
327 チョウ目害虫に対して殺虫活性を示す Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 た
328 ん白質を発現し、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。この点を除けば、
329 MON87751 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、
330 飼料としての利用方法も従来と変わらない。

331

332 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

333 MON87751 ダイズで発現する Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質
334 が既知の毒性たん白質と相同性を有するかを確認するために、TOX_2013 データ
335 ベースを用いて FASTA 型アルゴリズムにより相同性検索を行った。その結果、既
336 知の毒性たん白質との間に相同性は認められなかった(参考資料 2, 3)。

337

338 (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

339 *E. coli* で大量発現させた Cry1A.105 たん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質を用
340 いて、物理化学的処理に対する感受性を調べるため、以下アからウについて検討
341 を行った。なお、*E. coli* から調製した両たん白質と MON87751 ダイズ中で発現
342 する両たん白質との同等性に関しては、免疫学的反応性(ウエスタンブロット法)、
343 分子量(SDS-PAGE 法)、グリコシル化状態及び機能活性により確認している(参
344 考資料 11, 12)。

345 ①Cry1A.105 たん白質

346 ア 人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理

347 Cry1A.105 たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性について、SDS-PAGE 及び
348 ウエスタンブロット分析により検討した結果、それぞれにおいて、人工胃液中
349 で試験開始から 30 秒以内に消化されることが確認された。なお、SDS-PAGE の
350 結果、30 秒の時点で約 5kDa の一時的な断片が観察され、20 分後にも観察され
351 る断片があったが、30 分後には観察できなかった(参考資料 13)。観察された約
352 5kDa の断片について、Cry1A.105 たん白質を人工胃液中でペプシン処理した後
353 に、人工腸液(SIF)中での消化性を観察すると、SDS-PAGE の結果、約 5kDa の
354 断片は 30 秒以内に消化されることが確認された(参考資料 13)。

355

356 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
357 改変 Cry1Ac.105 たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性について、ウエスタ
358 ンプロット分析により検討した結果、完全長の改変 Cry1Ac.105 たん白質は、人
359 工腸液中で試験開始から 5 分以内に検出限界以下まで消化され、トリプシン耐
360 性コアたん白質（約 55kDa）と考えられるバンドが 24 時間後にも認められたが、
361 これまでの報告のものと同様の結果だった (Schnepf et al., 1998)。

362
363 ウ 加熱処理
364 Cry1A.105 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により評価し
365 た結果、15 分及び 30 分間の条件下では 75℃以上の加熱処理により免疫応答性
366 を失うことが確認された（参考資料 15）。

367
368 ②改変 Cry2Ab2 たん白質
369 ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理
370 改変 Cry2Ab2 たん白質の人工胃液(SGF)中での消化性について、SDS-PAGE
371 及びウエスタンプロット分析により検討した結果、それぞれにおいて、人工胃
372 液中で試験開始から 30 秒以内に消化されることが確認された(参考資料 14)。

373
374 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
375 改変 Cry2Ab2 たん白質の人工腸液(SIF)中での消化性を、ウエスタンプロット
376 分析により検討した結果、完全長の改変 Cry2Ab2 たん白質は、人工腸液中で試
377 験開始から 5 分以内に検出限界以下まで消化され、トリプシン耐性コアたん白
378 質と考えられるバンド（約 55kDa）が 24 時間後にも認められたが、これまでの
379 報告のものと同様の結果だった(Hernández-Rodríguez et al., 2008)。なお、この
380 バンドとは別に断続的に約 180kDa のバンドが認められたが、これは改変
381 Cry2Ab2 たん白質又はトリプシン耐性コアたん白質が人工腸液下で凝集したも
382 のであると考えられた(参考資料 14)。

383
384 ウ 加熱処理
385 改変 Cry2Ab2 たん白質の加熱処理感受性について、ELISA 分析により検討
386 した結果、15 及び 30 分間の条件下では 55℃以上の加熱処理により免疫応答性
387 を失うことが確認された（参考資料 16）。

388
389 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項
390 Cry たん白質は、標的とする昆虫体内で毒素へと変換され、殺虫活性を示すたん
391 白質であり、酵素活性を有するとの報告はこれまでないことから、Cry1A.105 た
392 ん白質及び改変 Cry2Ab2 たん白質が発現することによって、植物の代謝系に何ら
393 かの影響を及ぼす可能性はないと考えられた。

394

395 (5) 宿主との差異に関する事項

396 MON87751 ダイズと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
397 め、米国の 8 箇所のは場において栽培した MON87751 ダイズ及び対照の非組換え
398 ダイズ品種の種子及び地上部について、①主要構成成分、②ビタミン、③アミノ
399 酸、④ミネラル、⑤脂肪酸及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 17,
400 18)。

401

402 ① 主要構成成分

403 種子及び地上部の粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊
404 維(ADF)及び中性デタージェント繊維(NDF)について分析した結果、いずれの成分
405 も対照の非組換えダイズ品種と同等又は ILSI データベースに記載された分析値の
406 範囲内であった(ILSI,2016)。

407

408 ② ビタミン

409 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
410 えダイズ品種と同等又は ILSI データベースに記載された分析値の範囲内であった
411 (ILSI,2016)。

412

413 ③ アミノ酸

414 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換
415 えダイズ品種と同等又は ILSI データベースに記載された分析値の範囲内であった
416 (ILSI,2016)。

417

418 ④ ミネラル

419 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
420 えダイズ品種と同等又は ILSI データベースに記載された分析値の範囲内であった
421 (ILSI,2016)。

422

423 ⑤ 脂肪酸

424 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
425 イズ品種と同等又は ILSI データベースに記載された分析値の範囲内であった
426 (ILSI,2016)。

427

428 ⑥ 有害生理活性物質

429 種子中の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
430 タキオース、トリプシンインヒビターおよびイソフラボン(ダイゼイン、グリシテ
431 イン及びゲニステイン)について分析した結果、ラフィノースに統計学的有意差が
432 認められたが、その分析値は ILSI データベースに記載された分析値の範囲内であ
433 った(ILSI,2016)。

434

- 435 (6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項
436 2010 年から 2014 年までの間に MON87751 ダイズのは場試験が米国を中心と
437 して延べ 277 箇所で行われているが、MON87751 ダイズの生存及び増殖能力は対
438 照の非組換え品種と同等であることが確認されている。
439
- 440 (7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
441 MON87751 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
442 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。
443
- 444 (8) 不活化法に関する事項
445 MON87751 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
446 用)など、ダイズを枯死させる従来の方法で不活化される。
447
- 448 (9) 外国における認可等に関する事項
449 2014 年 9 月 欧州食品安全機関 (EFSA) に食品・飼料及び輸入のための申請
450 を行った。
451 2014 年 10 月 カナダ食品検査庁(CFIA)で環境・飼料に対する安全性確認が終
452 了した。
453 2014 年 10 月 米国農務省 (USDA) から無規制裁培 (商業栽培) の承認を得た。
454 2015 年 5 月 米国食品医薬局 (FDA) で食品・飼料としての安全性確認が終
455 了した。
456 2016 年 1 月 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関(FSANZ)にお
457 いて食品としての安全性が終了した。
458
- 459 (10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
460 MON87751 ダイズと従来ダイズの違いは、MON87751 ダイズがチョウ目昆
461 虫に対する抵抗性を持っているという点のみである。したがって、MON87751 ダ
462 イズは、チョウ目昆虫の防除のための薬剤が不要である以外は MON87751 ダイズ
463 と非組換え体のダイズと栽培方法は同様である。
464
- 465 (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項
466 MON87751 ダイズの種子の製法及び管理方法は、非組換えのダイズ品種と同様
467 である。
468
- 469 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
470 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
471 該当しない。
472

473 IV 審議結果

474 チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料
475 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

476 項による確認を行って差し支えないと判断された。

477

478 V 提出資料で引用された参考文献

- 1 An, Y.-Q., J.M. McDowell, S. Huang, E.C. McKinney, S. Chambliss and R.B. Meagher. 1996. Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* 10: 107-121.
- 2 Baum, J.A. 1998. Transgenic *Bacillus thuringiensis*. *Phytoprotection* 79: 127-130.
- 3 Baum, J.A., T.B. Johnson and B.C. Carlton. 1999. *Bacillus thuringiensis*: Natural and recombinant bioinsecticide products. Pages 189-209 in *Methods in Biotechnology: Biopesticides: Use and Delivery*. Volume 5. F.R. Hall and J.J. Menn (eds.). Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
- 4 De Almeida, E.R.P., V. Gossele, C.G. Muller, J. Dockx, A. Reynaerts, J. Botterman, E. Krebbers and M.P. Timko. 1989. Transgenic expression of two marker genes under the control of an *Arabidopsis* *rbcS* promoter: Sequences encoding the Rubisco transit peptide increase expression levels. *Molecular and General Genetics* 218: 78-86.
- 5 Donovan, W.P. 1991. CryIIB crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. Patent 5,073,632, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 6 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
- 7 GenBank. 2014. "Terminator Mt.". National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> [Accessed October 21, 2014].
- 8 Hernández-Rodríguez, C.S., A. Van Vliet, N. Bautsoens, J. Van Rie and J. Ferré. 2008. Specific binding of *Bacillus thuringiensis* Cry2A insecticidal proteins to a common site in the midgut of *Helicoverpa* species. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7654-7659.
- 9 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
- 10 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.
- 11 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.
- 12 ILSI. 2016. Crop Composition Database, Version 5.1. International Life Sciences Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed Mar. 14, 2016]
- 13 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.
- 14 Kovalic, D., C. Garnaat, L. Guo, Y. Yan, J. Groat, A. Silvanovich, L. Ralston, M. Huang, Q. Tian, A. Christian, N. Cheikh, J. Hjelle, S. Padgett and G. Bannon. 2012. The use of next generation sequencing and junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular

- characterization of crops improved through modern biotechnology. *The Plant Genome* 5: 149-163.
- 15 Krebbers, E., J. Seurinck, L. Herdies, A.R. Cashmore and M.P. Timko. 1988. Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 11: 745-759.
 - 16 Liener, I.E. 1994. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34: 31-67.
 - 17 Liu, H., A.T. Trieu, L.A. Blaylock and M.J. Harrison. 1998. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 14-22.
 - 18 Mizuguti, A., Y. Yoshimura and K. Matsuo. 2009. Flowering phenologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
 - 19 Nakayama, Y. and H. Yamaguchi. 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.
 - 20 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.
 - 21 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.
 - 22 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.
 - 23 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. ENV/JM/MONO(2012)24. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
 - 24 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.
 - 25 Richter, S. and G.K. Lamppa. 1998. A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 7463-7468.
 - 26 Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler and D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-806.
 - 27 U.S. EPA. 2010. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* Cry1A.105 and Cry2Ab2 insecticidal proteins and the genetic material necessary for their production in

corn [PC Codes 006515 (Cry2Ab2), 006514 (Cry1A.105)]. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Biopesticides and Pollution Prevention Division, Washington D.C.

- 28 Wong, E.Y., C.M. Hironaka and D.A. Fischhoff. 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thuringiensis* proteins in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 20: 81-93.
- 29 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.
- 30 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.

479

480

481

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR13196
- 2 Bioinformatics Evaluation of the Cry1A.105 Protein in MON 87751 Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024925)
- 3 Updated Bioinformatics Evaluation of the Cry2Ab2 Protein Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024926)
- 4 Amended Report for MSL0025312: Molecular Characterization of Insect Protected Soybean (MON 87751) (MSL0025901)
- 5 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequence Flanking the Insertion Site in MON 87751: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0025669)
- 6 Amended Report for MSL0024813: Demonstration of the Presence of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Proteins in Soybean Leaf Samples across Multiple Generations of MON 87751 (MSL0025695)
- 7 Amended Report for MSL0025106: Segregation Analysis of the Coding Sequences Present in Insect Protected Soybean MON 87751 Across Multiple Generations (MSL0025712)
- 8 Amended Report for MSL0024805: Assessment of Cry1A.105 and Cry2Ab2 Protein Levels in Soybean Tissues Collected from MON 87751 Produced in U.S. Field Trials during 2012 (MSL0025199)
- 9 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 87751: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0024956)
- 10 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 87751 Utilizing the AD_2013, TOX_2013 and PRT_2013 Databases (MSL0024971)
- 11 Characterization of the Cry1A.105 Protein Purified from the Soybean Seed of MON 87751 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli*-Produced Cry1A.105 Proteins (MSL0025088)

- 12 Characterization of the Cry2Ab2 Protein Purified from the Soybean Seed of MON 87751 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Escherichia coli*-Produced Cry2Ab2 Proteins (MSL0025096)
- 13 Assessment of the *in vitro* Digestibility of Cry1A.105 Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0024977)
- 14 Assessment of the *in vitro* Digestibility of Cry2Ab2 Protein in Simulated Gastric and Simulated Intestinal Fluids (MSL0025099)
- 15 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-Produced MON 87751 Cry1A.105 Protein (MSL0026007)
- 16 Effect of Heat Treatment on the Immunodetection of *Escherichia coli*-Produced MON 87751 Cry2Ab2 Protein (MSL0025938)
- 17 Amended Report for MSL0024609: Compositional Analyses of Soybean Forage and Seed Collected from MON 87751 Grown in the United States During the 2012 Season (MSL0026251)
- 18 Analyses of Minerals and B Vitamins of Seed Collected from MON 87751 Grown in the United States During the 2012 Season (MSL0024600)