

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

***p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシ
ゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシ
ネート耐性ダイズ SYHT0H2 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	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
(1)	遺伝的素材に関する事項	4
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	4
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
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
(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
(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	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
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.....	1 2
（６）コピー数に関する事項.....	1 2
（７）安定性に関する事項.....	1 3
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	1 3
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	1 3
（１０）外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項.....	1 4
6 組換え体に関する事項.....	1 4
（１）組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項.....	1 4
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項.....	1 4
（３）遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項.....	1 5
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	1 6
（５）宿主との差異に関する事項.....	1 7
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	1 8
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	1 8
（８）不活化法に関する事項.....	1 8
（９）外国における認可等に関する事項.....	1 8
（１０）作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	1 9
（１１）種子の製法及び管理方法に関する事項.....	1 9
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 9
IV 審議結果.....	1 9
V 参考文献及び参考資料.....	1 9

「*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 系統」に係る安全性確認

1

2 I はじめに

3 *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホ
4 シネート耐性ダイズ SYHT0H2 系統（以下「SYHT0H2 ダイズ」という。）について、
5 平成 25 年 8 月 5 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
6 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
7 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 : *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤
及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 系統

性 質 : *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤
及び除草剤グルホシネート耐性

申請者 : シンジェンタジャパン株式会社、バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者 : Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates
Bayer CropScience

10

11 SYHT0H2ダイズは、エンバク (*Avena sativa* L.) に由来する*p*-ヒドロキシフェニル
12 ピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子（以下、「*avhppd-03* 遺伝子」という。）及
13 び*Streptomyces viridochromogenes* に由来する2つのホスフィノスリシンアセチルト
14 ランスフェラーゼ遺伝子（以下、「*pat* 遺伝子」という。）（*pat-03-01* 遺伝子及び
15 *pat-03-02* 遺伝子）を導入したダイズである。

16 *p*-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」とい
17 う。）阻害型除草剤は、植物細胞内に存在するHPPDたん白質の機能を阻害
18 することで除草活性を示すが、*avhppd-03* 遺伝子によって産生される*p*-ヒド
19 ロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（以下「AvHPPD-03たん白質」
20 という。）は、HPPD阻害型除草剤存在下でも活性を示すため、植物にHPPD阻
21 害型除草剤に対する耐性を付与する。

22 *pat-03-01* 遺伝子及び*pat-03-02* 遺伝子によって産生されるホスフィノスリシンアセ
23 チルトランスフェラーゼ（以下、「PATたん白質」という。）は、除草剤グルホシネ
24 ートを除草活性のない化合物に変換することより、植物に除草剤グルホシネートに対す
25 る耐性を付与する。

26 SYHT0H2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
27 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。このため、遺
28 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
29 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、
30 SYHT0H2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
31 はないと考えられた。

32 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

SYHT0H2 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 Jack である。

SYHT0H2 ダイズにはエンバク (*A. sativa* L.) に由来する *avhppd-03* 遺伝子並びに *S. viridochromogenes* に由来する *pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子が導入されている。

avhppd-03 遺伝子は、AvHPPD-03 たん白質を発現することにより、SYHT0H2 ダイズに HPPD 阻害型除草剤に対する耐性を付与する。

pat-03-01 遺伝子及び *pat-03-02* 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。

(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

SYHT0H2 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 (ILSI, 2010、ILSI, 2014、参考資料 19)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

SYHT0H2 ダイズは、AvHPPD-03 たん白質及び PAT たん白質を発現することにより、HPPD 阻害型除草剤及び除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されている。この点を除けば、SYHT0H2 ダイズは非組換え体の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体ダイズと変わりはない。

以上 (1) ~ (4) により、SYHT0H2 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

SYHT0H2 ダイズは、AvHPPD-03 たん白質及び PAT たん白質が発現することにより、播種前又は栽培期間中に HPPD 阻害型除草剤を、また、栽培期間中に除草剤グルホシネートを雑草防除に使用できることから、ダイズ生産者へ雑草防除における新たな選択肢を提供することができる。

HPPD 阻害型除草剤は、植物の HPPD たん白質の酵素活性を阻害することで植物を枯死させる除草剤である。SYHT0H2 ダイズで使用される HPPD 阻害型除草剤として、メソトリオン及びイソキサフルトールが米国等においてダイズへの使用が登録されている。

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

SYHT0H2 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 Jack である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

ダイズの原産地は中国である。中国北方説、揚子江流域及び江南地方説、中国南西部の照葉樹林地帯説等など最初に栽培化された場所には諸説ある(鵜飼, 2010)が、最も古い栽培作物の一つと見なされている。細胞学的、形態学的及び分子生物学的な知見から、ツルマメ(*Glycine soja*) がダイズの祖先野生種であると考えられている (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、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, 2012)。

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、消化酵素のトリプシンやキモトリプシンの活性を阻害し、結果として摂取したたん白質の消化が妨げられ、動物の成長を減少させる。

レクチンは糖結合性たん白質で、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処理によって急速に分解される (OECD, 2012)。

(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、茎疫病及び紫斑病等)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。

(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 (OECD, 2000)。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が、ダイズは自植率が高く、また一般的にダイズとツルマメの開花期が重なりにくいため、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 (Nakayama and

Yamaguchi, 2002、Mizuguti *et al.*, 2009、Mizuguti *et al.*, 2010)。

(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、各家畜等の飼料に広く使用されている。

(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産に関する事項

ダイズ種子は休眠性を示すことはほとんどなく、一般に湿度や気温の変動する自然条件下では、発芽能力が急速に低下すると考えられたため、ほ場に種子が残っていたとしても、次の生育期まで越冬する可能性は低い。また、物理的防除法（耕耘）や化学的防除法（感受性を示す除草剤の使用）により、容易に枯死・不活化できる。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズの近縁種として知られているツルマメ (*G. soja*) 及び *G. gracilis* Skvortz(OECD, 2000)は、ダイズと同じ *Glycine* 属植物種であることから、ダイズと同様の有害生理活性物質を含有すると考えられる。

ツルマメについては、トリプシンインヒビターを含有することが確認されている (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

SYHT0H2 ダイズの作出に用いられた導入プラスミド pSYN15954 は、プラスミド pNOV2114 を基に作製された。

(2) 性質に関する事項

プラスミド pNOV2114 の塩基数は 5,760 bp である。また、プラスミド pNOV2114 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 (参考資料1)。

(3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pNOV2114 には、アミノグリコシドアデニルトランスフェラーゼをコードし、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンの耐性を付与する

Escherichia coli Tn7 由来の *spec (aadA)* 遺伝子が含まれている。

なお、SYHT0H2 ダイズ中に *spec (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）。

（４）伝達性に関する事項

プラスミド pNOV2114 には、プラスミドの伝達を可能とする配列が含まれていない。

（５）宿主依存性に関する事項

プラスミド pNOV2114 に含まれるすべての遺伝子の性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。

（６）発現ベクターの作成方法に関する事項

avhppd-03 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子を、プラスミド pNOV2114 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 pSYN15954 を作製している（参考資料 2）。

（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

SYHT0H2 ダイズは導入用プラスミド pSYN15954 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、宿主であるダイズのゲノム中へ導入することで作出された。

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

SYHT0H2 ダイズに導入された *avhppd-03* 遺伝子はエンバク (*A. sativa* L.) に由来する。また、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* Tü494 株に由来する。

② 安全性に関する事項

avhppd-03 遺伝子の供与体であるエンバクは、飼料やオートミールの原料等として用いられる穀物で、動物やヒトは食経験を有している。*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は腐生性の土壤微生物であり、動物やヒトに対する病原菌ではないと考えられている（OECD, 1999）。

（２）遺伝子の挿入方法に関する事項

挿入 DNA の宿主への導入は、導入用プラスミド pSYN15954 を用い、アグロバクテリウム法により行った。宿主であるダイズ品種 Jack の未熟種子を滅菌・洗浄して得られた外植片に、導入用プラスミド pSYN15954 を含むアグロバクテリウムを接種し、4 日間共存培養した。共存培養後、アグロバクテリウムの除菌のための

抗生物質（チカルシリン、セフトキシム及びバンコマイシン）を含む再分化培地へと移行し、7 日間培養した。その後、抗生物質に加えて、グルホシネートを含む培地へと移行することで、PAT たん白質を発現する形質転換体を選抜し、再分化させた。

再分化した植物体のうち、*avhppd-03* 遺伝子及び 2 つの *pat* 遺伝子が存在し、外側骨格配列の *spec (aadA)* 遺伝子が存在しないことを PCR 分析で確認した植物体を温室で栽培した。これらの植物体 (T0 世代) について、除草剤メソトリオン及びグルホシネート耐性、農業形質に関する調査を行い、SYHT0H2 ダイズを選抜した。さらに、一般的なダイズの育成プロセスに従い、自殖あるいは既存の優良ダイズ系統との戻し交配を行うことで後代を維持することで、SYHT0H2 ダイズを育成した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

SYHT0H2 ダイズに導入された *avhppd-03* 遺伝子は Cestrum yellow leaf curling virus 由来の TATA box 配列(Stavolone et al.2003)と、Cauliflower mosaic virus(CaMV)由来の 35S プロモーターの 3'末端領域から TATA box までの配列(Ow et al.1987)を組み合わせ合成したプロモーターにより発現が制御されている。

pat-03-01 遺伝子は CaMV 由来の 35S プロモーター(Ow et al.1987)により発現が制御されている。

pat-03-02 遺伝子は Cestrum yellow leaf curling virus 由来の CMP プロモーター(Stavolone et al., 2003)により発現が制御されている。

② ターミネーターに関する事項

avhppd-03 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子にはいずれも *Rhizobium radiobacter (Agrobacterium tumefaciens)* nopaline synthase 遺伝子由来の NOS ターミネーターによるポリアデニル化により転写が終結する。

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 pSYN15954 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

導入用プラスミド pSYN15954 の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*avhppd-03* 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 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
<i>avhppd-03</i> 遺伝子発現カセット	
FMV エンハンサー	Figwort mosaic virus (FMV) 由来のエンハンサー領域 (Maiti <i>et al.</i> , 1997) で、転写活性を高める。
35S エンハンサー	Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来の 35S エンハンサー領域 (Ow <i>et al.</i> , 1987) で、転写活性を高める。
SMP プロモーター	Cestrum yellow leaf curling virus 由来の TATA box 配列 (Stavolone <i>et al.</i> , 2003) 及び Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来の 35S プロモーターの 3' 末端領域から TATA box までの配列 (Ow <i>et al.</i> , 1987) から成る合成プロモーター。目的遺伝子を恒常的に転写させる。
TMV エンハンサー	Tobacco mosaic virus (TMV) 由来の 5' 非コード領域リーダー配列 (Gallie <i>et al.</i> , 1987)。植物での翻訳活性を高める (Gallie, 2002)。
<i>avhppd-03</i> 遺伝子	エンバク (<i>A. sativa</i> L.) 由来の AvHPPD-03 たん白質をコードする遺伝子。ダイズでの発現を高めるためにコドン最適化して人工的に合成している。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター配列 (Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012))。ポリアダデニル化により mRNA の転写を終結させる (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>pat-03-01</i> 遺伝子発現カセット	
35S プロモーター	Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来のプロモーター領域 (Ow <i>et al.</i> , 1987)。目的遺伝子を恒常的に転写させる。
<i>pat-03-01</i> 遺伝子	<i>S. viridochromogenes</i> strain Tü494 由来の PAT たん白質をコードする遺伝子 (Wohllleben <i>et al.</i> , 1988)。植物での発現を高めるためにコドン最適化して人工的に合成している。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター配列 (Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012))。ポリアダデニル化により mRNA の転写を終結させる (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。
<i>pat-03-02</i> 遺伝子発現カセット	
CMP プロモーター	Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター及びリーダー配列 (Stavolone <i>et al.</i> , 2003)。目的遺伝子を恒常的に転写させる。
TMV エンハンサー	Tobacco mosaic virus (TMV) 由来の 5' 非コード領域リーダー配列 (Gallie <i>et al.</i> , 1987)。植物での翻訳活性を高める (Gallie, 2002)。
<i>pat-03-02</i> 遺伝子	<i>S. viridochromogenes</i> strain Tü494 由来の PAT たん白質をコードする遺伝子 (Wohllleben <i>et al.</i> , 1988)。植物での発現を高め、 <i>pat-03-01</i> 遺伝子と同じ制限酵素認識部位を持たないよう、コドン最適化

	適化して人工的に合成している。
NOS ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーター配列 (Accession Number V00087.1 (NCBI, 2012))。ポリアダニル化により mRNA の転写を終結させる (Depicker <i>et al.</i> , 1982)。

【 挿入遺伝子の機能 】

① *avhppd-03* 遺伝子の機能

avhppd-03 遺伝子によって発現する AvHPPD-03 たん白質は、由来するエンバク内在の HPPD たん白質から 1 アミノ酸を欠失させているが、この欠失部位は酵素の活性部位ではないことから、エンバク内在性の HPPD たん白質と同等である(参考資料 28)。

AvHPPD-03 たん白質は、ダイズ内在性の HPPD たん白質に比べてメソトリオンに対する親和性が低く、メソトリオン存在下でも酵素活性を示す。このことから、AvHPPD-03 たん白質が、活性を阻害されるダイズ内在性 HPPD たん白質に代わってホモゲンチジン酸 (HGA) 生成を触媒することで、植物体にメソトリオン等の HPPD 阻害型除草剤への耐性を付与すると考えられる。

HPPD たん白質は、図 1 に示すように、植物のチロシン代謝経路におけるフマル酸、アセト酢酸、プラストキノン及びビタミン E の生成に必要な芳香族前駆体である HGA 生成を触媒する酵素である (Arias-Barrau *et al.*, 2004、Moran, 2005、DellaPenna and Pogson, 2006、Zbierzak *et al.*, 2010)。HPPD 阻害型除草剤に、HPPD たん白質の酵素活性を阻害された植物は HGA を生産できなくなり、光合成や抗酸化システムに関わるプラストキノンやビタミン E が不足し、結果として葉緑体の分解を伴った白化症状を示して枯死する。

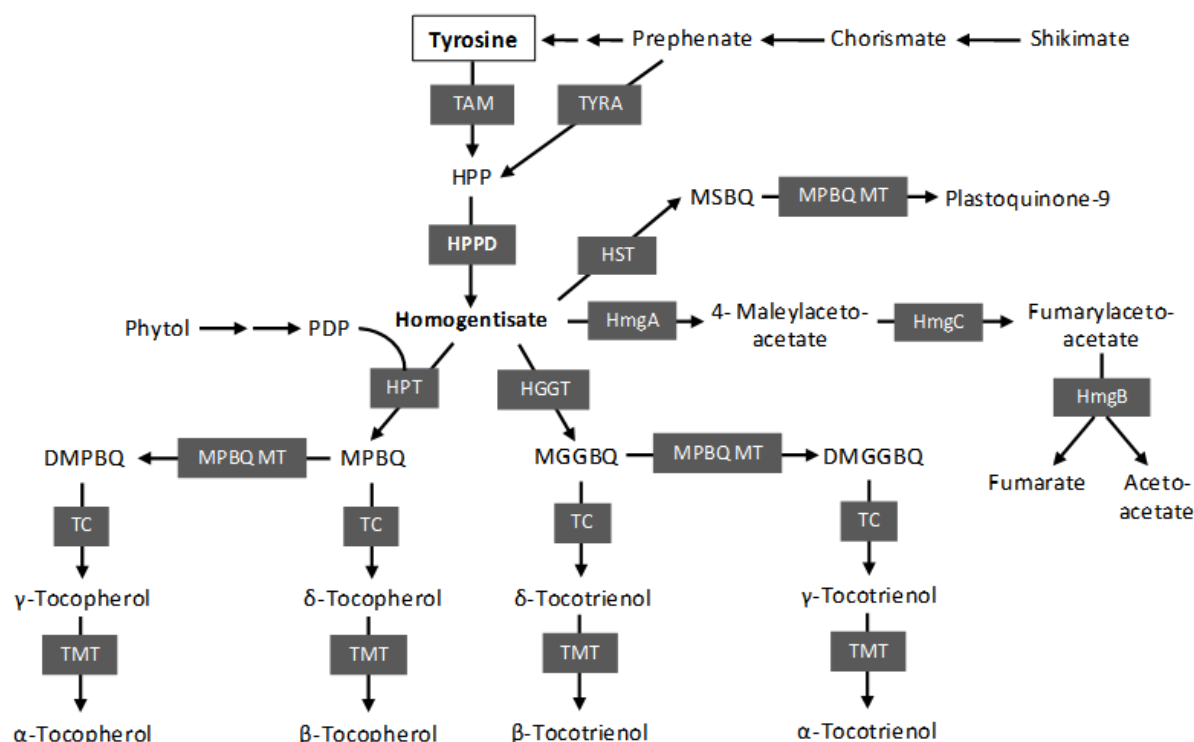


図 1 チロシン代謝経路における HPPD たん白質の役割

反応生成物略語の名称：

HPP=4-hydroxyphenylpyruvate、PDP=phytyldiphosphate、
MSBQ=2-methyl-6-solanyl-1,4-benzoquinone、MPBQ=2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinone、
DMPBQ=2,3-dimethyl-5-phytyl-1,4-benzoquinone、
MGGGBQ=2-methyl-6-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone、
DMGGGBQ=2,3-dimethyl-5-geranylgeranyl-1,4-benzoquinone

反応酵素略語(白抜き英文字)の名称：

TYRA=chorismate mutase-prephenate dehydrogenase、
TAM=L-tyrosine aminotransferase、HPPD=p-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase、
HST=homogentisate solanyltransferase、MPBQ MT=MPBQ methyltransferase、
HmgA=homogentisate dioxygenase、HmgB=fumarylacetoacetate hydrolase、
HmgC=maleylacetoacetate isomerase、HPT=homogentisate phytyltransferase、
HGGT=homogentisate geranylgeranyl transferase、TC=tocopherol cyclase、
TMT=tocopherol methyltransferase

② *pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の機能

pat-03-01 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、植物における発現を高めるため、また、同じ制限酵素認識部位を持たないようにするため、野生型 *pat* 遺伝子 (Wohlleben *et al.*, 1988) のコドンをも最適化してそれぞれ人工的に合成しているが、コードする PAT たん白質のアミノ酸配列に変更はないため、*pat-03-01* 遺伝子と *pat-03-02* 遺伝子のアミノ酸配列は同一である (参考資料 3)。

PAT たん白質は、除草剤グルホシネートをアセチル化して無毒性の *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝し、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害作用を不活性化することで、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する (OECD, 1999)。なお、グルタミン合成酵素は、植物の窒素代謝の過程において大量に発生する有毒なアンモニアを無毒化する役割を果たしており、グ

ルタミン合成酵素が阻害されると、大量の有毒なアンモニアが細胞内に蓄積し、植物細胞死を引き起こす。

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pSYN15954 の塩基配列は明らかにされており、目的外の遺伝子の混入はない。

(6) コピー数に関する事項

SYHT0H2 ダイズの挿入 DNA について、その構成を確認し、導入用プラスミド pSYN15954 の T-DNA 領域と比較するため、塩基配列解析を行った (参考資料 4)。その結果、SYHT0H2 ダイズには、導入用プラスミド pSYN15954 の 2 つの T-DNA 断片が、44 bp の DNA 配列を挟んで逆方向に挿入されていた(図 2)。なお、この 44 bp の DNA 配列は、*avhppd-03* 遺伝子の配列と類似していた。

2 つの T-DNA 断片のうち、5' 末端側のコピーには、右側境界領域、*avhppd-03* 遺伝子発現カセット全体、*pat-03-01* 遺伝子発現カセットの 35S プロモーターの一部及び左側境界領域が存在しなかった。一方、3' 末端側のコピーには、右側境界領域、*avhppd-03* 遺伝子発現カセットの FMV エンハンサー全体と 35S エンハンサーの一部及び左側境界領域が存在しなかった。さらに、3' 末端側のコピーの 35S プロモーター領域内部には、17 bp の DNA 配列が挿入されていたが、この配列の最後の 15 bp は、17 bp の DNA 配列上流に存在する DNA 配列の複製配列であった。

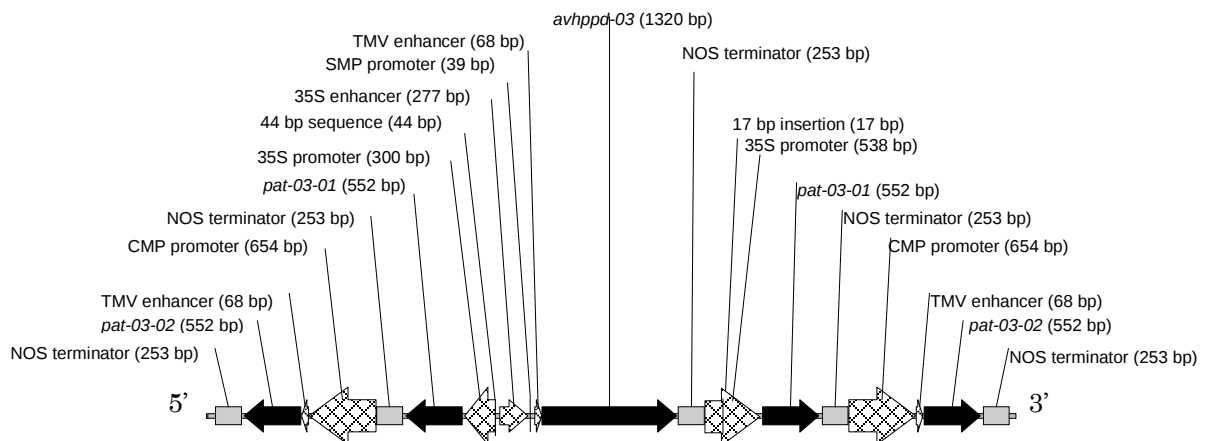


図 2 SYHT0H2 ダイズの挿入遺伝子模式図

また、SYHT0H2 ダイズに挿入された遺伝子のコピー数及び導入用プラスミド pSYN15954 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、SYHT0H2 ダイズは、塩基配列を決定した挿入 DNA のみが組み込まれており、これ以外に導入用プラスミド pSYN15954 の T-DNA 領域及び外側骨格配列が存在しないことが確認された (参考資料 5)。

さらに、挿入 DNA の近傍配列の塩基配列を決定し、宿主であるダイズゲノム配

列と比較した（参考資料 6、7）。その結果、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、導入遺伝子領域の 3' 末端において 7 bp の DNA 断片が新たに挿入されていること、ダイズゲノム配列から 15 bp が欠失していることが明らかになった。

挿入 DNA が導入されることで、ダイズ内在性の遺伝子が損なわれていないかを確認するため、5' 及び 3' 末端両近傍配列（各 1000bp）において NCBI Non-redundant (nr)protein database¹に対する BLASTx による検索（参考資料 8）及び 2 つの塩基配列データベース（NCBI nr/nt database²及び PlantGDB Viridiplantae EST database³）を用いた blastn 検索（参考資料 24）を行った結果、挿入 DNA の導入による既知の内在性遺伝子の破壊はないことが確認された。

（7）安定性に関する事項

SYHT0H2 ダイズの導入遺伝子の安定性を確認するため、2 世代の SYHT0H2 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（参考資料 10）。

また、SYHT0H2 ダイズにおける導入遺伝子の分離様式を確認するため、複数世代にわたる導入遺伝子の分離比のカイ 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、SYHT0H2 ダイズの導入遺伝子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 9）。

（8）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

SYHT0H2 ダイズにおける AvHPPD-03 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 11）。試験にはアルゼンチンの 4 ヶ所のは場から異なる生育時期に採取した SYHT0H2 ダイズの葉、根、地上部及び種子を供試した。測定の結果、全ての組織において AvHPPD-03 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

導入用プラスミド pSYN15954 の外側骨格配列には、抗生物質ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *spec (aadA)* 遺伝子が含まれているが、SYHT0H2 ダイズ中に *spec (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）。

¹ NCBI による、重複のないタンパク質配列データベース。検索には 2012 年 2 月 22 日に更新されたバージョンを使用。

² NCBI による、重複のない塩基配列データベース。検索には 2012 年 3 月 14 日に更新されたバージョンを使用。

³ PlantGDB によって構築された Viridiplantae(緑色植物亜界)の EST(発現配列タグ)データベース(植物の発現配列データベース)。検索には 2012 年 1 月 26 日に更新されたバージョンを使用。

(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

SYHT0H2 ダイズの導入遺伝子及び導入遺伝子とその近傍配列との接合部について意図しないオープンリーディングフレーム(ORF)が形成されるか分析を行った。30 アミノ酸以上からなる ORF の存在を 6 つの読み枠でストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンで検索を行った結果、導入遺伝子では 160 個、両近傍配列との接合部では 8 個の ORF が検出された。これら 168 個の ORF について、既知の毒素たん白質⁴及びアレルゲン⁵との相同性の有無を確認したが、相同性は認められなかった(参考資料 12、13)。

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

SYHT0H2 ダイズは、*avhppd-03* 遺伝子が導入されており、AvHPPD-03 たん白質が発現することにより HPPD 阻害型除草剤に対する耐性が付与されている。また、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 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、SYHT0H2 ダイズは非組換え体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非組換え体ダイズと変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

① AvHPPD-03 たん白質

AvHPPD-03 たん白質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、ORF 検索時と同様に検索を行った結果、AvHPPD-03 たん白質と既知の毒素たん白質との間に相同性は確認されなかった(参考資料 14)。

② PAT たん白質

PAT たん白質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、5 つのデータベース⁶及び毒素たん白質データベース⁷を用いて FASTA 検索を行った結果、既知の毒素たん白質との間に相同性は確認されなかった(参考資料 15)。

⁴NCBI Entrez® Protein Database (NCBI、2012)からキーワード検索で抽出された配列を元に構築された毒性タンパク質データベースを対象に、blastp program(version 2.2.19)(Altschul et al., 1997)を用いて実施。

⁵ Food Allergy Research and Resource Program(FARRP) AllergeOnline database(version 12)(FARRP、2012)に登録されたタンパク質のアミノ酸配列に登録されたタンパク質のアミノ酸配列と FASTA 検索アルゴリズム(Version 3.45)(Pearson and Lipman、1988)を用いて実施。

⁶ Uniprot_Swissprot (version 2012.01)、Uniprot_TrEMBL (version 2012.01)、PDB (version 2011.11)、DAD (version 57) 及び GenPept (version 185)

⁷ Uniprot_Swissprot 及び GenPept 両データベースからキーワード検索で抽出された配列と、Animal Toxin Database に由来する配列を元に構築されたデータベース(version 1.1)。

(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 AvHPPD-03 たん白質

AvHPPD-03 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、*E. coli* によって発現させた AvHPPD-03 たん白質を供試し、以下のア～ウを検討した。なお、*E. coli* を用いて産生した AvHPPD-03 たん白質と SYHT0H2 ダイズで産生される AvHPPD-03 たん白質は、分子量 (SDS-PAGE 分析) と免疫学的反応 (ウェスタンブロット分析)、酵素活性、グリコシル化反応、部分アミノ酸配列及び N 末端アミノ酸配列の評価により同等性が確認されている (参考資料 16)。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

AvHPPD-03 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 1 分後には AvHPPD-03 たん白質のバンドは検出されなくなった。このことから、AvHPPD-03 たん白質は人工胃液中で 1 分以内に速やかに消化されることが確認された (参考資料 18)。

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

AvHPPD-03 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、SDS-PAGE 分析では、反応開始 1 分後には AvHPPD-03 たん白質のバンドは検出されなくなった。ウェスタンブロット分析では、反応開始 1 分後には AvHPPD-03 たん白質のバンドは検出されなくなったが、AvHPPD-03 たん白質の分解産物と見られる 3 本の薄いバンド (約 28、20、13kDa) が検出された。しかし、これら 3 本のバンドも反応開始 5 分後には検出されなくなったことから、AvHPPD-03 たん白質は、人工腸液中で速やかに消化されることが考えられた (参考資料 21)。

ウ 加熱処理

AvHPPD-03 たん白質の加熱処理に対する安定性を、ELISA 分析により評価した。その結果、AvHPPD-03 たん白質の免疫反応性は、65℃の加熱処理で 96.9%失われ、95℃の加熱処理では定量限界値以下となったことから、AvHPPD-03 たん白質は熱に不安定であると考えられた (参考資料 20)。

③ PAT たん白質

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これまでに、以下のア～ウのとおり報告されている。なお、試験で用いられた *E. coli* を用いて産生した PAT たん白質と SYHT0H2 ダイズで産生される PAT たん白質は、見かけの分子量と免疫学的反応、酵素活性、グリコシル化反応、部分アミノ酸配列及び N 末端アミノ酸配列の評価により同等性が確認されている (参考資料 17)。

ア 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

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

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 SDS-PAGE 及び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、分子量は 90℃、60 分の加熱処理でも変化がなかったことが報告されているが (Hérouet *et al.*, 2005)、酵素活性は 55℃、10 分の加熱処理により失われることが確認されている (Wehrman *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 AvHPPD-03 たん白質

AvHPPD-03 たん白質は、HPPD 阻害型除草剤によって阻害される宿主の内在性 HPPD たん白質に代わり、チロシン代謝経路 (図 1、p12) における *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (HPP) からホモゲンチジン酸への反応を触媒する酵素である。

AvHPPD-03 たん白質の基質特異性を確認することを目的として、植物体内に存在することが知られている HPPD たん白質の基質となりうる成分のうち 4 種の HPP 類縁体 (フェニルピルビン酸 (PP)、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC)、 α -ケト- γ -メチルチオ酪酸 (KMTB)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)) と AvHPPD-03 たん白質との反応活性を比較した (参考資料 25)。その結果、これら 4 物質は、HPP と比較して AvHPPD-03 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 HPP 存在下で AvHPPD-03 たん白質の基質となりうる可能性は極めて低く、AvHPPD-03 たん白質は HPP に高い基質特異性を有していることを確認した。

また、AvHPPD-03 たん白質発現による代謝産物への影響を検討した。これまでの研究から、チロシン代謝経路において、HPPD たん白質を単独で過剰発現させただけでは、下流の最終代謝産物であるトコフェロール量やプラストキノン量が増加しない又は著しくは増加しないことが報告されている (Tsegaye *et al.*, 2002、Falk *et al.*, 2003、Rippert *et al.*, 2004、Karunanandaa *et al.*, 2005)。一方、トコフェロール量の増加は、HPPD たん白質の下流代謝酵素であるホモゲンチジン酸フィチルトランスフェラーゼ (HPT) やトコフェロールサイクラーゼ (TC) の過剰発現によって著しく増加することが示されている (Collakova and DellaPenna, 2003、Kanwischer *et al.*, 2005、Lee *et al.*, 2007)。加えて、植物において HGA 生成の上流に位置するチロシンの生合成は、チロシンによるフィードバック阻害によって調節されている (Rippert and Matringe, 2002)。これら

のことから、HPPD タンパク質を過剰に発現させたとしても、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る。この傾向が SYHT0H2 ダイズでも同様に見られるかを SYHT0H2 ダイズ及び非組換えダイズ種子の HGA の分析の比較（参考資料 26）、SYHT0H2 ダイズと非組換えダイズの構成成分分析によるビタミン E の分析の比較、AvHPPD-03 たん白質を発現する遺伝子組換えダイズ種子と非組換えダイズ種子のフマル酸の分析の比較（Clarke et al., 2013 の Supplemental Material）により検討したところ、非組換えダイズと比較して同様であることを確認した。これらの結果より、AvHPPD-03 たん白質の発現が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る。

④ PAT たん白質

PAT たん白質は、グルホシネートをアセチル化することで、植物に対して毒性のない *N*-アセチル-L-グルホシネートへと代謝する酵素である。PAT たん白質は、L-アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い基質特異性を示すが、他の各種アミノ酸をアセチル化することはない（Thompson *et al.*, 1987）。また、過剰の各種アミノ酸の存在下でも、PAT たん白質によるグルホシネートへのアセチル基転移反応が阻害されることはない（Wehrmann *et al.*, 1996）。以上のことから、PAT たん白質は高い基質特異性を有し、宿主の代謝経路に影響を与える可能性は低いと考えられる。

（５）宿主との差異に関する事項

SYHT0H2 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 8 ヶ所のほ場において栽培した SYHT0H2 ダイズ及び対照の非組換えダイズの茎葉及び種子について、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 22）。また、同じ 8 ヶ所のほ場において、参考品種として、6 種の従来商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。SYHT0H2 ダイズに関しては、除草剤散布区及び除草剤（メソトリオン及びグルホシネート）散布区を設定した。

① 主要構成成分

茎葉及び種子中の水分、粗たん白質、粗脂肪、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維（ADF）及び中性デタージェント繊維（NDF）について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えダイズと同等又は従来商業品種の分析値若しくは文献に記載された分析値（ILSI, 2010）の範囲内であった。

② 脂肪酸

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若しく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若しく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

種子中のミネラル類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又は従来商業品種の分析値若しくは文献に記載された分析値 (ILSI, 2010) の範囲内であった。

⑤ ビタミン

種子中のビタミン類について分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組換えダイズと同等又は従来商業品種の分析値若しくは文献に記載された分析値 (ILSI, 2010、ILSI, 2014) の範囲内であった。

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 (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の間に差異は認められなかった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに米国で行われたほ場試験の結果、SYHT0H2 ダイズの外界における生存及び増殖能力は、従来の非組換えダイズと同等であることが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

SYHT0H2 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

SYHT0H2 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) 等、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

2014 年 2 月 オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) において食品としての安全性確認が終了した

2014 年 3,7 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。

2014 年 5,6 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・飼料に対する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

SYHT0H2 ダイズの栽培方法は、生育期の雑草防除に HPPD 阻害型除草剤及び除草剤グルホシネートを使用できることを除き、非組換え体のダイズと同様である。

また、SYHT0H2 ダイズへの使用が想定される HPPD 阻害型除草剤であるメソトリオン又はイソキサフルトール及び除草剤グルホシネートについて、各薬剤及びそれらの代謝物の残留濃度と残留基準値内最大値を元にした家畜等への健康影響を検討した。その結果、SYHT0H2 ダイズへの残留及びこれらの摂取が家畜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 (EPA, 2001、参考資料 22、23、27)。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

SYHT0H2 ダイズの種子の製法及び管理方法は非遺伝子組換え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該当しない。

IV 審議結果

p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 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. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
2. Arias-Barrau E, Olivera ER, Luengo JM, Fernández C, Galán B, García JL, Díaz E, Miñambres B. 2004. The homogentisate pathway: A central catabolic pathway involved in the degradation of L-phenylalanine, L-tyrosine, and 3-hydroxyphenylacetate in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 186: 5062-5077.
3. Collakova E, DellaPenna D. 2003. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 131: 632-642.
4. DellaPenna D, Pogson BJ. 2006. Vitamin synthesis in plants: Tocopherols and Carotenoids. *Annual Reviews of Plant Biology* 57: 711-738.
5. Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular & Applied Genetics* 1: 561-

573.

6. EPA. 2001. MEMORANDUM. Subject: PP#8F04954. Mesotrione: Issues to be Presented to the Health Effects Division (HED) Metabolism Assessment Review Committee (MARC) 10-APR-01. DP Barcode D273597. Chemical 122990. Case No. 289589. Submission No. S541377. http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-122990_3-Apr-01_092.pdf
7. Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Letters* 540: 35-40.
8. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. 1987. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 15: 3257-3273.
9. Gallie DR. 2002. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Research* 30: 3401-3411.
10. Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis RJ, Rouan D. 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: 134-149.
11. ILSI. 2010. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, v. 4.2. http://www.cropcomposition.org/query/workflow.wiz?_flowExecutionKey=_cA7F4B946-6363-4348-11BE-41337A9A24CA_k93E17A8F-A183-1098-64AA-70BE811DD966; search parameters: crop type = "SOYBEAN," tissue type = "FORAGE" or "SEED", crop year = "All", country = "All," and regions = "All"; (accessed July 14, 2011).
12. ILSI. 2014. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, v.5.0. https://www.cropcomposition.org/query/workflow.wiz?_flowExecutionKey=_c8838F5F6-42C4-07A9-942F-F59D0E3BC690_kA26F2160-057F-4A75-B8D0-3E5AEC4ECAD3; search parameters: crop type = "SOYBEAN," tissue type = "SEED", crop year = "All", country = "All," and regions = "All"; (accessed March 16, 2015).
13. Kanwischer M, Porfirova S, Bergmüller E, Dörmann P. 2005. Alterations in tocopherol cyclase activity in transgenic and mutant plants of *Arabidopsis* affect tocopherol content, tocopherol composition and oxidative stress. *Plant Physiology* 137: 713-723.
14. Karunanandaa B, Qi Q, Hao M, Baszis SR, Jensen PK, Wong YHH, Jiang J, Venkatramesh M, Gruys KJ, Moshiri F, Post-Beittenmiller D, Weiss JD, Valentin HE. 2005. Metabolically engineered oilseed crops with enhanced seed tocopherol. *Metabolic Engineering* 7: 384-400.
15. Lee K, Lee SM, Park SR, Jung J, Moon JK, Cheong JJ, Kim M. 2007. Overexpression of *Arabidopsis* homogentisate phytyltransferase or tocopherol cyclase elevates vitamin E content by increasing γ -tocopherol level in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Molecules and Cells* 24: 301-306.
16. Maiti IB, Gowda S, Kiernan J, Ghosh SK, Shepherd RJ. 1997. Promoter/leader deletion

- analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. *Transgenic Research* 6: 143-156.
17. Mizuguti A, Yoshimura Y, Matsuo K. 2009. Flowering phonologies and natural hybridization of genetically modified and wild soybeans under field conditions. *Weed Biology and Management* 9: 93-96.
 18. 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
 19. Moran GR. 2005. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433: 117-128.
 20. Nakayama Y, 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.
 21. Natarajan S, Xu C, Bae H, Bailey BA. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *Journal of Plant Physiology* 164: 756-763.
 22. NCBI. 2012. Entrez® Protein database. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=Protein>.
 23. OECD. 1999. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
 24. 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.
 25. OECD. 2012. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. 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.
 26. Ow DW, Jacobs JD, Howell SH. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84: 4870-4874.
 27. Pearson WR, Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 2444-2448.
 28. Rippert P, Matringe M. 2002. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269: 4753-4761.
 29. Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M. 2004 Engineering plant shikimate pathway

- for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiology* 134: 92-100.
30. Stavolone L, Ragozzino A, Hohn T. 2003. Characterization of *Cestrum yellow leaf curling virus*: a new member of the family *Caulimoviridae*. *Journal of General Virology* 84: 3459-3464.
 31. Thompson CJ, Movva NR, Tizard R, Crameri R, Davies JE, Lauwereys M, Botterman J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* 6: 2519-2523.
 32. Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D. 2002. Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 913-920.
 33. Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology* 14: 1274-1278.
 34. Wohlleben W, Arnold W, Broer I, Hillemann D, Strauch E, Pühler A. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.
 35. Zbierzak AM, Kanwischer M, Wille C, Vidi PA, Giavalisco P, Lohmann A, Briesen I, Porfirova S, Bréhélin C, Kessler F, Dörmann P. 2010. Intersection of the tocopherol and plastoquinol metabolic pathways at the plastoglobule. *Biochemical Journal* 425: 389-399.
 36. 鵜飼保雄. 2010. 第 8 章 ダイズ. 鵜飼保雄, 大澤良編著. 品種改良の世界史 作物編. 悠書館. pp. 179-204.

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. ベクターpNOV2114 の塩基配列
2. Plasmid pSYN15954: Plasmid Lineage Analysis and Sequence (AMENDED REPORT NO.1). Report No. TK0061563 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.
3. *pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の塩基配列とそれを翻訳したアミノ酸配列
4. Event SYHT0H2 Soybean: Insert Sequence Analysis. Report No. TK0059645. Syngenta Crop Protection, LLC.
5. Event SYHT0H2 Soybean: Functional Element Copy Number Southern Blot Analysis. Report No. TK0059651. Syngenta Crop Protection, LLC.
6. Event SYHT0H2 Soybean: Flanking Sequence Determination. Report No. TK0059646. Syngenta Crop Protection, LLC.
7. Event SYHT0H2 Soybean: Genomic Insertion Site Analysis. Report No. TK0059648. Syngenta Crop Protection, LLC.
8. Event SYHT0H2 Soybean: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analysis of Soybean Genomic Sequences Flanking the Insert. Report No. TK0059661. Syngenta Crop Protection, LLC.
9. Event SYHT0H2 Soybean: Mendelian Inheritance Analysis (Amended Report No. 1). Report No. TK0055859 A1. Syngenta Crop Protection, LLC.

10. Event SYHT0H2 Soybean Southern Blot Analysis of the SYHT0H2 T2 Generation Final Report Amendment 2. Report No. TK0059647 A2. Syngenta Crop Protection, LLC.
11. Event SYHT0H2 Soybean: Quantification of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and Phosphinothricin Acetyltransferase in Tissues of Plants Treated with Trait-Specific Herbicides. Report No. SSB-182-12. Syngenta Crop Protection, LLC.
12. Event SYHT0H2 Soybean: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop T-DNA ORFs with a Minimum Size of 30 Amino Acids. Report No. SSB-160-12. Syngenta Crop Protection, LLC.
13. Event SYHT0H2 Soybean: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop Codon, Genome to Insert Junction ORFs with a Minimum Size of 30 Amino Acids. Report No. SSB-163-12. Syngenta Crop Protection, LLC.
14. AvHPPD-03: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins- Report for Japan Registration Requirements. Report No. SSB-178-12. Syngenta Crop Protection, LLC.
15. PAT/*pat* Protein Amino Acid Sequence Homology Search with Known Toxins. Study Identification No. TXSRT006. Bayer CropScience.
16. Comparison of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli* and AvHPPD-03 Protein Produced in Event SYHT0H2 Derived Soybean Plants. Report No. TK0031229. Syngenta Crop Protection, LLC.
17. Comparison of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein Produced in Recombinant *Escherichia coli* and PAT Protein Produced in Event SYHT0H2 Derived Soybean Plants. Report No. TK0059680. Syngenta Crop Protection, LLC.
18. *In vitro* Digestibility of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions. Study No. TKRS0000157. Syngenta Biotechnology, Inc.
19. *In vitro* Digestibility of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. Report No. SSB-060-09. Syngenta Biotechnology, Inc.
20. Effect of Temperature on the Immunoreactivity of *p*-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein. Study No. TKRS0000159. Syngenta Crop Protection, LLC.
21. Compositional Analysis of Forage and Seed from Soybean Event SYHT0H2 Grown During 2010 in the USA. Report No. TK0055213. Syngenta Crop Protection, LLC.
22. Mesotrione SC (A12738A) - Magnitude of the Residues in or on Mesotrione Tolerant Soybeans. Report No. T000908-07. Syngenta Crop Protection, LLC.
23. Ignite® 280 SL - Magnitude of the Residue in/on Soybean. Report No. RAGLP034. Bayer CropScience.
24. Event SYHT0H2 Soybean: Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides (BLASTN) Analysis of Soybean Genomic Sequences Flanking the Insert Using the Nucleotide Collection Database and a Plant Expressed Sequence Tags (EST) Database. Report No. TK0059667. Syngenta Crop Protection, LLC.
25. Substrate specificity of the AvHPPD-03 enzyme. Study Report No. BIOX-

013_ProtDescript_739. Bayer CropScience.

26. SYHT0H2 Soybean – Levels of Homogentisic Acid in Field Grown Seed Samples in USA, 2012. Covance Study No. Covance 8297-651. Covance Laboratories Inc.
27. Isoxaflutole 480 SC (A19628A) – Magnitude of the Residues of Isoxaflutole on Herbicide Tolerant Soybean (Event SYHT0H2) USA 2012. Report No. TK0119290. Syngenta Crop Protection, LLC/Bayer CropScience.
28. AvHPPD-03 タンパク質とエンバク内在性 HPPD タンパク質のアミノ酸配列及び活性中心