

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、グルホシネート及び
ジカンバ耐性テンサイ
KWS20-1 系統**

**令和 6 年 9 月 25 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	- 3 -
II	確認対象飼料の概要	- 3 -
III	審議内容	- 3 -
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	- 3 -
(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	- 4 -
(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	- 5 -
(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	- 6 -
(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	- 11 -

(3) 構造に関する事項	- 12 -
① プロモーターに関する事項	- 12 -
(4) 性質に関する事項	- 12 -
(5) 純度に関する事項	- 13 -
(6) コピー数に関する事項	- 13 -
(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	- 14 -
(10) 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	- 14 -
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	- 15 -
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	- 16 -
(5) 宿主との差異に関する事項	- 17 -
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	- 18 -
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	- 18 -
(8) 不活化法に関する事項	- 18 -
(9) 外国における認可等に関する事項	- 18 -
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	- 18 -
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	- 19 -
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	- 19 -
IV 審議結果	- 19 -
V 参考文献及び参考資料	- 20 -

「除草剤グリホサート、グルホシネート及び
ジカンバ耐性テンサイ KWS20-1 系統」に係る安全性確認

5 I はじめに

除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ
KWS20-1 系統（以下「KWS20-1 系統」という。）について、令和6年6月
26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」
10（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、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ
性 質：除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性
15 申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社（日本）
開発者：Bayer Group（独）及び KWS SAAT SE & Co. KGaA（独）

KWS20-1系統は、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバに対
する耐性を付与するために改変 *cp4 epsps* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び改変 *dmo* 遺
20 伝子を導入したテンサイである。

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

25 宿主は、ヒユ科フダンソウ属のテンサイ (*Beta vulgaris* L. ssp.
vulgaris var. *altissima*) の育成系統 04E05B1DH05 である。

KWS20-1 系統には、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 *cp4 epsps*
遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子及び
Stenotrophomonas maltophilia DI-6 株由来の改変 *dmo* 遺伝子が導入さ
30 れており、次の3種類の形質が付与されている。

1) 改変 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする 5-エノールピルビルシキミ酸-
3-リン酸合成酵素 (EPSPS) (以下「改変 CP4 EPSPS たん白質」とす
る。)を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を有す
る。

35 2) *pat* 遺伝子がコードするホスフィノスリシン *N*-アセチルトランス
フェラーゼ (phosphinothricin *N*-acetyltransferase) たん白質 (以下
「PAT たん白質」とする。)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有する。

40 3) 改変 *dmo* 遺伝子がコードするジカンバモノオキシゲナーゼ
(dicamba mono-oxygenase) たん白質 (以下「改変 KWS20-1 DMO たん
白質」とする。)を発現することにより、除草剤ジカンバに対する耐性
を有する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

45 宿主であるテンサイから精製糖に加工された際の副産物であるビート
パルプ及び糖蜜が、家畜等の飼料として利用されている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

50 KWS20-1 系統及び非組換えテンサイ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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

KWS20-1 系統は、既存のテンサイと使用方法に相違はない。

55 以上(1)～(4)より、KWS20-1 系統の飼料としての安全性評価においては、既存のテンサイ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

60 KWS20-1 系統は、作用機序の異なる複数の除草剤の組み合わせを可能にすることで、難防除雑草や除草剤抵抗性雑草の効果的な管理のための複数の選択肢を農業生産者に提供する。抵抗性雑草の発生を最低限に留める上では、作用機序の異なる複数の除草剤の混用、連続又はローテーション処理や、その他の推奨される総合的雑草管理手法など、多様な雑草管理プログラムを実施することが最良の雑草管理手法とされている。

65

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

70 宿主は、ヒユ科フダンソウ属のテンサイ (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima*) の育成系統 04E05B1DH05 である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

テンサイの遺伝的先祖はヨーロッパから西アジアの海岸によく見られるハマフダンソウ (*Beta vulgaris* L. ssp. *maritima*) と考えられている。

75 紀元前 6 世紀から紀元前 4 世紀には葉を食用とするビートが栽培化され、15 世紀には根が肥大した飼料用ビートとして栽培化された (OECD, 2001)。その後、ビートから育種により糖度の高い品種が育成され、これが現在の全てのテンサイ栽培種の礎となり、18 世紀末にテンサイとして栽培化された (OECD, 2001)。

80 (3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

テンサイが安全に使用されてきた長い歴史の中で、家畜等の健康に悪影響を与える抗栄養素等は報告されていない (OECD, 2002a)。

85 テンサイはサポニンを産生することが知られている。サポニンは天然のトリテルペン配糖体で多様な生理活性をもち、テンサイを含む多くの作物に含まれる (Oakenfull and Sidhu, 1989)。しかし、サポニンはテンサイの加工品である精製糖を含め、飼料として用いられるビートパルプ及び糖蜜にも含まれない。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

90 テンサイの家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

- 95 (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
テンサイにはウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害が知られているが (OECD, 2001)、これらが家畜等に対して病原性をもつことは知られていない。
なお、組換え体の作出においてこれらの外来因子に汚染された宿主を用いることはない。加えて、組換え体の作出においては、培養過程での汚染防止策が確立されており、再生中の植物や幼植物体は無菌的に維持されている。
- 100 (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
テンサイは通常、種子により繁殖する。その一方で、収穫後のほ場に残された根や冠部から植物体を再生することもある (OECD, 2001)。しかし、適切な栽培管理の下では通常はテンサイが雑草として生存することはない。実際に、テンサイは我が国に 1870 年頃に導入され、これまで
- 105 主に西南暖地、東北地方、北海道において栽培されたが、我が国においてテンサイが自生しているという報告はない。
- 110 (7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項
テンサイは二年生植物であり、一年目は栄養成長期間で根が肥大して精製糖の原料となるショ糖を蓄積し、二年目に冬期間の低温で花芽分化し、夏の長日条件下で抽苔・開花、結実する (田中, 2004)。また、テンサイは強い自家不和合性を有する他殖性植物とされているが (OECD, 2001)、自家和合性系統の存在も知られている (Kuranouchi et al., 2000)。
- 115 テンサイは主に風媒によって受粉し、昆虫による花粉の移動も行われる場合があるがその頻度は低く、受粉にはあまり寄与しない (OECD, 2001)。
テンサイとフダンソウ、スイスチャード、食用根菜ビート、飼料用ビートなどの *vulgaris* 種に属する変種の栽培作物との交雑において生殖隔離機構は存在せず、容易に交雑可能である。しかしながら、テンサイの根の収穫を目的とした慣行栽培では、生育一年目に収穫を行うこと、さらに抽苔個体が生じた場合は栽培ほ場から除去されることから、テンサイが開花・結実に至る可能性は低い。
- 120 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項
テンサイは、長い間飼料利用されてきた歴史があり、飼料用、食用として幅広く利用されている。
- 125 (9) 飼料の安全な利用に関する事項
糖蜜及びビートパルプが飼料として安全に利用されている。
- 130 (10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項
テンサイの栽培は温帯から亜寒帯に広く分布しているが、テンサイは寒さに弱く、-5 °C 以下での降霜で枯死する (CFIA, 2012)。また、テンサイが生殖成長を開始するには、最適な誘導温度である 4~13 °C に 90~110 日間曝露されることが必要であり、短日条件も栄養成長から生
- 135

140 殖成長への移行プロセスに強い影響を与える (OECD, 2001)。つまり、
テンサイの生存・増殖能力は気候条件により制限されている。仮に、自
生したとしても、農業機械や除草剤等の使用により自生テンサイを防除
することができる (OECD, 2001)。

145 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項
テンサイの近縁種としてフダンソウ、スイスチャード、食用根菜ビー
ト、飼料用ビート等のフダンソウ属 *vulgaris* 種に属する変種がある
(OECD, 2001)。これらの変種についても、これまで安全に摂取されてき
た歴史があり、ヒト及び家畜等の健康に悪影響を与えるとは考えられて
いない。

150 4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項
KWS20-1 系統の作出に用いられた導入用プラスミド
PV-BVHT527462 は、*Pseudomonas aeruginosa* 由来のプラスミド
pVS1 及び *Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322などを基に作成し
た。

155 (2) 性質に関する事項
導入用プラスミド PV-BVHT527462 の塩基数、全塩基配列、制限酵素
切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており (参考資
料 1)、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

160 (3) 薬剤耐性に関する事項
導入用プラスミド PV-BVHT527462 の外骨格領域には、スペクチノマ
イシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が、
E. coli 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして外側骨格領域
165 に存在している。

(4) 伝達性に関する事項
導入用プラスミド PV-BVHT527462 には伝達を可能とする配列は含ま
れていない。

170 (5) 宿主依存性に関する事項
導入用プラスミド PV-BVHT527462 には、① *E. coli* に由来する自律増
殖のための複製開始領域 *ori* pBR322 と、② *Agrobacterium rhizogenesis*
に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori* pVs1 が組み込まれている。
175 しかし、これらの領域により導入用プラスミド PV-BVHT527462 が、植
物や家畜等で増殖することはできない。さらに導入遺伝子の解析の結果、
KWS20-1 系統中には、これらの領域を含む外側骨格領域は導入されて
いないことが確認されている。

180 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項
導入用プラスミド PV-BVHT527462 (参考資料 1) は、*P. aeruginosa*

由来のプラスミド pVS1 及び *E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成されており、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット及び改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域を有している。

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

KWS20-1 系統は、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット、*pat* 遺伝子発現カセット及び改変 *dmo* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域をもった導入用プラスミド PV-BVHT527462 を、アグロバクテリウム法により従来テンサイの育成系統 04E05B1DH05 のシュート断片に導入することにより作出された。この T-DNA 領域は、導入を促すための右側境界領域と左側境界領域を有する。なお、KWS20-1 系統中に外側骨格領域が含まれていないことを、サザンブロットにより確認している。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

① 名称、由来及び分類に関する事項

以下の表に、導入された遺伝子の名称及びその由来を示す。

表 1 KWS20-1 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来及び機能
T-DNA 領域	
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T ² - <i>guf-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank Accession: MH931406)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

表 1 KWS20-1 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	由来及び機能
CS ³ -改変 <i>cp4 epsps</i>	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株由来の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (CP4 EPSPS) をコードしている <i>aroA (epsps)</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett et al., 1996; Barry et al., 2001)。除草剤グリホサート耐性を付与する。
TS ⁴ - <i>CTP2</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis 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)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P ⁵ - <i>SAM2-Cm1</i>	メロン (<i>Cucumis melo</i>) の S-アデノシル-L-メチオニン合成酵素をコードする <i>SAM2</i> 遺伝子のイントロン、5' 末端非翻訳領域及びプロモーター配列 (GenBank Accession: OK149194) で、恒常的に転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
E ⁶ - <i>DaMV-I*</i>	ダリアモザイクウイルス (DaMV) のプロモーター領域に由来するエンハンサー配列 (Kuluev and Chemeris, 2007)。植物細胞内での転写を高める。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

* 本配列はダリアモザイクウイルス (DaMV) の推定 ORF (open reading frame) の一部を含むが、KWS20-1 系統における改変 KWS20-1 DMO たん白質及び改変 CP4 EPSPS たん白質が安定して発現していることから、本配列は意図したとおり改変 KWS20-1 DMO たん白質を発現させるためのエンハンサーとして機能し、DaMV 由来のたん白質が生成される可能性はないと考えられる。

表 1 KWS20-1 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	由来及び機能
P- <i>Ubq-Cm1</i>	メロン (<i>C. melo</i>) 由来の推定ユビキチンたん白質の遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロン配列 (GenBank Accession: OK149193) で、恒常的な転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
TS- <i>RbcS (Ps)</i> **	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>) のリブローズ-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>RbcS</i> 遺伝子ファミリーのターゲティング配列とコード領域の最初の 27 アミノ酸 (GenBank Accession: ON714500)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する (Fluhr et al., 1986)。
CS-改変 <i>dmo</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> DI-6 株のジカンバモノオキシゲナーゼ (DMO) のコード配列 (Wang et al., 1997; Herman et al., 2005)。除草剤ジカンバ耐性を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T- <i>guf-Mt2</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の機能未知遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: OK149195) で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
P- <i>Cab-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のクロロフィル a/b 結合たん白質 (CAB) のプロモーター及びリーダー配列 (GenBank Accession: OK149192) で、主に緑色組織での転写を誘導する (Ha and An, 1988)。

** 改変 *dmo* 遺伝子発現カセットからはターゲティング配列である *RbcS* と改変 *dmo* 遺伝子が融合した前駆たん白質が発現する。その後、前駆たん白質はプロセッシングにより *RbcS* に由来するペプチドの大部分が切り離され、残りのペプチド (27 アミノ酸) が N 末端に残存した改変 KWS20-1 DMO たん白質が生じる。

表 1 KWS20-1 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-BVHT527462 の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	由来及び機能
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS- <i>pat</i>	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシン <i>N</i> -アセチルトランスフェラーゼ (PAT たん白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Wohlleben et al., 1988; Wehrmann et al., 1996)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
T- <i>Hsp20-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) の熱ショックたん白質をコードする推定 <i>Hsp20</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列 (GenBank Accession: OK149196) で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域で、T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker et al., 1983)。
外側骨格領域 (KWS20-1 系統には存在しない)	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR ⁷ - <i>ori-pVS1</i>	プラスミド pVS1 に由来する複製開始領域。 <i>Agrobacterium</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Itoh et al., 1984)。
Intervening sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
CS- <i>rop</i>	ColE1 プラスミドに由来するプライマーたん白質のリプレッサー (Repressor of primer (rop)) のコード配列であり、 <i>Escherichia coli</i> においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。

225 表 1 KWS20-1 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-BVHT527462 の
各構成要素の由来及び機能（続き）

構成要素	由来及び機能
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
OR-ori-pBR322	pBR322 由来の複製開始領域 (Sutcliffe, 1979)。 <i>E. coli</i> 中においてベクターに自律増殖能を付与する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。
aadA	トランスポゾン Tn7 由来の 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ（アミノグリコシド改変酵素）の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。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。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列で、特別な機能を有さない。

- ¹ B-Border (境界配列)
- ² T-Transcription Termination Sequence (転写終結配列)
- ³ CS-Coding Sequence (コード配列)
- ⁴ TS-Targeting Sequence (ターゲティング配列)
- ⁵ P-Promoter (プロモーター)
- ⁶ E-Enhancer (エンハンサー)
- ⁷ OR-Origin of Replication (複製開始領域)

235 ② 安全性に関する事項

テンサイは食品及び飼料としての長い使用の歴史を有する作物である。また、*Agrobacterium* sp. CP4 株、*Str. viridochromogenes* 及び *Ste. maltophilia* は環境中に偏在する細菌であり、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

240 以上のことから、これらの供与体は家畜等の健康に悪影響を与えるものではないと考えられる。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

245 挿入遺伝子の宿主への導入は、導入用プラスミド PV-BVHT527462 を用いてアグロバクテリウム法により行った。非組換えテンサイの育成系統 04E05B1DH05 のシュート断片と導入用プラスミド PV-BVHT527462 を含むアグロバクテリウムと共存培養することにより形質転換を行った。その後、形質転換された細胞を選抜し、次いで、正常な表現型を示す個体を選抜した。これらの個体から、1 コピーの T-DNA 領域を有する、導入用プラスミドの外側骨格領域を含まない、反復領域や内在性遺伝子配

列への挿入がない、などの条件を満たす個体を選抜し、土壌に移植し成育させた。

1 個体の再分化個体 (T_0) に袋掛けを行って自殖し、 T_1 世代の種子を作出した。宿主として用いた非組換えテンサイの育成系統 04E05B1DH05 は自家和合性系統であるため、自殖が可能である。 T_1 世代の種子において、T-DNA 領域を有し、外側骨格領域をもたない 12 個体を KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) 解析及びサザンブロットにより選抜した。これら T_1 世代の 12 個体を隔離ほ場において集団内で放任受粉させ、 T_2 世代の種子を作出した。 T_2 世代及びその後代において、T-DNA 領域をホモで有する個体を選抜し、そのうち外側骨格領域をもたないことを確認した個体を、詳細な導入遺伝子解析の対象とした。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットはメロン (*Cucumis melo*) 由来の *SAM2-Cm1* プロモーターが、*pat* 遺伝子発現カセットはシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *Cab-At1* プロモーターが、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットはメロン (*C. melo*) 由来の *Ubq-Cm1* プロモーターが使用されている。

② ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは *guf-Mt1* ターミネーター、*pat* 遺伝子発現カセットは *Hsp20-Mt1* ターミネーター、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットは *guf-Mt2* ターミネーターが使用されており、いずれもタルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) 由来である。

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 PV-BVHT527462 の各構成要素の機能は既に明らかにされており (表 1)、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

① 改変 *cp4 epsps* 遺伝子の機能

改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、植物体内で改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する。除草剤グリホサートは、植物において芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS たん白質) と特異的に結合しその活性を阻害することで細胞死を引き起こす (Steinrücken and Amrhein, 1980; Haslam, 1993)。一方、組換えテンサイで産生される改変 CP4 EPSPS たん白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、本組換えテンサイはシキミ酸経路が正常に機能し、除草剤グリホサートへの耐性を示す。

② *pat* 遺伝子の機能

pat 遺伝子は、植物体内で PAT たん白質を発現する。PAT たん白

質は、L-ホスフィノスリシンの遊離アミン基をアセチル化し、除草活性のない *N*-アセチルグルホシネートに変換することで、グルホシネートに対する耐性を植物体に付与する。除草剤グルホシネートは、L-ホスフィノスリシンがグルタミン合成酵素活性を阻害するため、その基質であるアンモニアが植物体内に蓄積し、植物は枯死する (Wild and Manderscheid, 1984; Manderscheid and Wild, 1986; OECD, 1999; OECD, 2002b)。

③ 改変 *dmo* 遺伝子の機能

改変 *dmo* 遺伝子は、植物体内で改変 KWS20-1 DMO たん白質を発現する。改変 KWS20-1 DMO たん白質は、除草剤ジカンバを脱メチル化し、除草活性のない 3,6-ジクロロサリチル酸 (DCSA; 3,6-dichlorosalicylic acid) とホルムアルデヒド (HCHO) に変換する (Chakraborty et al., 2005)。この働きにより、改変 KWS20-1 DMO たん白質は除草剤ジカンバに対する耐性を植物体に付与する。

なお、KWS20-1 系統における植物代謝試験により、KWS20-1 系統の根及び葉においては、他のジカンバ耐性作物と同様に、ジカンバが主に DCSA、2,5-ジクロロ-3,6-ジヒドロキシ安息香酸 (DCGA; 3,6-dichlorogentisic acid) 及び 5-ヒドロキシジカンバに代謝されることを確認した (参考資料 4)。除草剤ジカンバは、人工オーキシンの除草剤であり、広葉雑草に細胞分裂異常を引き起こすことによって除草活性を示す (Ahrens, 1994)。

(5) 純度に関する事項

塩基配列解析により、T-DNA 領域内に目的外の遺伝子の混入はないことを確認している (参考資料 1)。

(6) コピー数に関する事項

KWS20-1 系統に導入された T-DNA 領域 (導入遺伝子) の挿入箇所数及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無、並びに導入遺伝子及びその近傍配列を確認するために、サザンブロット並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を実施した。さらに、KWS20-1 系統の導入遺伝子挿入部位をテンサイのゲノムデータベースと照合し、導入遺伝子がテンサイ内在性の既知の遺伝子を破壊していないかどうかを確認した (参考資料 6、参考資料 7)。

サザンブロットの結果、KWS20-1 系統に導入遺伝子は、KWS20-1 系統のテンサイゲノム中の 1 か所に 1 コピー導入されていることが確認された。また、導入用プラスミド PV-BVHT527462 に由来する非意図的な配列が存在しないことも確認された。

導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を行った結果、導入遺伝子及びその近傍配列が決定され、KWS20-1 系統中の導入遺伝子と導入用プラスミド PV-BVHT527462 の T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることも確認された。また、KWS20-1 系統の導入遺伝子挿入部位において、テンサイゲノム配列に連続する 7 bp の欠失が認められた。

近傍配列をテンサイのゲノムデータベースの塩基配列と照合した結果、

導入遺伝子の挿入によりテンサイ内在性の既知の遺伝子が破壊されていないことが示された。

(7) 安定性に関する事項

345 KWS20-1 系統に導入された遺伝子の後代における安定性を確認するため、T₂、T₃及びT₄世代の葉から抽出したゲノム DNA を用いて、導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数を解析した際と同一の手法によりサザンブロットを行った（参考資料6）。

350 その結果、KWS20-1 系統において予想されるサザンブロットのバンドパターンが3世代にわたり維持されていた。これにより、KWS20-1 系統中には1コピーのT-DNA領域が導入遺伝子として導入されており、複数世代にわたり安定して遺伝していることが示された。

355 また、複数世代にわたる改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質の発現の安定性を確認するため、KWS20-1 系統の3世代（T₂、T₃及びT₄世代）並びに対照の非組換えテンサイから採取した葉について、ウエスタンブロットを行った。その結果、供試したいずれのたん白質についても、全ての世代で検出され、安定して後代で発現していることが確認された（参考資料8）。

360 (8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

2020年に米国5か所のほ場の各反復から KWS20-1 系統の葉、地上部及び根を採取し、KWS20-1 系統における改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質の発現量を ELISA 法により測定した（参考資料9）。その結果、測定の結果、改変 CP4 EPSPS 365 たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質は分析を行ったすべての組織において発現が確認された。一方、PAT たん白質は、収穫可能な程度に発達した生育時期に採取した根を除き、すべての組織において発現が確認された。

370 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

375 導入用プラスミド PV-BVHT527462 には、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トランスポゾン Tn7 由来の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（AAD）の細菌プロモーター、コード配列及び3'末端非翻訳領域を含む *aadA* 遺伝子（Fling et al., 1985）が *E. coli* 及びアグロバクテリウム中での選抜マーカーとして外側骨格領域に存在している。なお、KWS20-1 系統中に *aadA* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブロットにより確認している。

380 (10) 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

385 KWS20-1 系統の導入遺伝子と5'及び3'末端近傍配列の両境界領域において、既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質と相同性のあるオープンリーディングフレーム（以下「ORF」とする。）を調べるため、6 フレームについて ORF を検索した。その結果、合計10個の ORF が

確認されたため、相同性検索を行ったところ、データベース中の配列と *E*-score が 1×10^{-5} 以下で相同性を示す配列は検出されず、既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質との構造相同性は認められなかった(参考資料 10)。

390 また、KWS20-1 系統中の導入遺伝子において、6 フレームから目的以外の新規たん白質が産生され、既知の毒性たん白質及び有害な生理活性たん白質と構造相動性に対し相同性検索を行ったところ、TOX_2022 を用いた検索では検出されなかったが、PRT_2022 を用いた相同性検索の結果、5 つのフレームから *E*-score が 1×10^{-5} 以下で相同性を示す配列が
395 検出された(参考資料 11)。しかし、検出されたアライメントは、いずれも有害な生理活性を呈する可能性を示唆するものではなかった。

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

400 KWS20-1 系統に導入されているのは、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットと *pat* 遺伝子発現カセット、改変 *dmo* 遺伝子発現カセットのみである。KWS20-1 系統は、改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質の発現により、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバへの耐性が付与されている。この点を除けば、
405 KWS20-1 系統は既存種とその形態及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

410 改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質が、既知の毒性たん白質と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか調査するために、TOX_2022 を用いて FASTA 型アルゴリズムにより *E*-score が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行った。検索の結果、改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質及び改変 KWS20-1 DMO たん白質は、既知の毒性たん白質及びその他のヒトや家畜等に有害なたん白質と構造的に類似性のある配列は共有していなかった(参考
415 資料 2、参考資料 3、参考資料 5)。

(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

420 KWS20-1 系統で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質は既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された除草剤耐性作物で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質、PAT たん白質の物理化学的処理に対する感受性と同等であると考えられる。

425 DMO たん白質も、既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された除草剤耐性作物においても存在している。また、KWS20-1 系統で発現する改変 KWS20-1 DMO たん白質のアミノ酸配列は、*Ste. maltophilia* DI-6 株由来の野生型 DMO たん白質のアミノ酸配列と比較して、N 末端のメチオニンの直後にロイシンが挿入されており、さらに、*RbcS* に由来する 27 個のアミノ酸が N 末端側に付加されている。N 末端のメチオニンの直後にロイシンが挿入されていることにつ
430 いては、既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された除草剤耐

性作物において発現する DMO たん白質のアミノ酸配列と同一であり、N 末端側に付加されている 27 アミノ酸の配列も、既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された除草剤耐性作物の N 末端側に付加されている 27 アミノ酸の配列と同一である。したがって、KWS20-1 系統で発現する改変 KWS20-1 DMO たん白質の物理化学的処理に対する感受性は、既に遺伝子組換え飼料としての安全性が確認された除草剤耐性作物で発現する改変 DMO たん白質の物理化学的処理に対する感受性と同等であると考えられる。

以上の理由から、物理化学的処理に対する感受性の試験を行っていない。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS たん白質は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物の葉緑体又は色素体に存在する (della-Cioppa et al., 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である (Haslam, 1974; Haslam, 1993)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸 (DAHP) 合成酵素により制御されるが、DAHP から EPSPS たん白質が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階が中間代謝物質や最終生成物で阻害・抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている (Weiss and Edwards, 1980; Herrmann, 1983)。このことは EPSPS たん白質が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、したがって、EPSPS たん白質活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS たん白質を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されている (Smart et al., 1985)。また、アミノ酸分析により、芳香族アミノ酸含量に KWS20-1 系統と対照の非組換えテンサイとの間で相違のないことを確認している。また、EPSPS たん白質はホスホエノールピルビン酸塩 (PEP) とシキミ酸-3-リン酸塩 (S3P) から、EPSP と無機リン酸塩 (Pi) を生じる可逆反応を触媒する酵素であり (Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys et al., 1992)。これら以外に唯一 EPSPS たん白質と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、Gruys ら (1992) の論文をもとに計算すると、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えにくい。

以上のことから、植物 EPSPS たん白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS たん白質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

PAT たん白質は、アセチル-CoA の存在下においてグルホシネートに高い特異性を有することが知られている (Thompson et al., 1987; Wehrmann et al., 1996)。グルホシネートの除草剤活性は L 体のアミノ酸である L-ホスフィノスリシンによるものであるが、その他の L 体アミ

ノ酸は、PAT たん白質によりアセチル化されることはない。グルホシネート及び高濃度のその他 L 体アミノ酸を基質として供試した競合アッセイでは、PAT たん白質によるグルホシネートのアセチル化の阻害は認められなかった (Wehrmann et al., 1996)。なお、近年の代謝プロファイリングにおいて、ダイズを含む複数の植物で 2 つのアミノ酸 (アミノアジピン酸及びトリプトファン) の PAT たん白質を介した非特異的なアセチル化が報告されている (Christ et al., 2017)。しかしながら、これら 2 つのアミノ酸に対する PAT たん白質の活性は、L-ホスフィノスリシンに対する活性と比べて非常に低いものであり、PAT たん白質の L-ホスフィノスリシンに対する高い基質特異性が示唆される。なお、トウモロコシ、ワタ、ダイズ、セイヨウナタネ、テンサイ及びコメを含む数多くの除草剤グルホシネート耐性作物が評価されてきたが (Hérouet et al., 2005; ILSI-CERA, 2011)、ヒトや家畜等の健康に対する悪影響があるとの報告はない (Hérouet et al., 2005)。

以上のことから、PAT たん白質が内在性化合物を代謝して、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

DMO たん白質は、ジカンバに高い特異性を示すことが知られている。ジカンバは、DMO たん白質の触媒部位のアミノ酸と、ジカンバのカルボキシ基及び塩素原子を介して相互作用することが知られており、このクロロ基がジカンバの代謝に必須である (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)。植物及び他の真核生物において、塩素化合物の存在は限定的であることが知られていることから (Gribble, 2010)、改変 DMO たん白質が植物の内在性化合物を代謝することは考え難い。

さらに、KWS20-1 系統で発現する改変 KWS20-1 DMO たん白質は、既に遺伝子組換え飼料としての安全性の確認がなされている遺伝子組換え作物で発現する DMO たん白質と高いレベルのアミノ酸配列同一性を有しており、これらの遺伝子組換え作物で発現する DMO たん白質はいずれも宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと判断している。KWS20-1 系統で発現する改変 KWS20-1 DMO たん白質、野生型の DMO たん白質、及び他の遺伝子組換え作物で発現する DMO たん白質のアミノ酸配列の違いは、N 末端部位並びに N 末端側から 2 番目及び 112 番目のアミノ酸に限定されている。加えて、野生型 DMO たん白質の結晶構造に基づけば、これらの差異は DMO たん白質の触媒部位から立体構造的に離れているため (D'Ordine et al., 2009; Dumitru et al., 2009)、DMO たん白質の基質特異性に影響を及ぼすことは考え難い (Wang et al., 2016)。

以上のことから、改変 KWS20-1 DMO たん白質が内在性化合物を代謝して、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

KWS20-1 系統及び対照の非組換えテンサイの根及び地上部の構成成分を分析した結果、根の栄養素について 8 項目で統計学的有意差が認められたが、KWS20-1 系統の平均値はいずれも AFSI データベースに報告

525

されているテンサイにおける含有量の範囲内、又は2020年に米国の5か所のは場において同時に栽培されたテンサイの従来品種における含有量の範囲内に収まっており、これまで安全に摂取されている従来テンサイの変動の範囲内であった（参考資料 12、参考資料 13）。以上のことから、KWS20-1 系統の根及び地上部の構成成分は、従来テンサイ品種と同等であることが示された。

530

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項
これまでに実施したほ場試験において、KWS20-1 系統と非組換えテンサイとの間に、外界における生存及び増殖能力の差異は認められなかった。

535

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項
KWS20-1 系統と非組換えテンサイにおいて、生存及び増殖能力の制限要因に関しても変わりはない。

540

(8) 不活化法に関する事項
KWS20-1 系統も従来テンサイと同様に、物理的防除（耕起）や化学的防除（感受性を示す除草剤の使用）など、トウモロコシ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

表 2 諸外国における認可状況

機関	安全性審査の種類	申請時期	承認時期
カナダ保健省	食品	2022年5月	2023年12月
カナダ食品検査庁	環境・飼料	2022年5月	2023年12月
米国農務省	環境	2022年8月	2024年4月 ¹
欧州食品安全機関	食品・飼料及び輸入	2023年5月	—
米国食品医薬品庁	食品・飼料	2023年6月	—
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関	食品	2024年3月	—

545

550

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項
KWS20-1 系統では生育期に雑草防除のために、除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバを使用できる。この点を除き、栽培方法は従来テンサイと同様である。

- (11) 種子の製法及び管理方法に関する事項
従来のテンサイと相違はない。

555 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。

560 IV 審議結果

除草剤グリホサート、グルホシネート及びジカンバ耐性テンサイ（KWS20-1 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。

565

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- AFSI. 2020. Crop Composition Database. Version 8.0. Agriculture & Food Systems
570 Institute, Washington, D.C. <http://www.cropcomposition.org/> [Accessed October 27, 2020].
- Ahrens, W.H. 1994. Dicamba. 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid. Pages 91-94 in
575 Herbicide Handbook. Seventh Edition. Weed Science Society of America, Champaign, Illinois.
- Anderson, J.E., J.-M. Michno, T.J.Y. Kono, A.O. Stec, B.W. Campbell, S.J. Curtin and
R.M. Stupar. 2016. Genomic variation and DNA repair associated with soybean
580 transgenesis: A comparison to cultivars and mutagenized plants. BMC Biotechnology 16: 41.
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of
the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955.
585 Plant Molecular Biology 2: 335-350.
- Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgett and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant
5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office,
Washington, D.C.
- 590 Behrens, M.R., N. Mutlu, S. Chakraborty, R. Dumitru, W.Z. Jiang, B.J. LaVallee, P.L.
Herman, T.E. Clemente and D.P. Weeks. 2007. Dicamba resistance: Enlarging and
preserving biotechnology-based weed management strategies. Science 316: 1185-1188.
- Brooke, J.S. 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: An emerging global opportunistic
595 pathogen. Clinical Microbiology Reviews 25: 2-41.
- Cattanach, A.W., A.G. Dexter and E.S. Oplinger. 1991. Sugarbeets. Alternative field crops
manual. University of Wisconsin, University of Minnesota.
600 <https://hort.purdue.edu/newcrop/afcm/sugarbeet.html> [Accessed September 9, 2021].
- CFIA. 2012. The biology of *Beta vulgaris* L. (Sugar beet). Canadian Food Inspection
Agency, Ottawa, Ontario.
605 <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/bio0201e.shtml> [Accessed July 22, 2021].
- Chakraborty, S., M. Behrens, P.L. Herman, A.F. Arendsen, W.R. Hagen, D.L. Carlson, X.-
Z. Wang and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from
Pseudomonas maltophilia, strain DI-6: Purification and characterization. Archives of
610 Biochemistry and Biophysics 437: 20-28.
- Christ, B., R. Hochstrasser, L. Guyer, R. Francisco, S. Aubry, S. Hörtensteiner and J.-K.
Weng. 2017. Non-specific activities of the major herbicide-resistance gene *BAR*. Nature
615 Plants 3: 937-945.

- Clark, S.E. and G.K. Lamppa. 1992. Processing of the precursors for the light-harvesting chlorophyll-binding proteins of photosystem II and photosystem I during import and in an organelle-free assay. *Plant Physiology* 98: 595-601.
- 620 D'Ordine, R.L., T.J. Rydel, M.J. Storek, E.J. Sturman, F. Moshiri, R.K. Bartlett, G.R. Brown, R.J. Eilers, C. Dart, Y. Qi, S. Flasinski and S.J. Franklin. 2009. Dicamba monooxygenase: Structural insights into a dynamic Rieske oxygenase that catalyzes an exocyclic monooxygenation. *Journal of Molecular Biology* 392: 481-497.
- 625 della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.
- 630 Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.
- 635 Dumitru, R., W.Z. Jiang, D.P. Weeks and M.A. Wilson. 2009. Crystal structure of dicamba monooxygenase: A Rieske nonheme oxygenase that catalyzes oxidative demethylation. *Journal of Molecular Biology* 392: 498-510.
- 640 Echemendia, Y. 2010. Microorganism of the month: *Stenotrophomonas maltophilia*. Environmental Microbiology Laboratory, Inc., Cherry Hill, New Jersey. <http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-07-2007.html> [Accessed August 10, 2010].
- 645 FAO-WHO. 2011. Pesticide residues in food 2010. Report 2010. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. FAO Plant Production and Protection Paper 200. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy.
- 650 FAO-WHO. 2013. Pesticide residues in food 2012. Report 2012. Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy.
- 655 FAO-WHO. 2019. Pesticide residues in food 2019. Report 2019. Extra Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy.
- 660 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 665 Fluhr, R., P. Moses, G. Morelli, G. Coruzzi and N.-H. Chua. 1986. Expression dynamics of the pea *rbcS* multigene family and organ distribution of the transcripts. *The EMBO Journal* 5: 2063-2071.
- Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. *Gene* 78: 73-84.

- Goodfellow, M. and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37: 189-216.
- 670 Gribble, G.W. 2010. Occurrence. Pages 9-348 in *Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update*. Volume 91. Springer-Verlag, New York, New York.
- 675 Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 680 Ha, S.-B. and G. An. 1988. Identification of upstream regulatory elements involved in the developmental expression of the *Arabidopsis thaliana cabl* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 8017-8021.
- Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids. Pages 3-48 in *The Shikimate Pathway*. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- 685 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-16 in *Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites*. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
- 690 Heller, D., E.J. Helmerhorst, A.C. Gower, W.L. Siqueira, B.J. Paster and F.G. Oppenheim. 2016. Microbial diversity in the early *in vivo*-formed dental biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 1881-1888.
- 695 Herman, P.L., M. Behrens, S. Chakraborty, B.M. Chrastil, J. Barycki and D.P. Weeks. 2005. A three-component dicamba *O*-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: Gene isolation, characterization, and heterologous expression. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 24759-24767.
- Hernandez-Garcia, C.M. and J.J. Finer. 2014. Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Science* 217-218: 109-119.
- 700 Hérouet, C., D.J. Esdaile, B.A. Mallyon, E. Debruyne, A. Schulz, T. Currier, K. Hendrickx, R.-J. van der Klis and D. Rouan. 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.
- 705 Herrmann, K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in *Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation*. K.M. Herrmann and R.L. Somerville (eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.
- 710 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- 715 Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

ILSI-CERA. 2011. A review of the environmental safety of the PAT protein. International Life Sciences Institute, Center for Environmental Risk Assessment, Washington, D.C.

720 Itoh, Y., J.M. Watson, D. Haas and T. Leisinger. 1984. Genetic and molecular characterization of the *Pseudomonas* plasmid pVS1. Plasmid 11: 206-220.

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
725 manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. Molecular and General Genetics 210: 437-442.

Kuluev, B.R. and A.V. Chemeris. 2007. Amplification and cloning of dahlia mosaic virus and carnation etched ring virus promoters. Russian Journal of Genetics 43: 1413-1414.

730 Kuranouchi, T., K. Kawaguchi and M. Tanaka. 2000. Male sterility in sugar beet induced by cooling treatment and its application to cross-pollination for breeding. Breeding Science 50: 283-289.

735 Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. Journal of Biological Chemistry 239: 1142-1150.

Lira, F., G. Berg and J.L. Martínez. 2017. Double-face meets the bacterial world: The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Frontiers in Microbiology 8: 2190.

740 Manderscheid, R. and A. Wild. 1986. Studies on the mechanism of inhibition by phosphinothricin of glutamine synthetase isolated from *Triticum aestivum* L. Journal of Plant Physiology 123: 135-142.

745 Meier, U. 2001. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants. BBCH Monograph. Second Edition. Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Grossbeeren, Germany.

750 Meinnel, T. and C. Giglione. 2008. Tools for analyzing and predicting N-terminal protein modifications. Proteomics 8: 626-649.

Oakenfull, D. and G.S. Sidhu. 1989. Saponins. Pages 97-141 in Toxicants of Plant Origin. Volume II - Glycosides. P.R. Cheeke (ed.). CRC Press, Inc., Boca raton, Florida.

755 OECD. 1999. Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide. ENV/JM/MONO(99)13. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

760 OECD. 2001. Consensus document on the biology of *Beta vulgaris* L. (Sugar beet). ENV/JM/MONO(2001)11. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

765 OECD. 2002a. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. ENV/JM/MONO(2002)4.

- Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- OECD. 2002b. Module II: Herbicide biochemistry, herbicide metabolism and the residues in glufosinate-ammonium (Phosphinothricin)-tolerant transgenic plants. ENV/JM/MONO(2002)14. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 25. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 770 Padgette, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory and Technical Aspects. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 775 Salomon, S. and H. Puchta. 1998. Capture of genomic and T-DNA sequences during double-strand break repair in somatic plant cells. The EMBO Journal 17: 6086-6095.
- 780 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. The Journal of Biological Chemistry 260: 16338-16346.
- 785 Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemical and Biophysical Research Communications 94: 1207-1212.
- 790 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 43: 77-90.
- 795 The Angiosperm Phylogeny Group. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society 141: 399-436.
- 800 Thompson, C.J., N.R. Movva, R. Tizard, R. Cramer, J.E. Davies, M. Lauwereys and J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO Journal 6: 2519-2523.
- 805 U.S. EPA. 2022. Glufosinate. Human Health Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. <https://downloads.regulations.gov/EPA-HQ-OPP-2020-0498-0013/content.pdf> [Accessed February 6, 2024].
- 810 Wang, C., K.C. Glenn, C. Kessenich, E. Bell, L.A. Burzio, M.S. Koch, B. Li and A. Silvanovich. 2016. Safety assessment of dicamba mono-oxygenases that confer dicamba tolerance to various crops. Regulatory Toxicology and Pharmacology 81: 171-182.
- 815 Wang, X.-Z., B. Li, P.L. Herman and D.P. Weeks. 1997. A three-component enzyme system catalyzes the O demethylation of the herbicide dicamba in *Pseudomonas maltophilia* DI-6. Applied and Environmental Microbiology 63: 1623-1626.
- Wehrmann, A., A.V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman and A. Schulz. 1996. The similarities of *bar* and *pat* gene products make them equally applicable for plant engineers.

Nature Biotechnology 14: 1274-1278.

820 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.

Wild, A. and R. Manderscheid. 1984. The effect of phosphinothricin on the assimilation of ammonia in plants. *Zeitschrift für Naturforschung C* 39: 500-504.

825 Wohlleben, W., W. Arnold, I. Broer, D. Hillemann, E. Strauch and A. Pühler. 1988. Nucleotide sequence of the phosphinothricin *N*-acetyltransferase gene from *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 and its expression in *Nicotiana tabacum*. *Gene* 70: 25-37.

830 Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

厚生労働省 2013 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会農薬・動物用医薬品部会資料 資料 8-2 (平成 25 年 9 月 24 日開催)

835 <https://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000024087.html> [Accessed January 16, 2024]

財務省 2023 財務省貿易統計

<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed September 6, 2023]

840 田中征勝 2004 17. 特用作物 糖料作物 テンサイ (甜菜) 新編 農学大辞典 養賢堂 東京 pp. 619-620

農林水産省 2023 飼料月報 令和 4 年度 4 月～3 月 農林水産省生産局畜産部飼料課

845 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_siryō/cyosa/attach/pdf/kako-122.pdf [Accessed June 1, 2023]

850

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 参考資料 1 Sequence of Genetic Elements in PV-BVHT527462 (社外秘)
- 855 参考資料 2 Updated Bioinformatics Evaluation of CP4 EPSPS Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-814116-01-1) (社外秘)
- 参考資料 3 Updated Bioinformatics Evaluation of PAT Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-816143-01-2) (社外秘)
- 860 参考資料 4 Nature of [¹⁴C]-Dicamba Residues in/on Sugar Beet Raw Agricultural Commodities Following Pre-emergence and Post-emergence Application to Herbicide Tolerant Sugar Beet KWS20-1 (M-828263-01-1) (社外秘)
- 865 参考資料 5 Updated Bioinformatics Evaluation of DMO in Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-823018-01-1) (社外秘)
- 870 参考資料 6 Summary of Molecular Characterization of T-DNA Insertion in Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 by Southern Blot Analysis (M-811949-01-1) (社外秘)
- 875 参考資料 7 Updated Bioinformatics Evaluation of the Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Insertion Site Utilizing the BVU_2022 Database (M-823013-01-1) (社外秘)
- 880 参考資料 8 Amended Report for TRR0001005: Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS, DMO+27.1 and PAT Proteins Across 3 Generations of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 (M-820110-01-1) (社外秘)
- 885 参考資料 9 Amended Report for M-821856-01-1: Assessment of CP4 EPSPS, DMO, and PAT Protein Levels in Tissues Collected from Treated Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Produced in United States Field Trials During 2020 (M-821856-02-1) (社外秘)
- 890 参考資料 10 Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-823015-01-1) (社外秘)
- 895 参考資料 11 Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Utilizing the AD_2022, TOX_2022, and PRT_2022 Databases (M-823019-01-1) (社外秘)
- 参考資料 12 Amended Report for TRR0000674: Compositional Analyses of Herbicide-Tolerant Sugar Beet KWS20-1 Tops and Root Tissues Grown in the United States During the 2020 Season (M-820249-01-1) (社外秘)

900 参考資料 13 Determination of Tolerance Intervals from Compositional Analyses of
Sugar Beet Tops and Root from Conventional Sugar Beet Grown in the
United States in 2020 (Site Codes: IDAF, IDDO, MIGR, MNGE,
NDVA)(M-820196-01-1) (社外秘)