

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 MON94637 系統

令和 7 年 10 月 22 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	3
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	3
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	3
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	3
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
10	3 宿主に関する事項	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
15	(5) ウィ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	4
	(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
20	(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	5
4	4 ベクターに関する事項	5
	(1) 名称及び由来に関する事項	6
	(2) 性質に関する事項	6
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	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	6
30	5 挿入遺伝子に関する事項	7

35	(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	10
	(3) 構造に関する事項	11
	(4) 性質に関する事項	11
	(5) 純度に関する事項	11
	(6) コピー数に関する事項	11
	(7) 安定性に関する事項	12
40	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	12
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
45	(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	12
	6 組換え体に関する事項	12
	(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	12
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	13
50	(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	13
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	13
	(5) 宿主との差異に関する事項	13
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	13
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	14
	(8) 不活化法に関する事項	14
	(9) 外国における認可等に関する事項	14
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	14
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	14
55	7 2から6までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項	14
	IV 審議結果	14
	V 参考文献及び参考資料	14

「チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON94637 系統」に係る安全性確認

I はじめに

60 チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON94637 系統（以下「MON94637 系統」という。）について、令和 7 年 3 月 17 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つたことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行つた。

65 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 MON94637 系統

性 質：チョウ目害虫への抵抗性

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：バイエルグループ（独国）

70 MON94637 系統は、ダイズの A3555 系統に、*Bacillus thuringiensis* 由来の *cry1A.2* 遺伝子及び *B. thuringiensis* 由来の *cry1B.2* 遺伝子を導入し作成された。*cry1A.2* 遺伝子及び *cry1B.2* 遺伝子によって產生される Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質は、いずれもチョウ目害虫に特異的な殺虫活性を示す。

75 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

80 宿主は、マメ科(*Leguminosae*) ダイズ属(*Glycine*) *Soja* 亜属に属するダイズ *Glycine max* (L.) Merr. の商業品種 A3555 系統である。

MON94637 系統には、*B. thuringiensis* 由来の *cry1A.2* 遺伝子及び *B. thuringiensis* 由来の *cry1B.2* 遺伝子が導入されている。

（2）家畜等の安全な飼養経験に関する事項

85 宿主であるダイズは、優れたたん白質の供給源であり、大豆油かす等の形態で、主に育すう・成鶏用、ブロイラー用、養豚用、乳牛用及び肉牛用飼料の原料として用いられている。

（3）飼料の構成成分等に関する事項

90 MON94637 系統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。

（4）既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

95 MON94637 系統は、導入された *cry1A.2* 遺伝子及び *cry1B.2* 遺伝子により、チョウ目昆虫に対する殺虫活性を持つ。このことを除いては、既存のダイズと使用方法に相違はない。

(1)～(4)により、MON94637 系統の飼料としての安全性評価においては、既存のダイズとの比較が可能であると判断された。

100

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON94637 系統は、Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質の発現により、チョウ目昆虫に対する殺虫活性を付与する。本系統は、チョウ目害虫による被害が深刻な地域において効果的な害虫防除方法を農家に提供することを目的として作出された。

105

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

宿主は、マメ科(*Leguminosae*)ダイズ属(*Glycine*)*Soja* 亜属に属するダイズ *G. max* (L.)Merr. の商業品種 A3555 系統である。

110

(2) 遺伝的先祖に関する事項

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ている。ダイズ及びツルマメ(*Glycine soja*)は、*Soja* 亜属に属している。ツルマメは、中国、北朝鮮、韓国、日本、台湾、ロシア等に広く自生しており、細胞学的、形態学的、分子生物学的な証拠から、ダイズの祖先野生種であると考えられている (OECD, 2000)。

115

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズ種子に含有される抗栄養素として、トリプシンインヒビター、レクチン、フィチン酸、スタキオース及びラフィノースが知られている(OECD, 2012)。

120

トリプシンインヒビターは、たん白質分解酵素阻害物質であり、消化酵素であるトリプシンを不活性化し、結果として摂取したたん白質の消化を阻害する。レクチンは炭水化物含有化合物に結合するたん白質で、動物の成長を抑制する。また、血液凝集の原因となる赤血球凝集素として作用することが知られている。トリプシンインヒビター及びレクチンは、十分加熱することによって失活する。フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄、亜鉛などとキレート化合物を形成し、反芻胃動物以外の動物において、これらのミネラルの吸収を阻害することが知られている。スタキオース及びラフィノースは低分子量の炭水化物で、腸内でガスを発生させ腹部を膨満させる原因物質である(OECD, 2012)。

125

上記以外にもダイズには生理活性物質であるイソフラボン類が含まれていることが知られている(OECD, 2012)。イソフラボンは、植物エストロゲンの一種であり、哺乳動物に対してエストロゲン、抗エストロゲン及びコレステロール低下や、動物が多量に摂取した場合の生殖への悪影響が知られている (OECD, 2012)。

130

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

ダイズは種子植物であり、家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

135

(5) ウィ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、ウィルス、細菌及び糸状菌等の微生物により各種の病害が

140 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)が発生するが(OECD, 2000)、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。なお、組換え体の作出に、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。
145

(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、雑草性はないと考えられる(OECD, 2000)。

150 (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(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(OECD, 2000; Nakayama and Yamaguchi, 2002; Mizuguti *et al.*, 2009)。

160 (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(種子)、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(伊藤ら, 2010)。そのうち大豆油かすは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ている(松木ら, 2010)。

165 (9) 飼料の安全な利用に関する事項
ダイズ種子には、トリプシンインヒビター、レクチン等の有害生理活性物質が含まれているが、これらは加工段階で適切な加熱処理を施すことにより不活性化することができるため、ダイズは飼料として安全に利用されている。

170 (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、物理的又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)。

175 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項
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)。

180 4 ベクターに関する事項

185 (1) 名称及び由来に関する事項

MON94637 系統の作出に用いられた導入用プラスミド PV-GMIR527237 は、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 などを基に作成した。

185 (2) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR527237 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產生する塩基配列は含まれていない。

190 (3) 薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR527237 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 *aadA* 遺伝子が形質転換後の選抜マーカーとして T-DNA II 領域に存在している。また、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する *nptII* 遺伝子が、*E. coli* 及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 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、MON94637 系統中に *aadA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が導入されていないことは、次世代シークエンス解析により確認している。

200 (4) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR527237 には伝達を可能とする配列は含まれていない。

205 (5) 宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド PV-GMIR527237 には、①pBR322 に由来する自律増殖のための複製開始領域 *ori-pBR322* と、②pRi に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。しかし、これらの領域により導入用プラスミド PV-GMIR527237 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、MON94637 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。

210 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

MON94637 系統の作出には、導入用プラスミド PV-GMIR527237 を用いた。本導入用プラスミドは、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322などを基に作成されており、*cry1A.2* 遺伝子発現カセット及び *cry1B.2* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域並びに *aadA* 遺伝子発現カセット及び *splA* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域を有している。

210 (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

MON94637 系統は、*cry1A.2* 遺伝子発現カセット及び *cry1B.2* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA I 領域並びに *aadA* 遺伝子発現カセット及び *splA* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA II 領域をもった導入用プラスミド PV-GMIR527237 を、アグロバクテリウム法により宿主の分裂組織に導入することにより作出された。これら T-

DNA I 領域及び T-DNA II 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、T-DNA II 領域は形質転換の際の選抜マーカーとして使用されたが、MON94637 系統の育成過程で取り除かれている。

225

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。

230

表 1 MON94637 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-GMIR527237 の各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来	機能
T-DNA I 領域		
B ¹ -Right Border Region	<i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。
P ² - <i>ubq10-At1</i>	シロイヌナズナ (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ポリユビキチン遺伝子 <i>ubq10</i> のプロモーター、リーダー及びイントロン(Norris <i>et al.</i> , 1993)。植物細胞における転写を誘導する。
CS ³ - <i>cry1A.2</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Cry1Ah たん白質のドメイン I、Cry1Ac たん白質のドメイン II、Cry1Ca たん白質のドメイン III 及び Cry1Ac たん白質の C 末端ドメインから構成されるキメラ型のたん白質 Cry1A.2 をコードする配列で (GenBank accession: ON169998)、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Chen <i>et al.</i> , 2021)。
T ⁴ - <i>Zfp-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>Medicago truncatula</i>)	シンクフィンガーたん白質をコードする推定遺伝子の 3' 末端非翻訳領域の配列で (GenBank accession: ON170000)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
P- <i>Cab-Cm1</i>	メロン (<i>Cucumis melo</i>)	クロロフィル a/b (CAB) 結合たん白質のプロモーター及びリーダー配列で (GenBank accession: ON170002)、植物細胞内での転写を誘導する (Hernandez-Garcia and Finer, 2014)。

表 1 MON94637 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-GMIR527237 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来	機能
CS- <i>cry1B.2</i>	<i>B. thuringiensis</i>	Cry1Be たん白質のドメイン I 及び II、Cry1Ka2 たん白質のドメイン III 並びに Cry1Ab の C 末端ドメインから構成されるキメラ型のたん白質 Cry1B.2 をコードする配列で (GenBank accession: ON169999)、チョウ目害虫に対する抵抗性を付与する (Chen <i>et al.</i> , 2021)。
T- <i>Lox-Mt1</i>	タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>)	リポキシゲナーゼ遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で (GenBank accession: ON170001)、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Hunt, 1994)。
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
外側骨格領域 (MON94637 系統には存在しない)		
CS- <i>ble1</i>	トランスポゾン Tn5	ブレオマイシン耐性遺伝子のコード配列の一部である (Mazodier <i>et al.</i> , 1985)。
CS- <i>nptII</i>	<i>Escherichia coli</i> のトランスポゾン Tn5	ネオマイシンフォスフォトランスフェラーゼ II (NPT II) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Beck <i>et al.</i> , 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
P- <i>rrn</i>	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	リボソーム RNA オペロンプロモーター (Bautista-Zapanta <i>et al.</i> , 2002)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
OR ⁵ - <i>ori-pBR322</i>	プラスミド pBR322	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。
CS- <i>rop</i>	プラスミド ColE1	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>E. 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)。
OR- <i>ori-pRi</i>	プラスミド pRi	複製開始領域。 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 中においてベクターに自律増殖能を付与する (Ye <i>et al.</i> , 2011)。

表 1 MON94637 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-GMIR527237 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来	機能
T-DNA II 領域 (MON94637 系統には存在しない)		
B-Left Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
T-nos	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi	ノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている nos 遺伝子の 3'末端非翻訳領域の配列で、転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する (Bevan <i>et al.</i> , 1983; Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
CS-splA	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) C58 株	スクロースをフルクトース及びグルコース-1-リン酸に変換するスクロースフオスフォリラーゼをコードする <i>splA</i> 遺伝子のコード配列 (Piper <i>et al.</i> , 1999)。
P-Usp	ソラマメ (<i>Vicia faba</i>)	種子たん白質をコードする遺伝子の 5'末端非翻訳領域、プロモーター及びエンハンサー配列 (Baumlein <i>et al.</i> , 1991)。植物細胞内での恒常的な転写を誘導する。
T-E9	エンドウ (<i>Pisum sativum</i>)	リブロース-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>RbcS2</i> 遺伝子の 3'末端非翻訳領域 (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。転写の終結及び mRNA のポリアデニル化を誘導する。
<i>aadA</i>	トランスポゾン Tn7	3" (9)- <i>O</i> -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) のコード配列 (Fling <i>et al.</i> , 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。
TS ⁶ -CTP2	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	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 <i>et al.</i> , 1987; Herrmann, 1995)。目的たん白質を葉緑体へと輸送する。
P-EF-1 α	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>)	伸長因子 EF-1 α 遺伝子のプロモーター、リーダー及びイントロンで目的遺伝子の植物体内での恒常発現に関与する (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。

表1 MON94637 系統の作出に用いた導入用プラスミド PV-GMIR527237 の各構成要素の由来及び機能 (つづき)

構成要素	由来	機能
E ⁷ -FMV	Figwort Mosaic Virus (FMV) 35S RNA	エンハンサー (Richins <i>et al.</i> , 1987)。植物細胞内での転写を高める (Rogers, 2000)。
B-Right Border Region	<i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>)	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Depicker <i>et al.</i> , 1982; Zambryski <i>et al.</i> , 1982)。

¹ : B Border (境界配列)

240

² : P Promoter (プロモーター)

³ : CS Coding Sequence (コード配列)

⁴ : T Transcription Termination Sequence (転写終結配列)

⁵ : OR Origin of Replication (複製開始領域)

⁶ : TS Targeting Sequence (ターゲティング配列)

245

⁷ : E Enhancer (エンハンサー)

② 安全性に関する事項

B. thuringiensis は土壤中に遍在するグラム陽性細菌であり、ヒトや家畜等に対する病原性等を示すという報告はない。このことから、こ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た。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

255

宿主への導入は、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 A3555 系統の分裂組織を、導入用プラスミド PV-GMIR527237 を含む *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) AB30 株と共に培養することにより、形質転換を行った。

260

その後、形質転換された細胞の選抜を行うためのスペクチノマイシン及びアグロバクテリウム除去するためのカルベニシリン、セフォタキシム及びチメンチンを添加した培地で胚を培養することにより、DNA が導入された宿主を選抜した。正常な表現型を示した再分化個体から、選抜マーカー領域(T-DNA II 領域)と連鎖していない 1 コピーの T-DNA I 領域を有し、導入用プラスミドの外側骨格領域を含まない、反復配列や遺伝子配列への挿入がない、などの指標を満たす個体を選抜し、土壤に移植し R₀ 世代として生育させた。

265

R₀ 個体を自殖し得られた R₁ 世代において、T-DNA II 領域をもたず T-DNA I 領域をホモで有する 1 個体を選抜、自殖し、R₂ 世代を作出した。R₂ 世代を自殖して得られた R₃ 世代を詳細な導入遺伝子解析の対象とした。この詳細な導入遺伝子解析及び形態特性調査の結果に基づき、MON94637 系統を商品化系統として選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

275 *cry1A.2* 遺伝子発現カセットは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *ubq10-At1* プロモーターが使用されている。*cry1B.2* 遺伝子発現カセットでは、メロン (*Cucumis melo*) 由来の *Cab-Cm1* プロモーターが使用されている。*splA* 遺伝子発現カセットは、ソラマメ (*Vicia faba*) 由来の *usp* プロモーターが使用されている。*aadA* 遺伝子発現カセットは、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) 由来の *EF-1a* プロモーターが使用されている。*nptII* 遺伝子発現カセットは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) 由来の *rrn* 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

285 *cry1A.2* 遺伝子発現カセットは、タルウマゴヤシ (*Medicago truncatula*) 由来の *Zfp-Mt1* ターミネーターが使用されている。*cry1B.2* 遺伝子発現カセットは、タルウマゴヤシ (*M. truncatula*) 由来の *Lox-Mt1* ターミネーターが使用されている。*splA* 遺伝子発現カセットは、*R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) pTi 由来の *nos* ターミネーターが使用されている。*aadA* 遺伝子発現カセットは、エンドウ (*Pisum sativum*) 由来の *E9* ターミネーターが使用されている。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

290 導入用プラスミド PV-GMIR527237 の塩基配列、由来及び機能は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

(4) 性質に関する事項

cry1A.2 遺伝子及び *cry1B.2* 遺伝子

295 それぞれ Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質を発現し、どちらも Cry たん白質に属する。この Cry たん白質は、昆虫消化管の生理条件下で、結晶封入体からプロトキシン（毒前駆体）として可溶化する。プロトキシンは、消化管のたん白質分解酵素により部分的に分解され、殺虫活性をもつたん白質分解酵素耐性のコアたん白質へ変換される。コアたん白質は、昆虫の中腸上皮の細胞膜で特異的受容体へ結合し、小孔を形成することで細胞溶解を引き起こし、その結果として消化管組織に損傷を与え殺虫活性を示す。これまで Cry たん白質に対する特異的受容体は昆虫及び線虫以外からは同定されていない。Cry1A.2 たん白質と Cry1B.2 たん白質のいずれも、チョウ目昆虫のみに殺虫活性を示すことを確認した。

(5) 純度に関する事項

塩基配列解析により、T-DNA I 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。

(6) コピー数に関する事項

310 次世代シークエンス解析並びに導入遺伝子領域の PCR 及び塩基配列解析を行つ

た結果、MON94637 系統のゲノム中には、T-DNA I 領域が 1 コピー挿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-GMIR527237 に由来する非意図的な配列が存在しないこと、導入用プラスミド PV-GMIR527237 の T-DNA I 領域の各構成要素の塩基配列が同一であること及び、導入遺伝子が既知のダイズ内在性遺伝子を破壊していないことが確認された。

(7) 安定性に関する事項

MON94637 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、5 世代の種子から抽出したゲノム DNA を用いて次世代シークエンス解析を行った。その結果、全ての世代において導入遺伝子に起因する 2 つの接合領域のみが検出され、その接合領域の配列は全ての供試世代で一致していた。したがって、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。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON94637 系統における Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質の発現量を、花、地上部、種子、葉、根を用いて、ELISA 法により測定した。その結果、Cry1A.2 たん白質は全てにおいて発現しており、特に花と葉において、高い発現量が確認された。一方、Cry1B.2 たん白質は、花、地上部、種子、葉において発現しており、特に葉において、最も高い発現量が確認された。

(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 PV-GMIR527237 には、トランスポゾン Tn7 由来の *aadA* 遺伝子が T-DNA II 領域に存在しており、これは、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) をコードしている。また、*E. coli* のトランスポゾン Tn5 に由来する *nptII* 遺伝子が外骨格領域に存在しており、これは、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与するネオマイシンfosfotransferrase II (NPT II) をコードしている。

なお、MON94637 系統中に *aadA* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子が導入されていないことを次世代シークエンス解析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

MON94637 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けるオープンリーディングフレーム (ORF) を調べるため、6 フレームで ORF を検索した。その結果 9 個の ORF が検出されたが、これらの ORF について、既知の毒性たん白質と相同性は認められなかった。

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

MON94637 系統に導入された *cry1A.2* 遺伝子及び *cry1B.2* 遺伝子はそれぞ

Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質を発現し、チョウ目害虫抵抗性を付与する。この点を除けば、MON94637 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。

355

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

MON94637 系統の Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質と、既知の毒性たん白質との相同性を確認するため、TOX_2023 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。その結果、360 Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質において相同性を示す配列は確認されなかつた。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

365 発現する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、人工胃液（ペプシン）処理、人工腸液（パンクレアチン）処理及び加熱処理を行った。Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質は少量であるため、試験に供試する十分量を精製できないことから、*B. thuringiensis* で発現させた Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質を試験に供試した。その結果、Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質は、370 人工胃液（ペプシン）処理では、0.5 分以内に検出限界値以下まで消化され、人工腸液（パンクレアチン）処理においては、5 分以内に検出限界値以下まで消化された。また、加熱処理においては、75°C、15 分以上で失活することが確認された。なお、*B. thuringiensis* で発現させた Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質は、MON94637 系統中で発現する Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質と同等であることを確認済みである。

375

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

Cry1A.2 たん白質及び Cry1B.2 たん白質が、何らかの酵素活性をもつという報告はない。したがって、MON94637 系統がこれらのたん白質の発現により、新しい代謝経路及び代謝産物を作ることは考えにくい。

380

(5) 宿主との差異に関する事項

MON94637 系統及び宿主の非組換えダイズの種子及び地上部について、粗たん白質及びアミノ酸、粗脂肪及び脂肪酸、炭水化物及び纖維質、灰分及び無機質、ビタミン類、抗栄養素及びイソフラボン類の分析を行ったところ、種子及び地上部の栄養素の項目には統計学的有意差が認められたものがあったが、MON94637 系統の平均値はいずれも AFSI データベースのダイズ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ダイズの変動の範囲内であった。これらの相違が安全性に影響を与えているとは考えられない。

390

(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圃場試験において、MON94637 系統と非組換えダイズとの間に、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。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

395 MON94637 系統と非組換えダイズにおいて、生存及び増殖能力の制限要因に関する変わりはない。

(8) 不活化法に関する事項

400 MON94637 系統も従来のダイズと同様に、物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の使用）など、ダイズを枯死させる従来の方法で不活化される。

(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	承認
米国農務省	環境	2022年12月	(申請中)
カナダ保健省	食品	2023年4月	2024年10月
カナダ食品検査庁	環境・飼料	2023年4月	2024年10月
米国食品医薬品庁	食品・飼料	2023年8月	2024年11月
欧州食品安全機関	食品・飼料及び輸入	2024年1月	(申請中)
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7月	(申請中)

405

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

従来のダイズと相違ない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

410

従来のダイズと相違はない。

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。

415

IV 審議結果

チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON94637 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ないと判断した。

420

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- AFSI. 2022. Crop Composition Database, Version 9.0. Agriculture & Food Systems Institute, 425 Washington, D.C. <https://www.cropcomposition.org/> [Accessed Februrary 22, 2022].
- Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 α molecular cloning characterization and expression. Molecular and General Genetics 219: 106-112. 430
- 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. Plant Molecular Biology 2: 335-350.
- Baumlein, H., W. Boerjan, I. Nagy, R. Bassuner, M. Van Montagu, D. Inze and U. Wobus. 1991. 435 A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. Mol Gen Genet 225: 459-467.
- Bautista-Zapanta, J.-n., K. Suzuki and K. Yoshida. 2002. Characterization of four ribosomal RNA operons in the genome of *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001. Nucleic Acids 440 Research Supplement (2): 91-92.
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene 19: 327- 445 336.
- Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. Nucleic Acids Research 11: 369-385.
- Bravo, A., I. Gómez, H. Porta, B.I. García-Gómez, C. Rodriguez-Almazan, L. Pardo and M. Soberón. 2013. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. Microbial Biotechnology 6: 17-26. 450
- Cade, R., K. Burgin, K. Schilling, T.-J. Lee, P. Ngam, N. Devitt and D. Fajardo. 2018. Evaluation of whole genome sequencing and an insertion site characterization method for molecular 455 characterization of GM maize. Journal of Regulatory Science 6(1):1-14.
- Chen, D., W.J. Moar, A. Jerga, A. Gowda, J.S. Milligan, E.C. Bretsnyder, T.J. Rydel, J.A. Baum, A. Semeao, X. Fu, V. Guzov, K. Gabbert, G.P. Head and J.A. Haas. 2021. *Bacillus thuringiensis* 460 chimeric proteins Cry1A.2 and Cry1B.2 to control soybean lepidopteran pests: New domain combinations enhance insecticidal spectrum of activity and novel receptor contributions. PloS one 16: e0249150.

- 465 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 470 de Maagd, R.A., A. Bravo and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics* 17: 193-199.
- 475 Deist, B.R., M.A. Rausch, M.T. Fernandez-Luna, M.J. Adang and B.C. Bonning. 2014. Bt toxin modification for enhanced efficacy. *Toxins (Basel)* 6: 3005-3027.
- 480 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.
- 485 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.
- 490 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. Hoffmann 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.
- 495 Gao, Y., K.J. Fencil, X. Xu, D.A. Schwedler, J.R. Gilbert and R.A. Herman. 2006. Purification and characterization of a chimeric Cry1F δ-endotoxin expressed in transgenic cotton plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 829-835.
- 500 Gill, S.S., E.A. Cowles and P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action for *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology* 37: 615-636.
- 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.
- 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.
- Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Hunt, A.G. 1994. Messenger RNA 3' end formation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 45: 47-60.

- 505 Hymowitz, T. and F.I. Collins. 1974. Variability of sugar content in seed of *Glycine max* (L.) Merrill and G. *soja* Sieb. and Zucc. Agron. J. 66: 239-240.
- 510 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.
- 515 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. Padgette 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.
- 520 Langmead, B. and S.L. Salzberg. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nature Methods 9: 357-359.
- 525 Mazodier, P., P. Cossart, E. Giraud and F. Gasser. 1985. Completion of the nucleotide sequence of the central region of Tn 5 confirms the presence of three resistance genes. Nucleic Acids Research 13: 195-205.
- 530 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.
- 535 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.
- 540 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.
- Norris, S.R., S.E. Meyer and J. Callis. 1993. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. Plant Molecular Biology 21: 895-906.
- 545 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.
- 550 OECD. 2007. Consensus document on safety information on transgenic plants expressing *Bacillus thuringiensis*-derived insect control proteins. ENV/JM/MONO(2007)14. Series on

Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 42. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.

- 550 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. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25.
- 555 Piper, K.R., S. Beck Von Bodman, I. Hwang and S.K. Farrand. 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol Microbiol* 32: 1077-1089.
- 560 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.
- 565 Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
- 570 Robinson, J.T., H. Thorvaldsdóttir, W. Winckler, M. Guttman, E.S. Lander, G. Getz and J.P. Mesirov. 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* 29: 24-26.
- 575 Rogers, S.G. 2000. Promoter for transgenic plants. Patent 6,018,100, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 580 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.
- 585 Sanahuja, G., R. Banakar, R.M. Twyman, T. Capell and P. Christou. 2011. *Bacillus thuringiensis*: A century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal* 9: 283-300.
- Schnepp, 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.
- 580 Sutcliffe, J.G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. Pages 77-90 in Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Cold Spring Harbor, New York.
- 585 Vachon, V., R. Laprade and J.-L. Schwartz. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 1-12.

- 590 Wang, C., W. Li, C.R. Kessenich, J.S. Petrick, T.J. Rydel, E.J. Sturman, T.C. Lee, K.C. Glenn and T.C. Edrington. 2018. Safety of the *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1A.105 protein: Evidence that domain exchange preserves mode of action and safety. *Regul Toxicol Pharmacol* 99: 50-60.
- 595 Wang, Y., J. Wang, X. Fu, J.R. Nageotte, J. Silverman, E.C. Bretsnyder, D. Chen, T.J. Rydel, G.J. Bean, K.S. Li, E. Kraft, A. Gowda, A. Nance, R.G. Moore, M.J. Pleau, J.S. Milligan, H.M. Anderson, P. Asiimwe, A. Evans, W.J. Moar, S. Martinelli, G.P. Head, J.A. Haas, J.A. Baum, F. Yang, D.L. Kerns and A. Jerga. 2019. *Bacillus thuringiensis* Cry1Da_7 and Cry1B.868 Protein Interactions with Novel Receptors Allow Control of Resistant Fall Armyworms, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Applied and Environmental Microbiology* 85: e00579-00519.
- 600 Ye, X., E.J. Williams, J. Shen, S. Johnson, B. Lowe, S. Radke, S. Strickland, J.A. Esser, M.W. Petersen and L.A. Gilbertson. 2011. Enhanced production of single copy backbone-free transgenic plants in multiple crop species using binary vectors with a pRi replication origin in *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Res* 20: 773-786.
- 605 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.
- 610 伊藤博史・松木順子・石橋晃 2010 飼料学(66)-II マメ類 1 大豆- 畜産の研究 養賢堂 64(66): 650-656
- 615 財務省. 2024. 財務省貿易統計 <https://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed May 22, 2024].
- 620 食品安全委員会 2016 遺伝子組換え食品等評価書 チョウ目害虫抵抗性ダイズ MON87751 系統 評価結果通知日 2016年8月30日 <http://www.fsc.go.jp/fsciis/attachedFile/download?retrievalId=kya20160419015&fileId=201>
- 農林水産省. 2024. 飼料月報(概要) 令和5年度4月～3月. 農林水産省畜産局飼料課. https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/cyosa/attach/pdf/kako-226.pdf.
- 625 松木順子・伊藤博史・熊倉克元・石橋晃 2010 飼料学(65)-II マメ類 1 大豆- 畜産の研究 養賢堂 64(65): 541-546

参考資料(申請者提出 社外秘)

1. Sequence of Genetic Elements in PV-GMIR527237 (社外秘)
2. Updated Bioinformatics Evaluation of Cry1A.2 and Cry1B.2 in MON 94637 Utilizing the

- 630 AD_2023, TOX_2023, and PRT_2023 Databases (M-835406-01-1) (社外秘)
3. Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Cry1A.2 Against a Range of Invertebrate Taxa (M-832098-01-1) (社外秘)
 4. Preliminary Information to Characterize the Activity Spectrum of Cry1B.2 Against a Range of Invertebrate Taxa (M-832101-01-1) (社外秘)
- 635 5. Molecular Characterization of Insect-Protected Soybean MON 94637 (M-815737-01-1) (社外秘)
6. Updated Bioinformatics Evaluation of the MON 94637 Insertion Site Utilizing the GMA_2023 Database (M-835409-01-1) (社外秘)
 7. Amended Report for SCR-2022-0316: Assessment of Cry1A.2 and Cry1B.2 Protein Levels in Soybean Flower, Forage, Grain, Over Season Leaf 1 (OSL1), and Root Tissues Collected from MON 94637 Produced in United States Field Trials in 2021 (M-824045-02-1) (社外秘)
 - 640 8. Updated Bioinformatics Evaluation of Putative Flank-Junction Peptides in MON 94637 Utilizing the AD_2023, TOX_2023, and PRT_2023 Databases (M-835404-01-1) (社外秘)
 9. Updated Bioinformatics Evaluation of the T-DNA in MON 94637 Utilizing the AD_2023, 645 TOX_2023, and PRT_2023 Databases (M-835402-01-1) (社外秘)
 10. Characterization of the Cry1A.2 Protein Purified from the Seed of MON 94637 Soybean and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Produced Cry1A.2 Proteins (M-830877-01-1) (社外秘)
- 650 11. Characterization of the Cry1B.2 Protein Purified from the Seed of MON 94637 Soybean and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the Plant-Produced and *Bacillus thuringiensis* (Bt)-Produced Cry1B.2 Proteins (M-830878-01-1) (社外秘)
12. Assessment of the in vitro Digestibility of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1A.2 by Pepsin and Pancreatin (M-827971-06-1) (社外秘)
- 655 13. Assessment of the in vitro Digestibility of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1B.2 by Pepsin and Pancreatin (M-827969-02-1) (社外秘)
14. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1A.2 Protein (M-827773-01-1) (社外秘)
 15. The Effect of Heat Treatment on the Functional Activity of *Bacillus thuringiensis*-produced Cry1B.2 Protein (M-827770-01-1) (社外秘)
- 660 16. Compositional Analyses of Soybean Grain and Forage Harvested from MON 94637 Grown in the United States During the 2021 Season (REG-2021-0346) (社外秘)
17. Analyses of B Vitamins and Minerals of Soybean Grain from MON 94637 Grown in the United States in 2021 (M-825596-01-1) (社外秘)