組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ DBN9004 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 5
（５）ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項 5
（６）自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項 5
（７）有性生殖周期及び交雑性に関する事項 5
（８）飼料に利用された歴史に関する事項 5
（９）飼料の安全な利用に関する事項 5
（10）生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項 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　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 6
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 8
（３）構造に関する事項 9
（４）性質に関する事項 9
（５）純度に関する事項 １０
（６）コピー数に関する事項 １０
（７）安定性に関する事項 １０
（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項 １１
（９）抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 １１

（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..... １１
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..... １２
（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..... １２
（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..... １４
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項..... １４
（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..... １５
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..... １５
IV　審議結果..... １５
V　参考文献及び参考資料..... １５

「除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ DBN9004 系統」
に係る安全性確認

I　はじめに

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ DBN9004 系統（以下「DBN9004 系統」という。）について、令和５年９月 28 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

II　確認対象飼料の概要

飼料名　　：除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ DBN9004 系統
性　質　　：除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性
申請者　　：Beijing DaBeiNong Biotechnology Co., Ltd.
開発者　　：Beijing DaBeiNong Biotechnology Co., Ltd.

DBN9004 系統は、除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を付与するために改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を導入したダイズである。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び *pat* 遺伝子の供与体は、それぞれグラム陰性細菌の一種である *Rhizobium radiobacter* CP4 株及び *Streptomyces viridochromogenes* であり、改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS たん白質が除草剤グリホサートを除草活性のない化合物に変換し、*pat* 遺伝子によって産生される PAT たん白質が除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することで、植物に除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性を付与する。

このことにより、ダイズ栽培における雑草防除を効率的に行うことを目的としている。

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

DBN9004 系統の宿主は、マメ科ダイズ属 *Soja* 亜属に属するダイズ *Glycine max* (L.) Merr.の商業品種 Jack である。

DBN9004 系統には、除草剤グリホサート耐性を付与する *Rhizobium radiobacter* CP4 株由来の改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び除草剤グルホシネートへの耐性を付与する *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 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

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

DBN9004 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（AFSI, 2023）。

（４）既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

DBN9004 系統に導入されたのは、改変 *cp4* 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットのみである。DBN9004 系統は、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質の発現により、除草剤グリホネート及び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、DBN9004 系統は既存のダイズと使用方法に差異はない。

以上（１）～（４）により、DBN9004 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。

２　組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

DBN9004 系統は、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質により、除草剤グリホサート及びグルホシネートに対する耐性が付与し、栽培の過程で効率的に雑草防除を行うことを目的として作成された。

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

DBN9004 系統の宿主は、マメ科ダイズ属 *Soja* 亜属に属するダイズ *Glycine max* (L.) Merr.の商業品種 Jack である。

（２）遺伝的先祖に関する事項

ダイズは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）。

（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、消化酵素であるトリプシンを不活化し、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、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、加熱により失活する。また、フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、カリウム、鉄、亜鉛等とキレート化合物を形成し、反芻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（OECD, 2012）。

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）が、ダイズは長い食経験の中で、これまでに内

在性の有害生理活性物質によりヒトや家畜等の健康に影響を及ぼしたという報告はない（OECD, 2001）。

（４）寄生性及び定着性に関する事項

ダイズは種子植物であり、家畜等に対する寄生性及び定着性は知られていない。

（５）ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

ダイズには、ウイルス、細菌及び糸状菌による各種病害（ダイズモザイク病、葉焼病、紫斑病等）が知られているが（OECD, 2000）、これら病原菌は、ヒトや家畜等への病原性を持たない。

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。

（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）。

（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（Mizuguti et al., 2010; OECD, 2000）。

（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。そのうち大豆油かすは飼料原料として古くから使用されており、各家畜の飼料に広く使用されている（伊藤ら, 2010; 松木ら, 2010）。

（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、ダイズは飼料として安全に利用されている。

（10）生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

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）。

（11）近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズの近縁種であるツルマメは、ダイズと同様に、トリプシンインヒビター、

ラフィノース、スタキオース、フィチン酸等の有害生理活性物質を含むことが報告されている（Hymowitz and Collins, 1974; Natarajan et al., 2007; Raboy and Dickinson, 1993）。

4　ベクターに関する事項

（1）名称及び由来に関する事項

DBN9004 系統の作出に用いた導入用プラスミド pDBN4003 は、[redacted] 由来のバイナリーベクター12000（Beijing DaBeiNong Biotechnology Co., Ltd.が独自に作製）を基に作製された。

（2）性質に関する事項

導入用プラスミド pDBN4003 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(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。

（3）薬剤耐性に関する事項

導入用プラスミド pDBN4003 は、大腸菌に由来しスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する *SpeC* 遺伝子を有しているが、*SpeC* 遺伝子は外側骨格領域に存在し、DBN9004 系統には導入されていないことが、導入用プラスミド pDBN4003 の外側骨格領域をプローブとして行ったサザンブロット分析によって確認されている。

（4）伝達性に関する事項

導入用プラスミド pDBN4003 は、伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

（5）宿主依存性に関する事項

導入用プラスミド pDBN4003 に含まれる全ての構成要素の性質は明らかにされており、植物や動物での複製を可能とする配列を含まない。

（6）発現ベクターの作成方法に関する事項

DBN9004 系統の作出に用いられた導入用プラスミド pDBN4003 は、[redacted] 由来のバイナリーベクター12000 を基に作製した。

導入用プラスミド pDBN4003 は、外側骨格領域（C-*Spe*C、C-*Vir*G、C-*RepA*、O-*VS1*、O-*COLE*）及び境界配列（B-Right Border region 及び B-Left Border region）により構成される中間プラスミドのマルチクローニングサイトに T-DNA 領域を挿入することにより構築された。

（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

DBN9004 系統ダイズは、改変 *cp4epsps* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により従来ダイズ品種 Jack

の子葉節へ導入することにより作出している。

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1に、導入された遺伝子の名称、その由来及び機能を示す。

表1　DBN9004 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能

構成要素	由来	機能
T-DNA 領域		
B-Right Border region	*Rhizobium radiobacter*	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む配列（Yadav *et al.*, 1982）。
P-Gm17g*Tsf1*	ダイズ（*Glycine max*）	ダイズ（*Glycine max*）*tefS1* 遺伝子由来の eEF-1α ポリペプチドプロモーター（Aguilar *et al.*, 1991）。
SP-At*CTP2*	シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana*）	葉緑体輸送ペプチドをコードする *ShkG* 遺伝子の配列で、改変 CP4 EPSPS たん白質を葉緑体へ輸送する（Klee *et al.*, 1987）。
C-改変 *cp4 epsps*	*R. radiobacter* CP4 株	5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子のコドンを改変したコード配列（Barry *et al.*, 1997）で除草剤グリホサート耐性を付与する。
T-Ps*E9*	エンドウ（*Pisum sativum*）	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 RbcS2 をコードする *E9* 遺伝子の 3’末端非翻訳領域（Coruzzi *et al.*, 1984）
P-*35S*	Cauliflower mosaic virus (CaMV)	プロモーター配列（Odell *et al.*, 1985）で植物において *pat* 遺伝子を発現させる。
C-*pat*	*Streptomyces viridochromogenes*	ホスフィノスリシン・アセチルトランスフェラーゼ（*pat*）遺伝子を植物での発現を高めるためにコドンを最適化した遺伝子で、除草剤グルホシネートへの耐性を付与する（Wohlleben *et al.*, 1988）。
T-*35S*	*CaMV*	ターミネーター配列。mRNA のポリアデニル化を誘導する（Franck *et al.*, 1980; Pietrzak *et al.*, 1986）。
B-Left Border region	*R. radiobacter*	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む配列（Yadav *et al.*, 1982）。

表１　DBN9004 系統の作出に用いた導入用プラスミドの各構成要素の由来及び機能（つづき）

構成要素	由来	機能
外側骨格領域（DBN9004 系統には存在しない）		
C-*SpeC*	*Escherichia coli*	アミノグリコシド 3'-アデニルトランスフェラーゼをコードする *aadA* 遺伝子のコード配列 (Fling *et al.*, 1985)。プラスミドが導入された菌体の選抜マーカーとして機能する。
C-*VirG*	*R. radiobacter*	二成分制御系 vir レギュロンの一部で (Pazour *et al.*, 1992)、アグロバクテリウムから植物への T-DNA 領域の導入を制御する。
C-*RepA*	*Pseudomonas aeruginosa*	複製たん白質 RepA をコードする複製開始領域。細菌中でプラスミドの複製を促進する (Itoh *et al.*, 1984)。
O-*VS1*	*P. aeruginosa*	プラスミド pVS1 に由来する複製開始のコンセンサス配列と分配領域で (Itoh *et al.*, 1984)、アグロバクテリウム中においてベクターに自律増殖能を付与する。
O-*COLE*	*E. coli*	複製開始領域であり、*E coli* 中でプラスミドの複製を開始させる (Itoh and Tomizawa, 1979; Yanisch-Perron *et al.*, 1985)。

注：B – Border (境界配列); T – Terminator (ターミネーター); C – Coding sequence (コード配列); P – Promoter (プロモーター); SP – Signalling Peptide (シグナルペプチド); O – Origin of replication (複製開始領域)。

② 安全性に関する事項

改変 *cp4epsps* 遺伝子の供与体である *R. radiobacter* CP4 株は、土壌中に遍在するグラム陰性細菌である。*R. radiobacter* が、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。

pat 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、グラム陽性の放線菌で、多くは好気性で土壌中に棲息する。これまでに多くの遺伝子組換え植物で *S. viridochromogenes* 由来の pat 遺伝子が利用されているが、遺伝子供与体（*S. viridochromogenes*）、遺伝子（*pat* 遺伝子）及び遺伝子産物（PAT たん白質）のいずれも安全上の懸念はないとされている (Herouet et al., 2005)。

（２）遺伝子の挿入方法に関する事項

導入用プラスミド pDBN4003 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、宿主であるダイズ品種 Jack の子葉節へ導入した。その後、形質転換後の子葉節を

除草剤グリホサートを含む培地上で再分化させて T_0 世代の植物体を得た。T_0 世代から自殖により得られた T_1 世代において、ddPCR (Droplet Digital PCR) 法により、導入遺伝子をホモ接合体で有する個体を選抜した。その後、自殖を繰り返し、T_{12} 世代まで作出した。

今回、飼料としての安全性を確認する DBN9004 系統は T_5 世代及び T_5 世代から派生する全ての後代交配種である。

（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、Gm17g*Tsf1* プロモーターによりその発現が制御されている。Gm17g*Tsf1* プロモーターは、ダイズ（*G. max*）由来の *tefS1* 遺伝子のプロモーター領域で、恒常的な発現を誘導する（Aguilar *et al.*, 1991）。

pat 遺伝子発現カセットは、*35S* プロモーターによりその発現が制御されている。*35S*プロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S RNA 遺伝子のプロモーター領域で、恒常的な発現を誘導する（Coutu *et al.*, 2007; Kay *et al.*, 1987）。

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のターミネーターは、エンドウ（*Pisum sativum*）のリブロース-1, 5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット RbcS2 をコードする E9 遺伝子のターミネーターである（Coruzzi *et al.*, 1984）。

pat 遺伝子発現カセットのターミネーターは、Cauliflower mosaic virus (CaMV) 由来の 35S RNA 遺伝子のターミネーターである（Franck *et al.*, 1980; Pietrzak *et al.*, 1986）。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入プラスミド pDBN4003 の各構成要素の機能は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

以下に各遺伝子の機能を示す。

① 改変 *cp4epsps* 遺伝子の機能

改変 *cp4epsps* 遺伝子は、植物体内で改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する。改変 CP4 EPSPS たん白質は、*R. radiobacter* CP4 株由来の CP4 EPSPS たん白質の N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに置換している。

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（OECD, 1999a）。一方、組換えダイズで産生される改変 CP4 EPSPS たん白質は、除草剤グリホサートに対する親和性が低く、グリホサート存在下において活性阻害

を受けないため、本組換えダイズ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-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化し、N-アセチル- L-グルホシネートに変換して無毒化することで、グルホシネートに対する耐性を植物体に付与する。グルホシネートは、活性成分 L-グルホシネート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（OECD, 1999b)。

（5）純度に関する事項

抗生物質耐性マーカーによる選抜や塩基配列の解析により、発現ベクター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

DBN9004 系統における導入遺伝子のコピー数を調べるために、DBN9004 系統の葉及び宿主であるダイズ品種 Jack の葉から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理し、導入用プラスミド pDBN4003 の T-DNA 領域にまたがる 6 種類のプローブを用いたサザンブロット分析を行った。その結果、DBN9004 系統には T-DNA 配列（改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び *pat* 遺伝子を含む）が 1 コピー導入されていることが示された。また、導入用プラスミド pDBN4003 の外側骨格領域にまたがる 5 種類のプローブを用いたサザンブロット分析を行ったところ、外側骨格配列は検出されず、DBN9004 系統に導入用プラスミド pDBN4003 の外側骨格配列は導入されていないことが確認された(参考資料 5)。

さらに、DBN9004 系統の葉から抽出した DNA のうち T-DNA 領域及び近傍配列を PCR 増幅し、その塩基配列をサンガー法で解析した。得られた 5’末端及び 3’末端近傍配列とレファレンスとして用いたダイズゲノム（品種 Williams 82）の塩基配列を比較した結果、1 コピーの T-DNA 領域が第 13 番染色体上に挿入されたことが確認された（参考資料 6)。

T-DNA の挿入個所においてダイズ内在性の既知の遺伝子は存在しないが、T-DNA の挿入部位から最も近い *Gm13G15900* 遺伝子に対し DBN9004 系統及び対照の非組換えダイズを用いて qRT-PCR を行ったところ、異なる生育ステージでの各組織における相対的な発現量について、DBN9004 系統と対照の非組換えダイズの間に差は認められなかった。

以上の結果から、DBN9004 系統の挿入遺伝子によるダイズの内在性の既知の遺伝子の破壊の可能性は考えにくいことが示された。

（7）安定性に関する事項

DBN9004 系統に挿入された遺伝子の複数世代にわたる安定性を、サザンブロット分析及び ELISA 法を用いて確認した。

① サザンブロット分析

DBN9004 系統の複数世代（T_3、T_5 及び T_7 世代）の葉並びに宿主であるダイズ品種 Jack の葉から抽出したゲノム DNA を制限酵素処理し、導入用プラスミド pDBN4003 の T-DNA 領域にまたがる 6 種類のプローブを用いたサザンブロット分析を行った。その結果、DBN9004 系統の 3 世代及び宿主であるダイズ品種 Jack の全てで予想に対応するサイズのバンドが得られた（ただし、宿主品種である Jack は、プローブにダイズ由来の配列が含まれる場合のみ検出）（参考資料 5)。

② ELISA 法

２つの生育段階における根、茎及び葉並びに１つの生育段階における花及び種子から DBN9004 系統（T_4、T_5 及び T_6 世代）及び対照の非組換えダイズ Jack の改変 EPSPS たん白質及び PAT たん白質を抽出し、ELISA 法を用いて測定した。その結果、DBN9004 系統（T_4、T_5 及び T_6 世代）のすべての組織で改変 EPSPS たん白質及び PAT たん白質の発現が確認された（参考資料 8)。

以上の結果から、DBN9004 系統の導入遺伝子が、複数世代にわたり安定して発現していることが示された。

（８）発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

2020 年に中国の 5 ヵ所の圃場において、それぞれ 5 反復で生育した DBN9004 系統の葉、根、地上部及び種子における改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質の発現量を ELISA 法により分析した（参考資料 9)。

測定の結果、いずれのたん白質も分析を行ったすべての組織において発現が確認された。

（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 pDBN4003 の外側骨格領域には、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 *SpeC* 遺伝子が含まれている。*SpeC* 遺伝子は導入用プラスミド pDBN4003 を構築する際に選抜マーカーとして用いられた。

なお、DBN9004 系統のゲノム中に *SpeC* 遺伝子が挿入されていないことは、導入用プラスミド pDBN4003 の外側骨格領域をプローブとして行ったサザンブロット分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

DBN9004 系統中の導入遺伝子(4,799 bp)とその 5'末端側境界配列(992 bp) 及び 3'末端側境界配列 (1268 bp)の計 7059 bp の配列において、終止コドン (TAG、TAA 及び TGA) から終止コドンまでの配列を、閾値を設定せずに 6 フレーム全てについて検索したところ、第 13 番染色体上における導入遺伝子の 5'及び 3'末端

側近傍配列に 12 個のオープンリーディングフレーム（ORF）が確認された（参考資料 10)。確認された 12 個の ORF について、既知の毒性たん白質との相同性検索を行った結果、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

DBN9004 系統では、導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子及び *pat* 遺伝子によって改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質を発現し、除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートに耐性の形質を有する。これらの点を除けば、DBN9004 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ダイズと変わらない。

（2）遺伝子産物の毒性に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT 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、毒素データベース ToxDB 上で E-value<10^{-5} を閾値として BLASTP 検索を行った。検索の結果、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT 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（参考資料 3、参考資料 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

DBN9004 系統において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、以下の①～③を検討した。

なお、試験には *E. coli* 由来の改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質を用いた。*E. coli* 由来及び DBN9004 系統由来の改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質の同等性は、機能活性、分子量（SDS-PAGE）、免疫応答性（ウエスタンブロット分析）及びアミノ酸配列解析（LC-MS/MS）並びにグリコシル化状態により確認されている（参考資料 11～16)。

① 人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理

E. coli 由来の改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質について、それぞれ人工胃液（ペプシン、pH1.2）中での消化性を SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（参考資料 17、参考資料 18)。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質はいずれも人工胃液中で 15 秒以内に消化されることが確認された。

② 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

E. coli 由来の改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質について、それぞれ人工腸液（パンクレアチン、pH7.5）中での消化性を SDS-PAGE 法及びウエスタンブロット分析により評価した（参考資料 19、参考資料 20)。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質はいずれも人工腸液中で 15 秒以

内に消化されることが確認された。

以上の結果から、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質は、人工胃液及び人工腸液による酸・アルカリ処理並びに酵素（ペプシン及びパンクレアチン）処理に対する感受性をもつことが示された。

③ 加熱処理

E. coli 由来の改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質の加熱処理に対する熱感受性を、免疫反応活性及び酵素活性を評価した（参考資料 21、参考資料 22)。その結果、改変 CP4 EPSPS たん白質の活性は 75ºC、30 分の加熱処理で、PAT たん白質の活性は 55ºC、30 分の加熱処理で検出限界以下となった。

以上の結果から、改変 CP4 EPSPS たん白質及び PAT たん白質は、加熱処理により免疫反応性及び酵素活性を失うことが示された。

（4）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

改変 CP4 EPSPS たん白質と機能的に同一である EPSPS たん白質は、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であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS たん白質の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（Padgette *et al.*, 1996; Ridley *et al.*, 2002)。また、EPSPS たん白質は、基質であるホスホエノールピルビン酸塩とシキミ酸-3-リン酸塩（以下、「S3P」とする）と特異的に反応することが知られており（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。EPSPS たん白質のシキミ酸との反応特異性は、EPSPS たん白質の S3P との反応特異性の約 200 万分の 1 に過ぎず（Gruys *et al.*, 1992)、シキミ酸が EPSPS たん白質の基質として反応する可能性は極めて低い。

以上のことから、改変 CP4 EPSPS たん白質が宿主の代謝系を変化させることはないと考えられる。

PAT たん白質は、L-グルホシネートをアセチル化し、植物に対して毒性がない化合物である N-アセチル-L-グルホシネート（2-アセトアミド-4-メチルホスフィニコ-ブタン酸）に迅速に変換する酵素である。PAT たん白質は、L-グルホシネートの構造類似体である L-グルタミン酸やその他の L-アミノ酸に対してアセチル基を転移することはなく、20 種のそれぞれのアミノ酸存在下においても L-グルホシネートへのアセチル基転移反応の阻害は認められなかった（Wehrmann *et al.*, 1996)。

このことから、PAT たん白質は、グルホシネートの有効成分である L-ホスフィノスリシンに対して高い基質特異性を有しており（Thompson *et al.*, 1987; Wehrmann *et al.*, 1996)、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。

（5）宿主との差異に関する事項

DBN9004 系統と対照の非組換えダイズとの構成成分の同等性を評価するため、中国の 8 カ所のほ場において栽培した DBN9004 系統及び対照の非組換えダイズの種子について、一般成分、無機物、脂肪酸、ビタミン、アミノ酸、栄養阻害物質等の分析を行った（参考資料 23)。その結果、脂肪酸組成の項目に統計学的有意差が認められたものがあったが、DBN9004 系統の平均値はいずれも参考品種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。

（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、DBN9004 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

DBN9004 系統の生存・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

DBN9004 系統は、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、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　諸外国における承認状況

申請国	飼料	食品	環境
中国	MARA※1 承認 (2020 年 6 月)	MARA 承認 (2020 年 6 月)	MARA 承認 (2020 年 12 月)
アルゼンチン	-	-	MAGyP※2 承認 (2019 年 2 月)
ウルグアイ	-	-	National Biosafety Cabinet of Uruguay 審査中
欧州	EFSA※3 審査中	-	-

※１　中華人民共和国農業農村部

※２　アルゼンチン農牧漁業省

※３　欧州食品安全機関

（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項

DBN9004 系統は、生育期に雑草防除のために除草剤グリホサート及び除草剤グルホシネートを使用できることを除いて、栽培方法は従来のダイズ品種と相違はない。

（11）種子の製法及び管理方法に関する事項

DBN9004 系統の種子の製法及び管理方法は従来の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

除草剤グリホサート及びグルホシネート耐性ダイズ DBN9004 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断した。

V　参考文献及び参考資料

参考文献

AFSI. 2023. Crop Composition Database, Version 9.1 http://www.cropcomposition.org (Accessed March 2).

Aguilar, F., P. E. Montandon & E. Stutz. 1991. Two genes encoding the soybean translation elongation factor eEF-1 alpha are transcribed in seedling leaves. *Plant Mol Biol,* 17**,** 351-60.

Barry, G. F., G. M. Kishore, S. R. Padgette & W. C. Stallings. 1997. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. U.S. Patent, 5633435.

Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards & 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.

Coutu, C., J. Brandle, D. Brown, K. Brown, B. Miki, J. Simmonds & D. D. Hegedus. 2007. pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Research,* 16**,** 771-781.

Fling, M. E., J. Kopf & 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.

Franck, A., H. Guilley, G. Jonard, K. Richards & L. Hirth. 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell,* 21**,** 285-94.

Gruys, K. J., M. C. Walker & J. A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry,* 31**,** 5534-44.

Herouet, C., D. J. Esdaile, B. A. Mallyon, E. Debruyne, A. Schulz, T. Currier, K. Hendrickx, R. J. van der Klis & 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. *Regul Toxicol Pharmacol,* 41**,** 134-49.

Hymowitz, T. & F. I. Collins. 1974. Variability of Sugar Content in Seed of Glycine max (L.) Merrill and G. soja Sieb. and Zucc. *Agronomy Journal,* 66**,** 239-240.

Itoh, T. & J. Tomizawa. 1979. Initiation of replication of plasmid ColE1 DNA by RNA polymerase, ribonuclease H, and DNA polymerase I. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol,* 43 Pt 1**,** 409-17.

Itoh, Y., J. M. Watson, D. Haas & T. Leisinger. 1984. Genetic and molecular characterization of the Pseudomonas plasmid pVS1. *Plasmid,* 11**,** 206-20.

Kay, R., A. M. Y. Chan, M. Daly & J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science,* 236**,** 1299.

Klee, H. J., C. S. Muskopf Ym Fau - Gasser & 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.

Mizuguti, A., K. Ohigashi, Y. Yoshimura, A. Kaga, Y. Kuroda & K. Matsuo. 2010. Hybridization between GM soybean (Glycine max (L.) Merr.) and wild soybean (Glycine soja Sieb. et Zucc.) under field conditions in Japan. *Environ Biosafety Res,* 9**,** 13-23.

Natarajan, S., C. Xu, H. Bae & B. A. Bailey. 2007. Proteomic and genomic characterization of Kunitz trypsin inhibitors in wild and cultivated soybean genotypes. *J Plant Physiol,* 164**,** 756-63.

Odell, J. T., F. Nagy & N. H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature,* 313**,** 810-2.

OECD. 1999a. CONSENSUS DOCUMENT ON GENERAL INFORMATION CONCERNING THE GENES AND THEIR ENZYMES THAT CONFER TOLERANCE TO GLYPHOSATE HERBICIDE. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.

OECD. 1999b. CONSENSUS DOCUMENT ON GENERAL INFORMATION CONCERNING THE GENES AND THEIR ENZYMES THAT CONFER TOLERANCE TO PHOSPHINOTHRICIN HERBICIDE. Paris, France: OECD Environmental Health and Safety Publications.

OECD. 2000. CONSENSUS DOCUMENT ON THE BIOLOGY OF GLYCINE MAX (L.) MERR. (SOYBEAN). Paris: OECD Environmental Health and Safety Publications.

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.

Padgette, S. R., D. L. Taylor Nb Fau - Nida, M. R. Nida Dl Fau - Bailey, J. Bailey Mr Fau - MacDonald, L. R. MacDonald J Fau - Holden, R. L. Holden Lr Fau - Fuchs & R. L. Fuchs. 1996. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *The journal of nutrition,* 126**,** 702-716.

Pazour, G. J., C. N. Ta & A. Das. 1992. Constitutive mutations of Agrobacterium tumefaciens transcriptional activator virG. *J Bacteriol,* 174**,** 4169-74.

Pietrzak, M., R. D. Shillito, T. Hohn & I. Potrykus. 1986. Expression in plants of two bacterial antibiotic resistance genes after protoplast transformation with a new plant expression vector. *Nucleic Acids Res,* 14**,** 5857-68.

Raboy, V. & 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.

Ridley, W. P., R. S. Sidhu, P. D. Ryla, M. A. Nemeth, M. L. Breeze & J. D. Astwood. 2002. Comparison of the Nutritional Profile of Glyphosate-Tolerant Corn Event NK603 with That of Conventional Corn (Zea mays L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 50, 7235-7243.

Smart, C. C., D. Johanning, G. Muller & 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. *J Biol Chem,* 260, 16338-46.

Thompson, C. J., N. R. Movva, R. Tizard, R. Crameri, J. E. Davies, M. Lauwereys & J. Botterman. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene bar from Streptomyces hygroscopicus. *Embo j,* 6, 2519-23.

Wehrmann, A., A. V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman & A. Schulz. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology,* 14, 1274-1278.

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

Yadav, N. S., J. Vanderleyden, D. R. Bennett, W. M. Barnes & M. D. Chilton. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 79, 6322-6.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira & J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene,* 33, 103-119.

財務省. 2023. 貿易統計 https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/hinmoku.html#r (Accessed June 9).

農林水産省. 2023. 飼料月報 https://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/cyosa/attach/pdf/kako-122.pdf (Accessed June 9).

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. 64 650-656

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. 541-546

参考資料（申請者提出　社外秘）

参考資料 1　Sequence of Genetic Element in pDBN4003

参考資料 2　DBNBC-BIO-2020016-V3 T-DNA region reading frame analysis in DBN9004 and Assessment of amino acid sequence homologies with known toxins and allergens

参考資料 3　DBNBC-BIO-2019013-V2 Assessment of Amino Acid Sequence Homology of EPSPS Protein with Known Toxins

参考資料 4　DBNBC-BIO-2020012-V3 Assessment of Amino Acid Sequence Homology of PAT Protein with Known Toxins

参考資料 5　DBNBC-RS-2018106 Southern Blot Analyses to Determine Copy Number of the Insert in DBN9004

参考資料 6　DBNBC-BIO-2019017-V3 Chromosome location analysis of T-DNA insertion in DBN9004 soybean

参考資料 7　DBNBC-RS-2018025 Expression analysis of *Glyma13G159000* in DBN9004 Soybean

参考資料 8　DBNBC-RS-2018208 The expressional stability of EPSPS and PAT in DBN9004

参考資料 9　DBNBC-RS-2020211-V2 Expression Levels of EPSPS and PAT Proteins in DBN9004-China 2020

参考資料 10　DBNBC-BIO-2020011-V3 Genome-to-insert junction reading frame analysis without a minimum size threshold in DBN9004 and Assessment of amino acid sequence homologies with known toxins and allergens

参考資料 11　DBNBC-RS-2018342 Biological Activity Analysis of Plant- and Microbe-produced EPSPS Proteins

参考資料 12　DBNBC-RS-2018343 Biological Activity Analysis of Plant- and Microbe-produced PAT Proteins

参考資料 13　DBNBC-RS-2019313 Production and Identification of Plant- and Microbe-produced EPSPS Proteins

参考資料 14　DBNBC-RS-2019312 Production and Identification of Plant- and Microbe-produced PAT Proteins

参考資料 15　DBNBC-RS-2019318 Glycosylation Analysis of Plant- and Microbe-produced EPSPS Proteins

参考資料 16　DBNBC-RS-2019317 Glycosylation Analysis of Plant- and Microbe-produced PAT Proteins

参考資料 17　DBNBC-RS-2019310-V2 Digestive Stability Analysis of EPSPS Protein in Simulated Gastric Fluid

参考資料 18　DBNBC-RS-2019311 Digestive Stability Analysis of PAT Protein in Simulated Gastric Fluid

参考資料 19　DBNBC-RS-2019314-V2 Digestive Stability Analysis of EPSPS Protein in Simulated Intestinal Fluid

参考資料 20　DBNBC-RS-2019315 Digestive Stability Analysis of PAT Protein in Simulated Intestinal Fluid

参考資料 21　DBNBC- RS-2020-309 -V2 Effect of Heat Treatment on a Recombinant EPSPS Protein

参考資料 22　DBNBC- RS-2020-310 -V2 Effect of Heat Treatment on a Recombinant PAT Protein

参考資料 23　DBNBC-IRA-2020002 -V2 Grain compositional analysis report for the GM soybean events DBN9004 harvested from the 2020 China field trials