

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニル
ピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除
草剤耐性ダイズ GMB151

令和4年（2022年）4月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>.....	3
要 約.....	5
I. 評価対象食品の概要.....	6
II. 食品健康影響評価.....	6
第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項.....	6
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	6
2. 宿主の食経験に関する事項.....	6
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	7
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項.....	7
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項.....	7
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	7
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	8
第3. 宿主に関する事項.....	8
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	8
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	8
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	8
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	8
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	8
6. 安全な摂取に関する事項.....	8
7. 近縁の植物種に関する事項.....	8
第4. ベクターに関する事項.....	9
1. 名称及び由来に関する事項.....	9
2. 性質に関する事項.....	9
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	9
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	10
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	13
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	13
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	13
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	14
第6. 組換え体に関する事項.....	14
1. 遺伝子導入に関する事項.....	14

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	15
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	16
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	16
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	18
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	18
7. 宿主との差異に関する事項.....	19
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	21
9. 栽培方法に関する事項.....	21
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	21
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	21
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	21
<参照>.....	22

<審議の経緯>

- 2021年1月8日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0107第2号）、関係書類の接受
- 2021年1月19日 第803回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年1月28日 第207回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年3月11日 追加資料の提出依頼
- 2022年3月2日 追加資料の接受
- 2022年3月23日 第223回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年4月26日 第856回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- | | |
|--------------|------------------|
| 2021年6月30日まで | 2021年7月1日から |
| 佐藤 洋（委員長） | 山本 茂貴（委員長） |
| 山本 茂貴（委員長代理） | 浅野 哲（委員長代理 第一順位） |
| 川西 徹 | 川西 徹（委員長代理 第二順位） |
| 吉田 緑 | 脇 昌子（委員長代理 第三順位） |
| 香西 みどり | 香西 みどり |
| 堀口 逸子 | 松永 和紀 |
| 吉田 充 | 吉田 充 |

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

- | | |
|--------------|--------------|
| 2021年9月30日まで | 2022年3月31日まで |
| 中島 春紫（座長） | 中島 春紫（座長） |
| 児玉 浩明（座長代理） | 山川 隆（座長代理） |
| 安達 玲子 | 安達 玲子 |
| 飯島 陽子 | 岡田 由美子 |
| 岡田 由美子 | 小関 良宏 |
| 小関 良宏 | 小野 道之 |
| 小野 竜一 | 小野 竜一 |
| 橘田和美 | 近藤 一成 |
| | 樋口 恭子 |
| | 藤原 すみれ |

2021年4月1日から

- | | |
|------------|--------|
| 中島 春紫（座長） | |
| 山川 隆（座長代理） | |
| 安達 玲子 | 近藤 一成 |
| 岡田 由美子 | 佐々木 伸大 |
| 小野 道之 | 樋口 恭子 |
| 小野 竜一 | 藤原 すみれ |

<第 223 回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明 (千葉大学大学院園芸学研究院教授)

要 約

「線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ GMB151」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本系統は、ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の Thorne を宿主とし、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* A32 株に由来する改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ遺伝子を導入して作出されており、Cry14Ab-1 タンパク質及び改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼを発現することで、線虫及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤による影響を受けずに生育できるとされている。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、遺伝子の導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較の結果等について確認した結果、非組換えダイズと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ GMB151」については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

(申請内容)

名 称：線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ GMB151

性 質：線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性

申請者：BASF ジャパン株式会社

開発者：BASF Agricultural Solutions Seed US LLC (米国)

「線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ GMB151」(以下「ダイズ GMB151」という。)は、*Bacillus thuringiensis* に由来する *cry14Ab-1.b* 遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* A32 株に由来する改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (*hppdPf-4Pa*) 遺伝子を導入して作出されており、Cry14Ab-1 タンパク質及び改変 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (HPPD-4) を発現することで、線虫及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (HPPD) 阻害型除草剤による影響を受けずに生育できるとされている。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入 DNA に関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) の Thorne である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

cry14Ab-1.b 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* であり、*hppdPf-4Pa* 遺伝子の供与体は、*P. fluorescens* A32 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cry14Ab-1.b 遺伝子がコードする Cry14Ab-1 タンパク質は、線虫に対して抵抗性を付与する。*hppdPf-4Pa* 遺伝子がコードする HPPD-4 は、HPPD 阻害型除草剤による活性阻害を受けないため、HPPD 阻害型除草剤耐性を付与する。

cry14Ab-1.b 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子を含む T-DNA 領域は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

2. 宿主の食経験に関する事項

ダイズの起源は中国であると言われている。日本には約 2000 年前に伝来、栽培が始まったと考えられており、古くから食品として利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

ダイズ種子の主要栄養組成（対乾燥重量）は、粗タンパク質 32.6～45.5%、粗脂質 15.8～24.2%、灰分 4.27～5.60%及び炭水化物 32.1～40.0%、全食物繊維（TDF）12.2～23.6%、酸性デタージェント繊維（ADF）9.8～20.9%及び中性デタージェント繊維（NDF）11.7～20.1%である（参照 1）。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

ダイズ種子中の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、トリプシンインヒビター 15.1～44.4 TIU^a/mg、レクチン 0.23～4.41 mg/g、ダイゼイン 0～1788 mg/kg、ゲニステイン 236～1582 mg/kg、グリシテイン 24～320 mg/kg、スタキオース 2.40～4.53%、ラフィノース 0.39～1.40%及びフィチン酸 0.77～2.26%である（参照 1）。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

ダイズ GMB151 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のダイズと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

ダイズ GMB151 の摂取部位は、従来のダイズと変わらない。

(3) 摂取量

ダイズ GMB151 の摂取量は、従来のダイズと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

ダイズ GMB151 の調理及び加工方法は、従来のダイズと変わらない。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と従来品種以外のものは比較対象としていない。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

ダイズ GMB151 は、*cry14Ab-1.b* 遺伝子の導入によって、Cry14Ab-1 タンパク質を発現すること及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子の導入によって HPPD-4 タンパク質を発現することで、それぞれ線虫抵抗性及び HPPD 阻害型除草剤耐性が付与されている点が宿主との相違点である。

^a TIU : trypsin inhibitor unit

以上から、ダイズ GMB151 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した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

ダイズ GMB151 は、線虫に対する抵抗性を有し、また、イソキサフルトールのような HPPD 阻害型除草剤の影響を受けずに生育することができる。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、マメ科 *Glycine* 属に属するダイズ (*G. max* (L.) Merr.) の商業品種 Thorne である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

中国を中心とするアジア地域では栽培の歴史が長い。*Glycine* 属の *Soja* 亜属にはダイズのほかに、ダイズの祖先である野生ダイズの一つであるツルマメが含まれている。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ダイズ種子には、有害生理活性物質であるトリプシンインヒビター、レクチン、イソフラボン類、スタキオース、ラフィノース及びフィチン酸が含まれている（参照 2）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ダイズはアレルギー誘発性が知られている主要食物の一つである。代表的なアレルギーとして、ダイズ疎水性タンパク質、トリプシンインヒビター、P34 タンパク質、β-コングリシニン及びグリシニンが知られている（参照 2）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

ダイズには、細菌及び糸状菌による各種病害が知られているが（参照 3）、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

6. 安全な摂取に関する事項

ダイズは、豆腐、味噌などの様々な食品に加工されており、これらを通じてヒトに摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ダイズの近縁種であるツルマメには、有害生理活性物質としてトリプシンインヒビターが含まれていることが知られている。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

ダイズ GMB151 の作出に用いられた導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域である。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 4）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域には、アミノグリコシド系抗生物質耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれているが、GMB151 のゲノム中に挿入されていないことがシーケンス解析により確認されている（参照 5）。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

cry14Ab-1.b 遺伝子の供与体は、*B. thuringiensis* である。*hppdPf-4Pa* 遺伝子の供与体は、*P. fluorescens* A32 株である。

(2) 安全性に関する事項

B. thuringiensis は、生物農薬として長期にわたり安全に利用されている（参照 6）。

P. fluorescens は、自然界に広く存在し、魚類及び無脊椎動物などに感染するが、*P. fluorescens* の至適生育温度は 25~30℃であり、これより高い体温を維持するヒトの体内では日和見病原体を越えるほどの病原性を持たない（参照 7）。また、*P. fluorescens* は米国において生物農薬として安全に使用されてい

る（参照 8）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

（1）挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

cry14Ab-1.b 遺伝子は、*B. thuringiensis* からクローニングされた。

hppdPf-4Pa 遺伝子は *P. fluorescens* A32 株由来の *hppd* 遺伝子がコードする HPPD タンパク質の C 末端にある 335、336、339、340 番目のアミノ酸がそれぞれグルタミン酸からプロリン、グリシンからトリプトファン、リジンからアラニン、アラニンからグルタミンに置換されるように改変されている。これにより、HPPD 阻害型除草剤との結合親和性が下がり、HPPD 阻害型除草剤の存在下でも 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸（4-HPP）からホモゲンチゲン酸（HGA）への反応が触媒されることで HPPD 阻害型除草剤耐性を示す。挿入 DNA の構成要素は表 1 のとおりである。

（2）塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA である T-DNA 領域の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 4）。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

cry14Ab-1.b 遺伝子がコードする Cry14Ab-1 タンパク質は、標的とするダイズシストセンチュウ及びネグサレセンチュウ類に殺線虫活性を示す。Cry14Ab-1 タンパク質の全長アミノ酸配列に基づき（参照 9）、他の線虫抵抗性 Cry タンパク質及び代表的なチョウ目、コウチュウ目、ハエ目抵抗性 Cry タンパク質に対して構造的類似性を検討した結果、線虫抵抗性を示す Cry21 タンパク質と最も類似していた。また、Cry14Ab-1 タンパク質の立体構造は決定されていないが、Cry14Ab-1 タンパク質は、Cry タンパク質間で保存されている δ -トキシン活性を示すために必要な N 末端コアの 3 つのドメイン構造を有している。

これまでに遺伝子組換え作物に利用されてきた害虫抵抗性を示す Cry タンパク質の作用機序と類似しているかどうかについて検討を行った結果、Cry14Ab-1 タンパク質も標的昆虫に摂取されると消化管内のプロテアーゼにより可溶化して δ -エンドトキシンとなり、これが中腸に作用し、上皮細胞膜に小孔を形成して殺虫活性を示すことが示唆された（参照 10、11）。

線虫抵抗性 Cry タンパク質である Cry21Aa3 及び Cry5Ba タンパク質の受容体について *C. elegans* を用いた試験結果から *abt-4* 遺伝子がコードするタンパク質、線虫特異的カドヘリン受容体 CDH-8 等が受容体と示唆されている。Cry14Ab-1 タンパク質が結合する受容体は同定されていないが、Cry14Ab-1 タンパク質が線虫の中腸上皮に結合し損傷を与えることが確認されていること（参照 11、12）から、Cry21Aa3 タンパク質及び Cry5Ba タンパク質と同様の受容体に作用するものと推測された。

ダイズに被害をもたらすクキセンチュウ目の 5 つの植物寄生性線虫(ダイズシストセンチュウ、ネグサレセンチュウ類、ネコブセンチュウ、ナミラセンセンチュウ類及びニセフクロセンチュウ)のうち、Cry14Ab-1 タンパク質はネコブセンチュウ、ナミラセンセンチュウ類及びニセフクロセンチュウには効果を示さなかったことから、クキセンチュウ目に属する線虫において Cry14Ab-1 タンパク質への感受性が異なることを確認した(参照 9)。

害虫や病原菌に対して Cry14Ab-1 タンパク質の定性的なバイオアッセイを実施した結果、*C. elegans* に対して生育を阻害したが、チョウ目を含む他の害虫や菌類には活性を示さなかった。したがって、Cry14Ab-1 タンパク質のスペクトラムは他の Cry タンパク質のもつスペクトラムとは重複しないと考えられた(参照 13)。

また、Cry14Ab-1 タンパク質にばく露される可能性が考えられるミツバチ、ミジンコなどの非標的生物に対して混餌投与による生物検定を行った結果、全ての非標的生物に対して Cry14Ab-1 タンパク質は殺虫活性を示さないことが確認された(参照 14)。マウスへの Cry14Ab-1 タンパク質並びにラット及びニワトリへのダイズ GMB151 油かすの給餌投与による毒性試験の結果では、投与に関連した影響は確認されず、Cry14Ab-1 タンパク質は線虫以外の非標的生物に摂取されても安全であると考えられた(参照 15~17)。

Cry14Ab-1 タンパク質の既知の毒性タンパク質との構造相同性を調べるために、データベース^bを用いて E -value < 0.1 (NCBI) 及び 10 (BCS 2018 toxin database) を指標として検索を行った。その結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった(参照 18)。

HPPD タンパク質は、微生物、植物及び哺乳類のチロシン代謝経路において、4-HPP から HGA を生じる不可逆反応を触媒する酵素である。除草剤イソキサフルトールの植物体内代謝産物であるジケトニトリル構造物(DKN)は、HPPD タンパク質の活性部位に結合してその活性を阻害し、その結果、植物体内で HGA の生産ができなくなる。HGA は、プラストキノン、トコトリエノール及びトコフェロールの合成に利用されることから、これらの化合物は光合成における電子伝達や植物体内での抗酸化システムにおいて重要である。

hppdPf-4Pa 遺伝子がコードする HPPD-4 タンパク質は、HPPD タンパク質のアミノ酸配列の 4 か所を部位特異的に置換することにより、DKN との結合親和性を低下させている。その結果、HPPD-4 タンパク質は DKN による阻害活性を受けずに正常な代謝が行えるため、イソキサフルトールを散布しても生育が可能となる(参照 19)。

HPPD-4 タンパク質の既知の毒性タンパク質との構造相同性を調べるために、データベース^bを用いて E -value < 0.1 (NCBI) 及び 10 (BCS 2018 toxin

^b NCBI non-redundant protein database 及び BCS toxin database (毒性に関するキーワード検索等に基づいた独自に構築した毒性タンパク質データベース version 18.1) (検索日: 2018 年 6 月)

database) を指標として検索を行った。その結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった (参照 20)。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域に、*aadA* 遺伝子が含まれているが、ダイズ GMB151 に挿入されていないことはシーケンス解析により確認されている (参照 5、21)。

表 1 挿入 DNA 構成要素

構成要素	由来及び機能
LB	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界配列を含む <i>Rhizobium radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域
(hppdPf-4Pa 遺伝子発現カセット)	
2×35S プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S ゲノム RNA を反復して配列させ、機能を強化したプロモーター
LteV	Tobacco Etch Virus のゲノム RNA のリーダー配列で、 <i>hppdPf-4Pa</i> 遺伝子の翻訳効率を上げるために導入された
TPotp Y-1Pf	ヒマワリ (<i>Helianthus annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Zea mays</i>) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の輸送ペプチドのコード領域 HPPD-4 タンパク質を色素体へ輸送する
<i>hppdPf-4Pa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A32 株由来の HPPD 遺伝子に 4 箇所のアミノ酸置換を導入した HPPD-4 タンパク質をコードする配列 このアミノ酸置換により HPPD 阻害型除草剤への耐性を付与する
35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列
(cry14Ab-1.b 遺伝子発現カセット)	
ubi10At プロモーター	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のユビキチン 10 遺伝子のプロモーター
<i>cry14Ab-1.b</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> 由来の δ -エンドトキシン遺伝子で、線虫抵抗性を付与する
35S ターミネーター	カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA の 3'側の非翻訳領域を含む配列
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

cry14Ab-1.b 遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のユビキチン 10 遺伝子のプロモーター配列である。

hppdPf-4Pa 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルスに由来する 35S ゲノム RNA を反復して配列させ、機能を強化したプロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

cry14Ab-1.b 遺伝子及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来 35S RNA の 3'非翻訳領域である。

(3) その他

hppdPf-4Pa 遺伝子発現カセットには、ヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びトウモロコシ (*Zea mays*) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の輸送ペプチドのコード領域が挿入され、タンパク質を色素体へ輸送する (参照 22)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

外骨格領域及び T-DNA 領域を含む構成要素によって、導入用プラスミド pSZ8832 が構築された。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 23)。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる導入用ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

導入用プラスミド pSZ8832 の T-DNA 領域には、目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) は含まれていない。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が導入用ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド pSZ8832 の意図する挿入領域は、T-DNA の右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までである。

(4) 導入しようとする導入用ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド pSZ8832 は、抗生物質耐性マーカーによる選抜及び塩基配列の解析を通じて純化され、目的外の遺伝子が混入していないことをシーケンス解析により確認している（参照 4）。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド pSZ8832 の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって宿主に導入した後、HPPD 阻害型除草剤の 1 つであるテンボトリオンを含む選抜培地にて再生個体を得た。その後、選抜した個体の自殖によってダイズ GMB151 が得られた。

第 6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

ダイズ GMB151 のゲノムに挿入された T-DNA 領域のコピー数を確認するために、シーケンス解析^cを行った結果、T-DNA 領域 5'末端及び 2x35S プロモーター配列の一部を含むゲノムとの 2 つの接合領域が特定され、T-DNA 領域が 1 コピー挿入されていることが確認された。一方で、宿主 Thorne ではこれらの接合領域は確認されなかった。また、T-DNA の 3'末端に挿入された DNA 断片 39 bp のうち、21 bp が導入用プラスミド pSZ8832 の外骨格領域由来の配列であったことを除き、導入用プラスミド外骨格領域がゲノム中に存在しないことが確認された（参照 5）。

導入された T-DNA 領域の PCR 分析及び塩基配列解析を行った結果、T-DNA 領域の 5'末端の RB 及び 3'末端の LB の欠失、並びに 2x35S プロモーターの 5'側 482bp の欠失が確認された以外、導入用プラスミド pSZ8832 の T-DNA 領域の塩基配列と同一であった（参照 21）。

ダイズ GMB151 の挿入 DNA 近傍配列（5'及び 3'側それぞれ 1000 bp）と宿主ゲノムを比較した結果、3'側近傍配列の 1 bp の相違を除き、挿入 DNA の近傍配列は宿主ダイズゲノム由来であることが確認された。また、挿入位置において 63 bp の欠失、T-DNA の 3'側に DNA 断片 39 bp の挿入が確認された（参照 5、21）。

DNA 挿入によってダイズの内在性遺伝子が損なわれていないかどうかを確認するために、欠失した 63 bp を含む 5'末端近傍配列及び 3'末端近傍配列（合計 2063 bp）について、データベース^dを用いて E -value<10 を指標として blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、T-DNA は、BON1 関連タンパク質 1 の 3'側非翻訳領域に挿入されていることが確認された（参照 24）。BON1 関連タンパク質 1 は塩基配列から推定されたタンパク質であること、ダイズ GMB151

^c ゲノムをリード（125 bp）に断片化、冗長度 75 以上での解析

^d NCBI:Nucleotide collection, EST, Non-redundant protein sequences（検索日：2021 年 9 月）

と非組換えダイズの間において構成成分組成に有意差はなく表現型及び農業的形質に相違はなかったことから、DNA の挿入によって既知の内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられる。

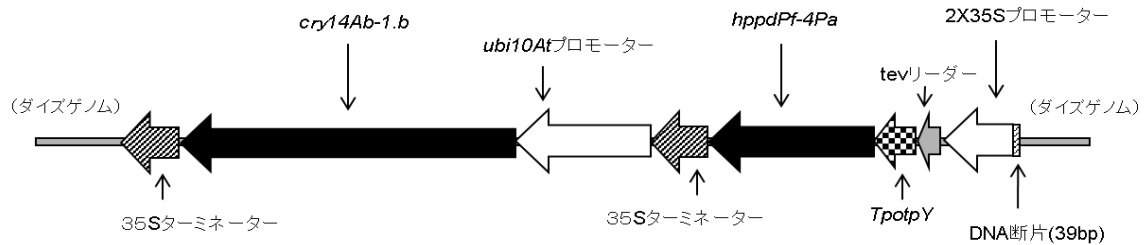


図1 ダイズ GMB151 に挿入された DNA (模式図)

(2) 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

ダイズ GMB151 の挿入 DNA 領域とその両近傍配列の接合部において意図しない ORF が生じていないことを確認するために、6つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 115 個見いだされた。115 個の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲンは見いだされなかった。さらに、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列を検索した結果、アレルゲンの Cas s 5 タンパク質と一致する配列が 1 個認められた。このアミノ酸配列はエピトープとして発現するために必須の開始コドンや RNA スプライシングサイトがなく、構造上発現する可能性は低いと考えられた (参照 25)。

同様に検出された 115 個の ORF に対して既知の毒性タンパク質との相同性を調べるために、データベース^fを用いて E -value<0.1 を指標に検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との相同性は見られなかった (参照 25)。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

ダイズ GMB151 の葉、根、花序、植物体 (根を含まない) 及び種子の Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。その結果は、表 2 のとおりである (参照 26)。

^e COMPARE (Comprehensive Protein Allergen Resource) version 18 (検索日: 2018 年 6 月)

^f NCBI version 2018_0506 (検索日: 2018 年 6 月)

表2 ダイズ GMB151 における Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重量)

分析組織*	Cry14Ab-1 タンパク質**	HPPD-4 タンパク質***
葉	74.0~168.7	178.8~429.2
根	4.80~20.6	20.9~73.7
花序	48.0	70.9
植物体 (根を含まない)	48.7	129.0
種子	83.1	4.5

* 葉及び根は3葉期~着莢期、花序は開花初期、地上部は着莢期、種子は成熟期の値を示した。

**定量限界下限値は $0.13\mu\text{g/g}$ 乾燥重量である。

***定量限界下限値は、葉 $8\mu\text{g/g}$ 乾燥重量、それ以外の組織は $1\mu\text{g/g}$ 乾燥重量である。

3. 遺伝子産物 (タンパク質) が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

日本人一人が一日に摂取する「大豆・加工品」の平均摂取量 59.2g (参照 27) を全てダイズ GMB151 に置き換えた場合、ダイズ GMB151 の成熟種子における両タンパク質の発現量平均値を用いて Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質の摂取量を計算すると、それぞれ $83.1\ \mu\text{g/g}$ 及び $4.5\ \mu\text{g/g}$ となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 $71.4\ \text{g}$ (参照 27) に占める割合は 7.4×10^{-5} 及び 4.0×10^{-6} となる。

したがって、一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはないと判断される。

4. 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性に関する事項

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

cry14Ab-1.b 遺伝子の供与体である *B. thuringiensis* 及び *hppdPf-4Pa* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* A32 株に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

(2) 遺伝子産物 (タンパク質) のアレルギー誘発性

Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

(3) 遺伝子産物 (タンパク質) の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

a. Cry14Ab-1 タンパク質

B. thuringiensis から精製した Cry14Ab-1 タンパク質の人工胃液中にお

ける消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析で、試験開始後 0.5 分以内にバンドは消失した。

なお、両分析において観察された約 150~300 kDa の Cry14Ab-1 タンパク質のオリゴマーのバンドは、試験開始後 0.5 分以内に消失した（参照 28）。

b. HPPD-4 タンパク質

E. coli から精製した HPPD-4 タンパク質の人工胃液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析で、試験開始後 0.5 分以内にバンドは消失した。

なお、ウェスタンブロット分析において観察された約 80 及び 120 kDa の HPPD-4 タンパク質のオリゴマーのバンドは、試験開始後 0.5 分以内に消失した（参照 29）。

② 人工腸液に対する感受性

a. Cry14Ab-1 タンパク質

B. thuringiensis から精製した Cry14Ab-1 タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では、Cry14Ab-1 タンパク質と同じ分子量の位置にパンクレアチンのバンドが重複して検出されたため、識別できず、消化を確認することはできなかった。ウェスタンブロット分析では、約 25、50 及び 75~100 kDa に Cry14Ab-1 タンパク質の分解物が検出され、試験開始後 60 分までに部分的に消化されることが示された（参照 30）

b. HPPD-4 タンパク質

E. coli から精製した HPPD-4 タンパク質の人工腸液中における消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では、HPPD-4 タンパク質と同じ分子量の位置にパンクレアチンのバンドが重複して検出されたため、識別できず、消化を確認することはできなかった。ウェスタンブロット分析では、反応開始 0.5 分後に HPPD-4 タンパク質を示すバンドは消失した。HPPD-4 タンパク質の分解物である複数のバンドが検出されたが、試験開始後 10 分以内に全て消化されることが確認された（参照 31）。

③ 加熱処理に対する感受性

a. Cry14Ab-1 タンパク質

B. thuringiensis から精製した Cry14Ab-1 タンパク質の加熱処理に対す

る感受性について確認するため、ELISA 分析を行った結果、Cry14Ab-1 タンパク質は、75℃以上、30 分間の加熱処理により免疫反応性を失うこと（参照 32）及び線虫に対する成長阻害活性を消失すること（参照 33）が確認された。

b. HPPD-4 タンパク質

E. coli から精製した HPPD-4 タンパク質の加熱処理に対する感受性について確認するため、ELISA 分析を行った結果、HPPD-4 タンパク質は、75℃以上、30 分間の加熱処理により免疫反応性を失うことが確認された（参照 34）。また、HPPD-4 タンパク質は、55℃以上、30 分間の加熱処理により酵素活性を消失することが確認された（参照 35）。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^eを用いて *E*-value<10 を指標として相同性検索を行った結果、80 以上のアミノ酸について 35%以上の相同性を有する既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 18、20）。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^eを用いて連続する 8 アミノ酸配列の一致について相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの一致は認められなかった（参照 18、20）。

上記、(1)～(4) から総合的に判断し、Cry14Ab-1 タンパク質及び HPPD-4 タンパク質については、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことを確認した。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

ダイズ GMB151 に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、4 世代のダイズ GMB151 について、ゲノム DNA を用いてシーケンズ解析を行った結果、各世代において導入遺伝子との接合領域が 2 個検出され、挿入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照 5）。

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

(1) Cry14Ab-1 タンパク質

Cry14Ab-1 タンパク質は *B. thuringiensis* に由来する殺虫性タンパク質である Cry タンパク質ファミリーの一つである。Cry タンパク質は、殺虫以外の機能を有することは知られておらず、酵素活性を持つ報告はない。したがって植物の代

^e COMPARE (Comprehensive Protein Allergen Resource) version 18 (検索日：2018 年 6 月)

謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

(2) HPPD-4 タンパク質

HPPD-4 タンパク質は、HPPD 阻害型除草剤によって阻害されるダイズ内在性の HPPD タンパク質に代わり、チロシン代謝経路において 4-HPP からホモゲンチジン酸 (HGA) 生成を触媒する酵素である。なお、HPPD-4 タンパク質と 3 アミノ酸異なる HPPD W336 タンパク質は、「除草剤グリホサート及びイソキサフルトール耐性ダイズ FG72 系統」(平成 28 年) 及び「除草剤グリホサート及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ワタ GHB811」(平成 30 年) でそれぞれ食品としての安全性が確認されている。

HGA の上流に位置するチロシンの含量は、ダイズ GMB151 と非組換えダイズの間には統計学的有意差はなく、ダイズ GMB151 において、チロシン含量の上昇は認められなかったことから、HPPD タンパク質を過剰発現させてもチロシンが関与する代謝経路に影響はないと考えられる。非組換えダイズ及びダイズ GMB151 の HGA 含量を測定した結果、いずれも定量限界値未満であった(参照 36) ことから、両ダイズにおいて HGA は蓄積されず迅速に代謝されることが示された。また、ダイズ GMB151 の HGA の下流の代謝産物であるトコフェロール含量も商業品種の許容区間内であった(第 6 の 7 参照)。また、エンバクの改変 HPPD タンパク質を過剰発現させたダイズにおいてフマル酸量に影響を及ぼさないとの報告がある(参照 37)。したがって、HPPD-4 タンパク質が HGA 下流の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

HPPD-4 タンパク質の基質特異性について検討した結果(参照 38)、4-HPP 以外に植物体内で基質となる可能性を有する 4 種類の化合物(フェニルピルビン酸 (PP)、3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC) 及び 2-オキソ-5-チアヘキサン酸 (KMTB)) が示唆された。これら 4 種類の化合物及び 4-HPP タンパク質を基質とし、HPPD-4 タンパク質と反応させた結果、3,4-dHPP を除き、反応は認められなかった。3,4-dHPP は、わずかながら反応が認められたものの、競合する基質がない *in vitro* での結果であることから、4-HPP が存在する植物体内において基質として利用されることはないと考えられるとしている。したがって、これらの 4 つの物質が HPPD-4 タンパク質の基質となる可能性は低く、4-HPP 以外に基質となるものはないと考えられた(参照 39)。

以上のことから、HPPD-4 タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたダイズ GMB151 と宿主である非組換えダイズについて、ダイズ GMB151 には HPPD 阻害型除草剤の 1 つであるイソキサフルトールの散布を行った処理区及び散布を行わなかった無処理区を設定し、主要構成成分、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸組成、脂肪酸組成及び有害生理活性物質の分

析を行い、統計学的有意差について検討を行った（参照 1、36）。

(1) 主要構成成分

種子及び地上部の主要構成成分（水分、粗タンパク質、粗脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維及び全食物繊維）について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズと、ダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても商業品種の許容区間内^gであった。

(2) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 19 種類について分析を行った結果、13 種類は対照に用いた非組換えダイズと、ダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても商業品種の許容区間内であった。なお、6 種類の脂肪酸については定量限界値未満のサンプルが多いため、統計学的処理から除外した。

(3) アミノ酸組成

種子のアミノ酸 18 種類について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズと、ダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間に統計学的有意差が認められなかった。

(4) ミネラル類

種子のカルシウム、銅、鉄、マグネシウム、マンガン、リン、カリウム、ナトリウム及び亜鉛について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズと、ダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても商業品種の許容区間内であった。なお、ナトリウムは定量限界値未満のサンプルが多いため、統計学的処理から除外した。

(5) ビタミン類

種子のトコフェロール類、トコトリエノール類、ビタミン B 群、ビタミン K₁ 及びホモゲンチジン酸について分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズと、ダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間に統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても商業品種の許容区間内であった。

(6) 有害生理活性物質

種子のダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、総イソフラボン、レクチ

^g 同条件で栽培した 9 系統商業品種の許容区間（95%の信頼率で母集団の 99%が含まれる範囲）

ン、フィチン酸、ラフィノース、スタキオース及びトリプシンインヒビターについて分析を行った結果、対照に用いた非組換えダイズとダイズ GMB151 処理区及び無処理区の間には統計学的有意差が認められないか、統計学的有意差が認められた場合であっても商業品種の許容区間内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品・飼料としての安全性審査及び米国農務省（USDA）に対して無規制裁培の承認申請が行われ、それぞれ 2022 年 3 月に承認を得た。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての安全性審査及びカナダ食品検査局（CFIA）に対して環境・飼料としての安全性審査の申請が行われ、それぞれ 2021 年 5 月に承認を得た。

EU においては、2018 年 10 月に欧州食品安全機関（EFSA）へ食品及び飼料としての安全性審査の申請が行われた。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2020 年 12 月に安全性確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ GMB151 の栽培方法については、従来のダイズと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

ダイズ GMB151 の種子の製法及び管理方法については、従来のダイズと同じである。

第 7. 第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までにより、安全性の知見が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「線虫抵抗性及び 4-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ阻害型除草剤耐性ダイズ線虫 GMB151」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. GMB151 Soybean – Composition Assessment of GMB151 Soybean Grown in the USA during 2017 (社内文書) , 2018
2. OECD. Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Soybean: Key Food and Feed Nutrients and Anti-Nutrients. ENV/JM/MONO(2012)24, 2012
3. OECD. Consensus document on the biology of *Glycine max* (L.) Merr. (soybean) ENV/JM/MONO(2000)9, 2000
4. Sequence determination of plasmid pSZ8832 (社内文書) , 2017
5. Molecular characterization of GMB151 soybean by means of next-generation sequencing and junction sequence analysis (社内文書) , 2018
6. OECD. Consensus Document on Safety Information on Transgenic Plants Expressing *Bacillus thuringiensis* - Derived Insect Control Proteins. ENV/JM/MONO(2007)14 2007
7. OECD. Consensus document on information used in the assessment of environmental applications involving *Pseudomonas*. OCDE/GD(97)22, 1997
8. EPA. *Pseudomonas fluorescens*; Registration Review Final Decision; Notice of Availability (74 FR 50202), 2009; 50202-03
9. Description of the Cry14Ab-1 protein (社内文書) , 2016
10. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of IPD072Aa Using SDS-PAGE and Western Blot Analysis (社内文書)
11. Wei J. Z., Hale K., Carta L., Platzer E., Wong C., Fang S. C., 他: *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes。 *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2760-5
12. Kahn T. W., Duck N. B., McCarville M. T., Schouten L. C., Schweri K., Zaitseva J., 他: A *Bacillus thuringiensis* Cry protein controls soybean cyst nematode in transgenic soybean plants。 *Nat Commun* 2021; 12: 3380
13. Field assessment of potential impacts of GMB151 soybean on free-living nematodes (Springfield, NE and Fruitland, IA) (社内文書) , 2020
14. Environmental safety assessment of the Cry14Ab-1 protein expressed in event GMB151 soybean (社内文書) , 2018
15. Cry14Ab-1 protein Acute toxicity study by oral gavage in mice (社内文書) , 2016
16. GMB151 soybean 90-day toxicity study in the rat by dietary administration (社内文書) , 2018
17. Broiler chicken feeding study with GMB151 soybean meal (社内文書) , 2019
18. Cry14Ab-1 protein Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins (社内文書) , 2018
19. Boudec P. , Rodgers M., Dumas F., Sailland A. , Bourdon H. Mutated hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, DNA sequence and isolation of plants

- which contain such a gene and which are tolerant to herbicides. US6245968B1 (12-Jun-2001) Application by Aventis CropScience SA, 2001
20. HPPD-4 protein Amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins (社内文書) , 2018
 21. DNA sequence determination of the transgenic and insertion loci of GMB151 soybean (社内文書) , 2017
 22. Lebrun M., Leroux B., Sailland A. . Chimeric gene for the transformation of plants. US5510471A (23-April-1996) Application by Rhone Poulenc Agrochimie SA (FR), 1996
 23. Description of Vector pSZ8832 (社内文書) , 2016
 24. Bioinformatics analysis of the GMB151 soybean insertion locus (社内文書) , 2018
 25. GMB151 soybean Identification of Open Reading Frames and homology search of sequences ≥ 30 amino acids to known allergens and toxins (社内文書) , 2018
 26. GMB151 Soybean-Expression of Cry14Ab-1 and HPPD-4 Proteins in Field Samples Grown in the USA during 2016 (社内文書) , 2018
 27. 厚生労働省. 令和元年国民健康・栄養調査報告, 2020
 28. Cry14Ab-1 protein *In vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid at pH 1.2 (社内文書) , 2014
 29. HPPD-4 protein *In vitro* digestibility study in human stimulated gastric fluid at pH 1.2 (社内文書) , 2014
 30. Cry14Ab-1 protein *In vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (社内文書) , 2014
 31. HPPD-4 protein *In vitro* digestibility study in human stimulated intestinal fluid (社内文書) , 2014
 32. The Effect of Temperature on Cry14Ab-1 as Assessed by ELISA (社内文書) , 2015
 33. The Effect of Temperature on Cry14Ab-1 as Assessed by the *Caenorhabditis elegans* Fluorescence Bioassay (社内文書) , 2016
 34. The Effect of Temperature on HPPD-4 as Assessed by ELISA (社内文書) , 2015
 35. The Effect of Temperature on HPPD-4, Assessed by the HPPD-4 Quantitative Activity Assay (社内文書) , 2015
 36. GMB151 Soybean – Composition Assessment of Tyrosine Pathway Metabolites in GMB151 Soybean Grown in the USA during 2017 (社内文書) , 2018
 37. Clarke J. D., Alexander D. C., Ward D. P., Ryals J. A., Mitchell M. W., Wulff J. E., 他: Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. *Sci Rep* 2013; 3: 3082

38. Literature survey on potential alternative substrates for HPPD (社内文書) , 2015
39. Substrate specificity of the HPPD-4 protein in comparison to the wild type *Pseudomonas fluorescens* HPPD protein HPPD Pf (社内文書) , 2018