

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

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

2015年12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.....	4
Ⅰ. 評価対象食品の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
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.....	5
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	5
2. 宿主の食経験に関する事項.....	5
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	6
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.....	6
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.....	6
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.....	6
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	7
第3. 宿主に関する事項.....	7
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.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	7
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.....	7
6. 安全な摂取に関する事項.....	7
7. 近縁の植物種に関する事項.....	7
第4. ベクターに関する事項.....	8
1. 名称及び由来に関する事項.....	8
2. 性質に関する事項.....	8
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.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	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.....	8
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.....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	12
第6. 組換え体に関する事項.....	13
1. 遺伝子導入に関する事項.....	13
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.....	14
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.....	15
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.....	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	17
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.....	17
7. 宿主との差異に関する事項.....	18
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	19
9. 栽培方法に関する事項.....	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	20
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.....	20
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	20
<参照>.....	21

<審議の経緯>

- 2014年3月13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（厚生労働省発食安0313第2号）、関係書類の接受
- 2014年3月17日 第507回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2014年4月24日 第126回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年11月18日 第143回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年12月22日 第589回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

2015年6月30日まで	2015年7月1日から
熊谷 進（委員長）	佐藤 洋（委員長）
佐藤 洋（委員長代理）	山添 康（委員長代理）
山添 康（委員長代理）	熊谷 進
三森 国敏（委員長代理）	吉田 緑
石井 克枝	石井 克枝
上安平 洵子	堀口 逸子
村田 容常	村田 容常

<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>

2015年9月30日まで		2015年10月1日から	
澤田 純一（座長）		澤田 純一（座長）	
小関 良宏（座長代理）		小関 良宏（座長代理）	
宇理須 厚雄	手島 玲子	岡田 由美子	中島 春紫
岡田 由美子	中島 春紫	橘田 和美	樋口 恭子
橘田 和美	飯 哲夫	児玉 浩明	飯 哲夫
児玉 浩明	和久井 信	近藤 一成	山川 隆
近藤 一成		柘植 郁哉	和久井 信
		手島 玲子	

要 約

「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」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、トウモロコシ (*Zea mays*) に由来する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子及び *Pseudomonas fluorescens* に由来する 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、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質が発現することで、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールの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等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、「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」については、ヒト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

名称：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
性質：除草剤グリホサート耐性、除草剤イソキサフルトール耐性
申請者：バイエルクロップサイエンス株式会社
開発者：Bayer CropScience LP（ドイツ）

「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」（以下「ダイズ FG72」という。）は、トウモロコシ（*Zea mays*）に由来する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素遺伝子（*2mepsps* 遺伝子）及び *Pseudomonas fluorescens* に由来する 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（*hppdPFW336* 遺伝子）を導入して作出されており、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素（2mEPSPS タンパク質）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 W336 タンパク質）が発現することで、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールの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 Jack である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

2mepsps 遺伝子の供与体は、トウモロコシ（*Z. mays*）であり、*hppdPFW336* 遺伝子の供与体は *P. fluorescens* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

2mepsps 遺伝子は、除草剤グリホサート耐性を付与する 2mEPSPS タンパク質を発現する。*hppdPFW336* 遺伝子は、除草剤イソキサフルトール耐性を付与する HPPD W336 タンパク質を発現する。

2mepsps 遺伝子及び *hppdPFW336* 遺伝子は、パーティクルボンバードメント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

ダイズは中国を原産とする最も古い栽培作物の一つであり、長い食経験がある。世界的に食用油と家畜飼料として用いられている。アジアでは古くから、食品素材として、豆腐、味噌等に利用されている。

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素組成（対乾燥重量）は、タンパク質 32.0～45.5%、脂質 8.1～24.7%、灰分 3.9～7.0%、炭水化物 29.6～50.2%である（参照 1, 2）。

- (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

ダイズ種子の有害生理活性物質（対乾燥重量）は、ダイゼイン 5～35 mg/kg、グリシテイン 1～80 mg/kg、ゲニステイン 0.3～46 mg/kg、レクチン 0.11～129 HU^a/mg、フィチン酸 0.63～2.74%、ラフィノース 0.11～1.28%、スタキオース 1.21～6.30%、トリプシンインヒビター 19.6～118.7 TIU^b/mg である（参照 3）。

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 FG72 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 FG72 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 FG72 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 FG72 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 FG72 は、*2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336* 遺伝子の導入によって、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質が発現することが宿主との相違点である。

以上、1～6 から、ダイズ FG72 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。

^a HU : hemagglutinating unit

^b TIU : trypsin inhibitor unit

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 FG72 は、導入された *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfw336* 遺伝子が 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質を発現することによって、除草剤グリホサート及び除草剤イソキサフルトールの影響を受けずに生育することができることとされている。

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 (*Glycine max*(L.) Merr.) の Jack 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* 属には、*Glycine* 亜属と *Soja* 亜属があり、ダイズの祖先であると考えられるツルマメは、*Soja* 亜属に属している。現在では世界各地域に適応した品種の育成が行われている。

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。

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り、 β -コングリシニンの α -サブユニット、脂質貯蓄のための細胞小器官であるダイズオイルボディに関連する糖タンパク質及びビシリン様糖タンパク質等が知られている（参照4）。

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、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、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が存在しているが、現在では食用に供されることはない。

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 FG72 の作出に使用したプラスミド pSF10 の構築には、プラスミド pMCS5 が用いられた。

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

プラスミド pMCS5 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pMCS5 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

プラスミド pMCS5 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

プラスミド pMCS5 には、アンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pMCS5 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

2mepsps 遺伝子の供与体は、トウモロコシ (*Z. mays*) である。*hppdPfw336* 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

2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays*) は、長期にわたり食料や飼料として安全に摂取されてきた。

hppdPfw336 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* は自然界に広く存在し、魚類及び無脊椎動物に感染するがヒトへは病原性を持たない。米国において、*P. fluorescens* は生物農薬として安全に使用されている。

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

2mepsps 遺伝子は、トウモロコシ (*Z. mays*) からクローニングされた *epsps*

遺伝子の塩基配列に基づき、5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS タンパク質) の 102 番目のアミノ酸をトレオニンからイソロイシンに、106 番目のアミノ酸をプロリンからセリンに置換するために変異を導入して改変した。

hppdPfw336 遺伝子は、*P. fluorescens* からクローニングされた *hppd* 遺伝子の塩基配列に基づき、*p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (HPPD タンパク質) の酵素活性部位が存在する C-末端の様々な箇所に変異を導入してスクリーニングをし、HPPD 阻害型除草剤に対して最も耐性が高かった 336 番目のグリシンをトリプトファンに置換するための変異を導入して改変した (参照 5)。

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

2mepsps 遺伝子及び *hppdPfw336* 遺伝子の塩基数、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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *2mepsps* 遺伝子

2mepsps 遺伝子がコードする 2mEPSPS タンパク質は、EPSPS タンパク質を改変し、グリホサートに対する結合親和性を低下させている。その結果、除草剤グリホサートの存在下でも EPSPS 活性を示すことができる。

2mEPSPS タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^cを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 6)。

・ *hppdPfw336* 遺伝子

HPPD タンパク質は、微生物、植物及び哺乳動物のチロシン代謝経路において、4-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (4-HPP) と 1 分子の酸素からホモゲンチジン酸 (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イソキサフルトール-ジケトニトリル体 (2-シアノ-3-シクロプロピル-4-(2-メチルスルホニル-4-トリフルオロメチルフェニル)プロパン 1,3-ジオン) (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。イソキサフルトールは、酵素によらない開環反応により植物体内でほぼ完全に DKN に代謝される。HGA は、チロシン代謝経路に入る他、プラストキノン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。

^c Uniprot_Swissprot (56.3 版, 2008)、Uniprot_TrEMBL (38.6 版, 2008)、PDB (2007 版)、DAD (44.0 版, 2008) 及び Genpept (166 版, 2008) 全てのデータベース。

hppdPfw336 遺伝子がコードする HPPD W336 タンパク質は、HPPD タンパク質のアミノ酸配列の一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 W336 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。

HPPD W336 タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^dを用いて blastp 検索を行った。その結果、ヒトへの感染力をもつ病原性細菌 *Vibrio vulnificus* 由来の VLLY タンパク質と 54%、また、*Legionella pneumophila* 由来の LLY タンパク質と 49~50%の相同性が認められた。これらのタンパク質は HPPD ファミリーに属し溶血素との注釈があるが、これらの細菌の溶血活性の直接的な原因とは結論されていない（参照 7, 8, 9, 10）。

(4) 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

プラスミド pSF10 には、アンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が含まれているが、ダイズ FG72 には検出されないことがサザンブロット分析によって確認されている（参照 11, 12）。

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

2mepsps 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域である Ph4a748 プロモーターである（参照 13）。

hppdPfw336 遺伝子のプロモーターは、*2mepsps* 遺伝子のプロモーターに用いた Ph4a748 の内部配列を重複させプロモーター活性を高めた Ph4a748ABBC プロモーターである（参照 13）。

(2) ターミネーターに関する事項

2mepsps 遺伝子のターミネーターは、シロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域由来の 3' *histonAt* である（参照 13）。

hppdPfw336 遺伝子のターミネーターは、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のプラスミド pTiT37 の T-DNA より得たノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域である 3' *nos* である（参照 14）。

(3) その他

2mepsps 遺伝子の Ph4a748 プロモーター下流にシロイヌナズナ (*A. thaliana*) のヒストン H3.Ⅲ第Ⅱ遺伝子の第一イントロン (*Intron1 h3At*) を

^d Uniprot_Swissprot (2010-06 版)、Uniprot_TrEMBL(2010-06 版)、PDB(20091117 版)、DAD(48 版)及び Genpept(175 版)全てのデータベース。

結合させて植物の生長増殖組織での発現を高めた（参照 13）。

hppdPFW336 遺伝子の転写活性を高めるために、Ph4a748ABBC プロモーター下流に *Tabacco etch virus* のリーダー配列（5' tev）（参照 15）を連結させた。

成熟型 2mEPSPS タンパク質及び成熟型 HPPD W336 タンパク質を色素体に輸送するためにヒマワリ (*Helianthus annuus*) 及びトウモロコシ (*Z. mays*) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列 (TPotp C 及び TPotp Y)（参照 16）をそれぞれ *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPFW336* 遺伝子の上流に結合させた（参照 16）。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

2mepsps 遺伝子発現カセット及び *hppdPFW336* 遺伝子発現カセットをベクター-pMCS5 に挿入することによってプラスミド pSF10 が構築された。プラスミド pSF10 を制限酵素 *SaI*I で処理することにより、挿入 DNA 断片を得た。

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

挿入 DNA 断片の塩基数、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。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現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

挿入 DNA 断片の全ての塩基配列は明らかになっており、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 (ORF) は含まれていない（参照 17）。

(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発現ベクター上で明らかであること

2mepsps 遺伝子発現カセット及び *hppdPFW336* 遺伝子発現カセットを含む挿入 DNA 断片をパーティクルボンバードメント法により宿主に導入した。

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

挿入 DNA 断片に含まれる各要素はすべて純化されており、目的外の遺伝子の混入はない。

表1 ダイズ FG72 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
(hppdPFW336 遺伝子発現カセット)	
3' nos ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) のプラスミド pTiT37 の T-DNA より得たノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域
hppdPFW336	<i>P. fluorescens</i> 由来の改変 HPPD W336 タンパク質をコードする遺伝子
TPotp Y	成熟型 HPPD W336 タンパク質を色素体に輸送するために、ヒマワリ (<i>H. annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列 (TPotp C) の 55 番目のアミノ酸システインをチロシンへ置換
5' tev	Tabacco etch virus のリーダー配列
Ph4a748ABBC プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域である Ph4a748 の内部配列を重複させたもの。
(2mepsps 遺伝子発現カセット)	
Ph4a748 プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子のプロモーター領域配列
Intron1 h3At	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H3.III 第 II 遺伝子の第一イントロン
TPotp C	2mEPSPS タンパク質を色素体に輸送するために、ヒマワリ (<i>H. annuus</i>) 及びトウモロコシ (<i>Z. mays</i>) の RuBisCo 小サブユニット遺伝子由来の色素体輸送ペプチドの配列を基に合成した配列
2mepsps	トウモロコシ (<i>Z. mays</i>) 由来の 2mEPSPS タンパク質をコードする遺伝子
3' histoneAt ターミネーター	ターミネーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) のヒストン H4 遺伝子の 3' 非翻訳領域を含む配列

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

宿主の未熟胚から誘導したカルス塊に挿入 DNA 断片をパーティクルボンバードメント法により導入した後、DKN を含む培地で選抜して再生個体を得た。次に、後代をグリホサート耐性により選抜した。さらに、ホモ系統を選抜後、一般的なダイズの育成プロセスにしたがって自殖を行い、ダイズ FG72 を得た。

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 FG72 のゲノムに挿入された DNA 断片のコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った (参照 18)。その結果、2 コピーの挿入 DNA 領域 (*2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPFW336* 遺伝子発現カセット) が導入されていることが確認された。

また、ダイズ FG72 に挿入された DNA の塩基配列 (15,163 bp)、5'末端側近傍配列 (1,451 bp) 及び 3'末端側近傍配列 (1,192 bp) について、塩基配列を決定した結果、ほぼ完全な *2mepsps* 遺伝子発現カセット及び *hppdPFW336* 遺伝子発現カセットが順位に反復されて挿入され、この挿入 DNA の 5'側と宿主ゲノムとの間に 2 つの 3'histonAt 断片が逆位で反復して挿入されていた。また、3'側と宿主ゲノムとの間に 24 bp の DNA 断片の挿入が、さらに挿入 DNA 領域外の 3'側の下流に 158 bp の Ph4a748 プロモーター断片の挿入が確認された (参照 19)。

なお、ダイズ FG72 の作出にあたってはプラスミド pSF10 を制限酵素で処理後、挿入 DNA 断片を精製して形質転換に用いていることから、プラスミド pSF10 の挿入 DNA 領域外がダイズ FG72 に含まれる可能性は低い。ダイズ FG72 のゲノムにプラスミド pSF10 の外骨格領域が挿入されていないことを確認するために、サザンブロット分析及び PCR による遺伝子解析を行った。その結果、プラスミド pSF10 の外骨格領域が挿入されていないことが確認された (参照 20, 21)。

ダイズ FG72 の挿入 DNA 領域の 5'側近傍配列及び 3'側近傍配列を宿主ゲノム配列と比較した結果、挿入 DNA 部位の 3'側ゲノム一部領域がさらに下流側に転座し、158 bp からなるプロモーター Ph4a748 断片が転座配列領域の 3'末端に挿入されたことが確認された。ダイズ FG72 の挿入 DNA 領域の 5'側近傍配列 1,156 bp 及び 3'側近傍配列 1,123 bp、転座領域の 5'側接合部 (下流 1,080 bp 及び上流 1,166 bp) 並びに 3'側接合部 (下流 1,148 bp 及び上流 1,128 bp) は宿主ゲノム配列と一致した。また、挿入 DNA の導入による 25 bp の欠失及び転座による 2 bp の欠失が確認された (参照 22)。

DNA 挿入によって内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、宿主ゲノムの 3ヶ所の DNA 挿入部位周辺配列 [①2,303 bp (5'側 : 1,166 bp、3'側 : 1,137 bp)、②2,991 bp (5'側 : 1,798 bp、欠失 25 bp、3'側 : 1,168 bp) ③2,212 bp (5'側 : 1,080 bp、欠失 2 bp、3'側 : 1,030 bp)] について、六つの読み枠で blastx アルゴリズムを用いてデータベース^eに登録されている既知タンパク質との相同性検索を行った。その結果、転座した領域の 5'側に推定シス

^e Uniprot_TrEMBL (38.6 版, 2008)、PDB (2007 版)、DAD、Genpept 及び Uniprot の全てのデータベース。

テインプロテアーゼ遺伝子の 5'末端側の一部配列との相同性が確認された。しかし、この遺伝子は DNA 挿入部位や境界領域を跨いでおらず、さらに、宿主品種及びダイズ FG72 いずれにおいても発現が確認されたことから、DNA 挿入によってこのダイズ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 (参照 22, 23)。

(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 FG72 の挿入 DNA 及びゲノム一部配列の転座により新たに生じる境界部において、意図しない ORF が生じていないことを確認するために、GetORF (EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Site) を用いて六つの読み枠において検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 8 アミノ酸以上の ORF が 350 個見いだされた。

検出された ORF と既知の毒素タンパク質との相同性の有無を確認するために、データベース^fを用いて相同性検索を行った結果、相同性を示す配列は、毒性タンパク質ではないか、毒性タンパク質と一致してもアミノ酸配列が短いか、配列の相同性が低いことから既知の毒素タンパク質と類似性を示さないと考えられた。また、既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^gを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す配列及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった (参照 17)。

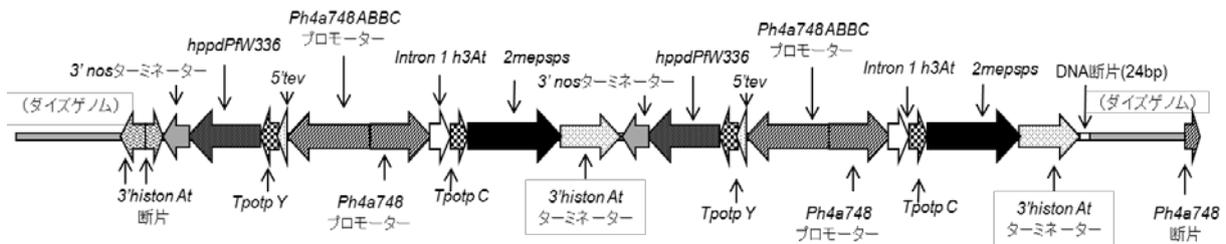


図 1 ダイズ FG72 に挿入された DNA (模式図)

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 FG72 の葉、茎、根及び種子における 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した。結果は表 2 のとおりである (参照 24, 25, 26)。

^f Bayer toxin database: NCBI non-redundant protein database で検索し、抽出した 28134 配列を含む。

^g AllergenOnline (14 版): タンパク質のアレルギー誘発性及び食物アレルギーを根拠に抽出された NCBI 及び IUIS の配列からなるデータベース。

表2 ダイズ FG72 における 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 新鮮重量)

分析組織*	2mEPSPS タンパク質		HPPD W336 タンパク質	
	無散布	除草剤散布**	無散布	除草剤散布**
葉	153.6~201.5	155.5~195.2	3.61~5.67	2.91~6.06
根	4.89~21.51	20.05	0.84~0.87	0.83
種子	130~198.8	140~216.5	0.85~0.93	0.80~0.99

* 葉は第 5,6 複葉期及び莢伸長初期、根は第 5,6 複葉期、種子は収穫後で未加工の種子における値を示した。

** 除草剤グリホサート及びイソキサフルトールを処理したサンプル

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

日本人一人が一日あたりに摂取する「大豆・加工品」の平均摂取量 50.3 g（参照 27）を全てダイズ FG72 に置き換えて計算すると、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の一人一日あたりの予想平均摂取量はそれぞれ 12.10 mg 及び 0.0553 mg となり、一人一日あたりのタンパク質平均摂取量 67.0 g（参照 28）に占める割合は 1.8×10^{-4} 及び 8.3×10^{-7} 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考えられる。

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

2mepsps 遺伝子の供与体であるトウモロコシ (*Z. mays*) に関して、アレルギー誘発性の報告はない。また、*hppdPFW336* 遺伝子の供与体である *P. fluorescens* 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

2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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

E. coli で発現させた 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両タンパク質とも、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 28, 29）。

② 人工腸液に対する感受性

*E. coli*で発現させた 2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始直後に速やかに消化されることが確認された（参照 30, 31）。

③ 加熱処理に対する感受性

・ 2mEPSPS タンパク質

*E. coli*で発現させた 2mEPSPS 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に、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、加熱処理後の抗体との結合性の残存及び凝集が生じる可能性が示唆された（参照 32）。そこで、2mEPSPS タンパク質の加熱による酵素活性の変化を測定した結果、酵素活性は 20°C から 60°C までは増加し、60°C 以上では急激に減少し 75°C で失活した。また、60°C で約 10 分の加熱で失活することが確認された（参照 33）。

・ HPPD W336 タンパク質

*E. coli*で発現させた HPPD W336 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に、60、75 及び 95°C で 10、30 及び 60 分間の加熱処理後、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、いずれの加熱温度・処理時間においても多量体と思われるバンドが確認された以外、加熱処理に対して安定であった（参照 34）。さらに、*E. coli*で発現させた HPPD W336 タンパク質を 4、25、37、55、75 及び 95°C で 30 分間処理し、ELISA 法にて分析した結果、HPPD W336 タンパク質の免疫反応性は、55°C の加熱処理で 29.0% となり 75°C 及び 95°C の加熱処理では定量限界値以下となった（参照 35）。したがって、HPPD W336 タンパク質は加熱処理に対して安定ではなく、タンパク質の高次構造が変化し、抗体との結合性が低下することが示されたとしている。

また、HPPD W336 タンパク質の加熱による酵素活性の変化を測定した結果、45°C では 20 分後に活性が 50% 以下に低下し、60°C 及び 95°C では 2.5 分以内に失活した（参照 36）。

- (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。）との構造相同性に関する事項
2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 タンパク質と既知のアレルゲン等との構造相同性の有無を確認するために、FASTA アルゴリズムを用いてアレルゲンデータベース^hに登録されている全てのアレルゲンとの相同性検索を行

^h 2mEPSPS タンパク質：AllergenOnline（11 版 2011）データベース、HPPD W336 タンパク質：AllergenOnline（10 版 2010）データベース。

った。その結果、両タンパク質ともに、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった（参照 37, 38）。

また、抗原決定基の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^hを用いて相同性検索を行った結果、両タンパク質ともに、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致する配列は見いだされなかった（参照 37, 38）。

上記、（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、2mEPSPS タンパク質及び HPPD W336 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 FG72 に挿入された *2mepsps* 遺伝子及び *hppdPfW336* 遺伝子の安定性を確認するために、4 世代のダイズ FG72 について、サザンブロット分析を行った。その結果、各世代において共通のバンドが検出され、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 39）。

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

・ 2mEPSPS タンパク質

2mEPSPS タンパク質は、基質である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）と高い基質特異性を有することが示されている。また、2mEPSPS タンパク質の産生により、EPSPS タンパク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。したがって、2mEPSPS タンパク質の作用機作は独立しており、植物の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

・ HPPD W336 タンパク質

HPPD W336 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ことから、HGA の上流のアミノ酸、HGA 含量及び下流の代謝産物に対する影響を考察した。HGA の上流に位置するチロシン並びにチロシン生合成に関与しているフェニルアラニン及びトリプトファンの含量は、ダイズ FG72 と非組換えダイズ（宿主 Jack）の間に統計学的有意差はなく、ダイズ FG72 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生合成に関連するアミノ酸含量や関連する代謝経路に影響はないとしている。非組換えダイズ及びダイズ FG72 の HGA 含量を測定した結果、いずれも定量限界値（2.00 ppm）未満であった（参照 40）ことから、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、ダイズ FG72 においても同様であった。また、HGA の下流の代謝産物については、ダイズ FG72 の α -トコフェロール、 γ -トコフェロール及

び総トコフェロールは、対照の非組換えダイズと比較して統計学的有意に増加していたが、測定値が文献の範囲内であった（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 41）。したがって、HPPD W336 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 W336 タンパク質の基質特異性について、4-HPP 以外に植物体内で基質となる化合物の有無を確認するため、植物体内に存在し、HPPD タンパク質の基質となることの報告がある（参照 42）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-チアヘキサノン酸（KMTB））について検討がなされた。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 W336 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 W336 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 43）。

以上のことから、HPPD W336 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 FG72 の種子及び非組換えダイズの種子について、主要構成成分、ミネラル類、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類及び栄養阻害物質等の分析を行い、統計学的有意差について検討が行われた（参照 3）。ダイズ FG72 は、除草剤グリホサート及びイソキサフルトールを散布した処理区も設定した。

(1) 主要構成成分

主要構成成分（タンパク質、脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維）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文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル類

ミネラル類 6 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文献値の範囲内であった。ナトリウムについては、文献値の範囲を超えるものがあったが、その差は僅かであり、含有量は少なかった。

(3) アミノ酸組成

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

との間に統計学的有意差が認められなかった。

(4) 脂肪酸組成

脂肪酸 10 種類について分析を行った結果、殆どのサンプルが検出限界未満のため統計学的処理ができなかった 1 種類を除き、8 種類は対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたが、文献値の範囲内であった。リグノセリン酸 (C24:0) は、除草剤未処理区では対象に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められなかったが、除草剤処理区で統計学的有意差が認められ、文献値を超えていたが、その差は僅かであった。

(5) ビタミン類

ビタミン類 10 種類について分析を行った結果、ビタミン A、 α -トコフェロール及び総トコフェロールは除草剤処理区及び未処理区で、ビタミン B1 及び葉酸は除草剤処理区で、 γ -トコフェロールは未処理区で、対照として用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められたが、文献値の範囲内であった。ビタミン B1、ビタミン B2、葉酸、ビタミン K 及び δ -トコフェロールの分析値は、非組換えダイズとの間に統計学的有意差が認められなかった。なお、 β -トコフェロールは定量限界値未満であった。

(6) 栄養阻害物質等

フィチン酸、ラフィノース、スタキオース、レクチン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文献値の範囲内であった。

イソフラボン類 (ダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン、ダイジン、グリシチン、ゲニスチン、総イソフラボン) について分析を行った結果、すべてのサンプルで定量限界値未満であったグリシテインを除く 6 種類で、対照に用いた非組換えダイズと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文献値の範囲内であった。

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のための申請が行われ、2012 年 8 月に確認が終了した。また、米国農務省 (USDA) に対して無規制裁培のための申請が行われ、2013 年 8 月に確認が終了した。

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の申請及びカナダ食品検査庁 (Canadian Food Inspection Agency) に飼料としての安全性審査及び環境放出許可の申請が行われ、それぞれ 2012 年 6 月に確認が終了した。

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、飼料及び輸入に係る安全性審査の申請が行われ、2012年2月に確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ FG72 の栽培方法は、生育時期を問わずに除草剤グリホサート及びイソキサフルトールを使用できる点を除いて、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 FG72 の種子の製法及び管理方法は、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までの事項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

「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」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、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. OECD. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and anti-nutrients. ENV/JM/MONO (2001) 15, 2001.
2. ILSI. Crop composition database-search results, ver.3.0. ILSI Crop compositional database-search. 2007.
3. R. Oberdörfer, 2011: Nutritional impact assessment report for the double-herbicide-tolerant soybean (transformation event FG72) (社内報告書)
4. Ogawa, T.; Samoto, M.; Takahashi, K. Soybean allergens and hypoallergenic soybean products. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 2000, 46, p.271-279.
5. 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. U.S. Patent US 6,245,968 B1, 2001-06-12.
6. A. Capt, 2008: 2mEPSPS protein; Amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
7. J.B. Rasclé, 2011: HPPD W336 protein; Amino acid sequence homology search with known toxins (社内報告書)
8. Rdest, U. Wintermeyer, E.; Ludwig B.; Hacker, J. Legiolysin, a new hemolysin from *L. pneumophila*. Zentralbl Bakteriol 1991, 274, p.471
9. Wintermeyer, E.; Flügel, M.; Ott, M.; Steinert, M.; Rdest, U.; Mann, K.-H.; Hacker, J. Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. Infection and Immunity. 1994, 62, 1109-1117.
10. Chang, T. M.; Chuang, Y. C.; Su, J. H.; Chang, M. C. Cloning and sequence analysis of a novel hemolysin gene (*vllY*) from *Vibrio vulnificus*. Applied and Environmental Microbiology. 1997, 63, p.3851-3857.
11. S. Verhaeghe, 2009: Confirmation of the absence/presence of vector backbone sequences in *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
12. S. Verhaeghe, 2010: Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
13. Chaboute, M.-E.; Chaubet, N.; Philipps, G.; Ehling, M.; Gigot, C. Genomic organization and nucleotide sequences of two histone H3 and two histone H4 genes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology. 1987, 8, p.179-191.
14. Depicker, A.; Stachel, S.; Dhaese, P.; Zambryski, P.; Goodman, H. M. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. Journal of Mol. Appl. Gen. 1982, 1, p.561-573.
15. Carrington, J. C.; Freed, D. D. Cap-independent enhancement of the translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. Journal of Virology. 1990, 64, 1590-1597.
16. Lebrun, M.; Leroux B.; Sailland A. Chimeric gene for the transformation of

- plants. U.S. Patent 5,510,471. 1996-04-23.
17. A. Capt, 2015: Soybean transformation event FG72. Identification and sequence homology search of open reading frame (ORF) sequences. version 2. (社内報告書)
 18. S. Verhaeghe, 2009: Detailed insert characterization of *Glycine max* transformation event FG72 by Southern blot analysis (社内報告書)
 19. S. Verhaeghe, 2010: Full DNA sequence of event insert and integration site of *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
 20. S. Verhaeghe, 2010: Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
 21. K. Mertens. 2014. Confirmation of the absence of vector backbone sequences in *Glycine max* FG72 generation T2. (社内報告書)
 22. S. Verhaeghe, 2009: Bioinformatics analysis of *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
 23. S. Verhaeghe. 2013. Expression analysis of a cysteine protease gene in *Glycine max* transformation event FG72 (社内報告書)
 24. T.C. Currier and A.M. Harbin, 2011: Analyses of the raw agricultural commodity of soybean event FG72 2mEPSPS protein. USA 2010 (社内報告書)
 25. M.R. Poe, 2011: Analyses of the raw agricultural commodity of soybean event FG72 for HPPD W336 and 2mEPSPS proteins. USA 2009 (社内報告書)
 26. C. Dharmasri and S. New. 2014. FG72 soybean-protein expression analyses of field samples grown in USA during 2013 (社内報告書)
 27. 厚生労働省 健康局総務課生活習慣病対策室 平成 23 年 国民健康・栄養調査報告, 第 1 部 栄養素等摂取状況調査の結果, 2013, p.52, 68.
 28. D. Rouquie, 2011: 2mEPSPS protein; *In vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid (社内報告書)
 29. J.B. Rasclé, 2009: HPPD W336 protein; *In vitro* digestibility study in human gastric fluid (社内報告書)
 30. D. Rouquie, 2011: 2mEPSPS protein; *In vitro* digestibility study in simulated intestinal fluid (社内報告書)
 31. J.B. Rasclé, 2009: HPPD W336 protein; *In vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid (社内報告書)
 32. D. Rouquie, 2007: 2mEPSPS protein; Heat stability study (社内報告書)
 33. M.L. Healy and E. Schönbrunn, 2006: Biochemical characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (wtEPSPS) and its mutated glyphosate-resistant form (2mEPSPS) (社内報告書)
 34. J.B. Rasclé, 2009: HPPD W336 protein; Heat stability study (社内報告書)
 35. T. Moore. 2013. The effect of temperature on microbially produced HPPDW336 assessed by ELISA. (社内報告書)
 36. V. Habex, 2011: The modified 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene

- product (HPPD W336) description and characterization (社内報告書)
37. J.B. Rascle, 2011: 2mEPSPS protein; Amino acid sequence homology search with known allergens (社内報告書)
 38. J.B. Rascle, 2011: HPPD W336 protein; Amino acid sequence homology search with known allergens (社内報告書)
 39. S. Verhaeghe, 2009: Structural stability analysis of *Glycine max* event FG72 in different generations, in different backgrounds and when grown in different environments (社内報告書)
 40. S. J.W. Mackie. 2012. Homogentisic acid composition of seed from FG72 soybean and its non-transgenic counterpart. USA. 2011. (社内報告書)
 41. Clarke, J.D.; Alexander, D.C.; Ward, D.P.; Ryals, J.A.; Mitchell, M.W.; Wulf, J.E.; Guo, L. Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. Scientific Reports 2013, 3, 3082, 1-6. Supplemental Material p.12.
 42. R. Dreesen. 2015. Literature survey on potential alternative substrates for HPPD.
 43. R. Dreesen. 2015. Substrate specificity of the wild type HPPD and HPPD W336 proteins from *Pseudomonas fluorescens*. (社内報告書)