

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

p-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及び除草剤グルホシネー
ト耐性ダイズ SYHT0H2 系統

2016年2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
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.....	6
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.....	7
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.....	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.....	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.....	9
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.....	11
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.....	13
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.....	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.....	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.....	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.....	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.....	19
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>

- 2013年8月22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0822第1号）、関係書類の接受
- 2013年8月26日 第486回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2013年9月6日 第118回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2015年1月25日 第145回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年2月16日 第595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>

- | | | |
|--------------|--------------|-------|
| 2013年9月30日まで | 2015年9月30日まで | |
| 澤田 純一（座長） | 澤田 純一（座長） | |
| 鎌田 博（座長代理） | 小関 良宏（座長代理） | |
| 五十君 静信 | 宇理須 厚雄 | 手島 玲子 |
| 宇理須 厚雄 | 岡田 由美子 | 中島 春紫 |
| 橘田 和美 | 橘田 和美 | 飯 哲夫 |
| 児玉 浩明 | 児玉 浩明 | 和久井 信 |
| 澁谷 直人 | 近藤 一成 | |

2015年10月1日から

- | | |
|-------------|-------|
| 澤田 純一（座長） | |
| 小関 良宏（座長代理） | |
| 岡田 由美子 | 中島 春紫 |
| 橘田 和美 | 樋口 恭子 |
| 児玉 浩明 | 飯 哲夫 |
| 近藤 一成 | 山川 隆 |
| 柘植 郁哉 | 和久井 信 |
| 手島 玲子 | |

要 約

「*p*-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及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 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、エンバク (*Avena sativa* L.) に由来する改変 *p*-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 (*avhppd-03* 遺伝子) 及び *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 株に由来する 2 個の改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (改変 *pat* 遺伝子) を導入して作出されており、改変 *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ (AvHPPD-03 タンパク質) 及びホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ (PAT タンパク質) を発現することで、*p*-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及び除草剤グルホシネート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、「*p*-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及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 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：p-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及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 系統

性質：p-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、除草剤グルホシネート耐性

申請者：シンジェンタジャパン株式会社、バイエルクロップサイエンス株式会社

開発者：Syngenta Seeds, Inc. on behalf of Syngenta Crop Protection AG and its affiliates（スイス）、Bayer CropScience（ドイツ）

「p-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及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 系統」（以下「ダイズ SYHT0H2」という。）は、エンバク（*Avena sativa* L.）に由来する改変 p-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（*avhppd-03* 遺伝子）及び *Streptomyces viridochromogenes* Tü494 株に由来する 2 個の改変ホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *pat* 遺伝子：*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子）を導入して作出されており、改変 p-ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼ（AvHPPD-03 タンパク質）及びホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（PAT タンパク質）を発現することで、p-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及び除草剤グルホシネート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

avhppd-03 遺伝子の供与体はエンバク（*Avena sativa* L.）であり、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の供与体は *S. viridochromogenes* Tü494 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

avhppd-03 遺伝子は、p-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を付与する AvHPPD-03 タンパク質を発現する。また、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する PAT タンパク質を発現する。

avhppd-03 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、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（参照1）。

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 33.19～45.48%、脂質 8.10～23.56%、灰分 3.89～6.99%、炭水化物 29.6～50.2%である（参照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 0.06～2.45 mg/g、グリシテイン 0.31 mg/g 以下、ゲニステイン 0.14～2.84 mg/g、レクチン 0.11～9.04 HU^a/mg、フィチン酸 0.63～1.96%、ラフィノース 0.21～0.66%、スタキオース 1.21～3.50%、トリプシンインヒビター 19.59～118.68 TIU^b/mg である（参照2）。

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 SYHT0H2 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 SYHT0H2 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 SYHT0H2 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 SYHT0H2 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。

^a HU : hemagglutinating unit

^b TIU : trypsin inhibitor unit

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 SYHT0H2 は、*avhppd-03* 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の導入によって、AvHPPD-03 タンパク質及び PAT 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 SYHT0H2 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 SYHT0H2 は、導入された *avhppd-03* 遺伝子が AvHPPD-03 タンパク質を発現し、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子が PAT タンパク質を発現することによって、*p*-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（HPPD 阻害型除草剤）及び除草剤グルホシネート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* 属のツルマメがダイズの祖先であると考えられている。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、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 3）。

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食物の一つである。Gly m 1、Kunitz トリプシンインヒビター、P34、Gly m 5（ β -コングリシン）及び Gly m 6（グリシン）などはダイズの主要アレルゲンであると報告されている（参照 4、5）。

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には、トリプシンインヒビターなどの有害生理活性物質が含まれている。

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 SYHT0H2 の作出に使用した導入用プラスミド pSYN15954 の構築には、pNOV2114 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 pNOV2114 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 pNOV2114 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 pNOV2114 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 pNOV2114 には、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシンに耐性を付与する *spec* (*aadA* 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 pNOV2114 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

avhppd-03 遺伝子の供与体は、エンバク (*A. sativa* L.) である。*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の供与体は、*S. viridochromogenes* Tü494 株であ

る。

(2) 安全性に関する事項

エンバクは穀物の一つであり、オートミールの原料等として用いられており、ヒトでの食経験を有している。

S. viridochromogenes は、ヒトや家畜に対して病原性を有するという報告はない（参照 6）。

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

avhppd-03 遺伝子は、エンバクからクローニングされ、ダイズでの発現が最適となるように塩基配列を改変し、人工合成された遺伝子である。なお、クローニングの過程で、エンバクの野生型 *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）における 109 または 110 番目のアラニンが欠失している。

pat-03-01 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、*S. viridochromogenes* Tü494 株由来の *pat* 遺伝子の塩基配列に基づき、発現タンパク質のアミノ酸配列を改変せずに、植物での発現が最適となるように塩基配列を改変したものである。*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子は、同じ制限酵素認識部位を持たないようにするため塩基が 2 個異なるが、コードするアミノ酸配列は同一である（参照 7）。

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

avhppd-03 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 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

・ *avhppd-03* 遺伝子

avhppd-03 遺伝子は、AvHPPD-03 タンパク質をコードする。AvHPPD-03 タンパク質は、エンバク内在性の HPPD タンパク質と比べて 1 アミノ酸が欠失しているが、この欠失部位は酵素の活性中心ではないため、機能は同等であるとしている。

HPPD タンパク質は、チロシン代謝経路におけるフマル酸、アセト酢酸、プラストキノン及びビタミン E の生成に必要なホモゲンチジン酸 (HGA) の生成を触媒する酵素である。メソトリオン等の HPPD 阻害型除草剤は、HPPD タンパク質の酵素活性を阻害するため、植物はホモゲンチジン酸を生成できずに枯死する。

AvHPPD-03 タンパク質は、ダイズ内在性の HPPD タンパク質と比較して

HPPD 阻害型除草剤との結合親和性が低いことから、HPPD 阻害型除草剤の存在下においても、ダイズ内在性の HPPD タンパク質に代わって AvHPPD-03 タンパク質が酵素活性を示し、ホモゲンチジン酸生成を触媒する。その結果、ダイズ SYHT0H2 は、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（参照 10）。

植物内在性の HPPD タンパク質は植物種により HPPD 阻害型除草剤との結合親和性が異なっていることから、ダイズ SYHT0H2 において内在性の HPPD タンパク質はメソトリオンに阻害されるが、エンバク由来の AvHPPD-03 タンパク質は阻害されずに除草剤耐性を示す。エンバク内在性 HPPD タンパク質のメソトリオンとの結合親和性をダイズ内在性 HPPD タンパク質と比較した結果、エンバク内在性 HPPD では解離定数 (K_d) が 11,500 pM であり、ダイズ内在性 HPPD の 42 pM より大きいことが確認されており、結合親和性が低いことが示されている（参照 8, 9）。

AvHPPD-03 タンパク質と既知の毒性タンパク質との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、*E*-value が 0.4 以下のアミノ酸配列が 1,394 個見いだされたが、多種生物由来の HPPD 類似タンパク質が大部分であり、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 11）。

・ *pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子

pat-03-01 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子が PAT タンパク質を発現することによって、グルタミン合成酵素を阻害する除草剤グルホシネートの存在下でもグルタミン合成酵素活性を示すことができる。その結果、ダイズ SYHT0H2 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる。

PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、5 個のデータベース^d及び毒性タンパク質データベース^eを用いて **FASTA** 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 12）。

(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 pSYN15954 には、ストレプトマイシン及びスペクチノマイシン耐性を付与する *spec* 遺伝子が含まれているが、ダイズ SYHT0H2 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。

^c National Center for Biotechnology Information (NCBI) Entrez® Protein Database, 2012

^d Uniprot_Swissprot (2012.01 版)、Uniprot_TrEMBL (2012.01 版)、PDB(2011.11 版)、DAD(57 版)及び GenPept (185 版)

^e Uniprot_Swissprot、Genpept の両データベースからキーワード検索で抽出された配列と、Animal Toxin Database に由来する配列を基に構築されたデータベース (version 1.1)

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

avhppd-03 遺伝子のプロモーターは、Cestrum yellow leaf curling virus 由来の TATA box 配列 (参照 13) 及びカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 由来の 35S プロモーター (参照 14) を組み合わせた SMP (Synthetic minimal plant promoter) である。

pat-03-01 遺伝子のプロモーターは、CaMV 由来の 35S プロモーター (参照 14) である。*pat-03-02* 遺伝子のプロモーターは、Cestrum yellow leaf curling virus 由来の CMP 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

avhppd-03 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子のターミネーターは、いずれも *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 由来のノパリン合成酵素遺伝子のポリアデニル化配列である NOS ターミネーターである (参照 15)。

(3) その他

avhppd-03 遺伝子の転写活性を高めるために、Figwort mosaic virus (FMV) 由来のエンハンサー領域 (参照 16) 及びカリフラワーモザイクウイルス由来のエンハンサー領域 (35S エンハンサー) (参照 14) が使用された。

avhppd-03 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の翻訳活性を高めるために、Tobacco mosaic virus (TMV) 由来の 5' 非コード領域のリーダー配列である TMV エンハンサーが用いられた (参照 17)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

avhppd-03 遺伝子発現カセット、*pat-03-01* 遺伝子カセット及び *pat-03-02* 遺伝子カセットを pNOV2114 に挿入することによって導入用プラスミド pSYN15954 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 pSYN15954 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

導入用プラスミド pSYN15954 の T-DNA 領域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。この領域の各遺伝子要素の接合部に関して 30 アミノ酸以

上のアミノ酸配列からなる意図しない ORF が存在しないかを六つの読み枠について検索した結果、160 個の ORF が検出されたが、既知のアレルゲン及び毒素タンパク質との相同性は認められなかった（参照 18）。

(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

導入用プラスミド pSYN15954 の意図する挿入領域は、右側境界領域 (RB) から左側境界領域 (LB) までの T-DNA 領域である。

(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

導入用プラスミド pSYN15954 の塩基配列は明らかになっており、目的外の遺伝子の混入はない。

表1 ダイズ SYHT0H2 への挿入 DNA

構成 DNA	由来及び機能
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
(avhppd-03 遺伝子発現カセット)	
FMV エンハンサー	Figwort mosaic virus (FMV)由来のエンハンサー
35S エンハンサー	カリフラワーモザイクウイルス由来の 35S エンハンサー
SMP プロモーター	プロモーター領域 Cestrum yellow leaf curling virus 由来の TATA box 配列およびカリフラワーモザイクウイルス由来の 35S プロモーターを組み合わせた植物で機能する必要最小限の合成プロモーター。
TMV エンハンサー	Tobacco mosaic virus (TMV)由来の 5' 非翻訳領域リーダー配列
avhppd-03	エンバク (<i>A. sativa</i> L.) 由来の改変 <i>p</i> -ヒドロキシフェニルピルビン酸ジオキシゲナーゼをコードする遺伝子
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 nopaline synthase 遺伝子由来のターミネーター配列
(pat-03-01 遺伝子発現カセット)	
35S プロモーター	プロモーター領域 カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーター
pat-03-01	<i>S. viridochromogenes</i> Tü494 株由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子

<i>NOS</i> 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 nopaline synthase 遺伝子由来のターミネーター配列
(pat-03-02 遺伝子発現カセット)	
<i>CMP</i> プロモーター	プロモーター領域 Cestrum yellow leaf curling virus 由来のプロモーター及びリーダー配列
<i>TMV</i> エンハンサー	Tobacco mosaic virus (TMV)由来の 5' 非翻訳領域リーダー配列
<i>pat-03-02</i>	<i>S. viridochromogenes</i> Tü494 株由来の PAT タンパク質をコードする遺伝子
<i>NOS</i> 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 nopaline synthase 遺伝子由来のターミネーター配列
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>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) 由来の DNA 領域

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 pSYN15954 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、グルホシネートを含む培地で選抜して再生個体を得た。次に、再分化個体の遺伝子解析により目的の遺伝子が導入されていることを確認後、一般的なダイズの育成プロセスに従って自殖を行い、ダイズ SYHT0H2 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 SYHT0H2 のゲノムに挿入された *avhppd-03* 遺伝子発現カセット及び *pat-03-01* 遺伝子発現カセットのコピー数を確認するため、サザンブロット分析及び遺伝子解析による挿入遺伝子の塩基配列の決定を行った(参照 19, 20)。その結果、導入用プラスミド pSYN15954 の T-DNA 断片が 44 bp の DNA 配列を挟んで逆方向に 2 つ挿入されていることが確認された。この挿入された 44 bp の塩基配列は、*avhppd-03* 遺伝子の配列と類似していた。

5' 末端側の T-DNA 断片は、プロモーターが一部欠失した *pat-03-01* 遺伝子発現カセット及び *pat-03-02* 遺伝子発現カセットを含んでおり、*avhppd-03* 遺伝子発現カセットは存在しなかった。3' 末端側の T-DNA 断片は、*avhppd-03* 遺伝子発現カセット、プロモーター領域内部に 17 bp の DNA 配列が挿入された *pat-03-01* 遺伝子カセット及び *pat-03-02* 遺伝子発現カセットが存在し、*avhppd-03* 遺伝子発現カセットの *FMV* エンハンサー全てと *35S* エンハンサーの一部が欠失していた。また、いずれの T-DNA 断片にも左側境界領域及び右

側境界領域は存在しなかった。

導入用プラスミド pSYN15954 の外骨格領域が導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を行った結果、ダイズ SYHT0H2 のゲノム中に検出されないことが確認された（参照 20）。

ダイズ SYHT0H2 の挿入遺伝子の 5' 末端近傍配列（1,000 bp）及び 3' 末端近傍配列（1,000 bp）の塩基配列と宿主であるダイズゲノム配列を比較した結果、ダイズ SYHT0H2 ではダイズゲノム配列の 15 bp の欠失及び 3' 末端の 7 bp の DNA 断片の挿入を除き、ダイズゲノム配列と一致することが確認された（参照 21, 22）。

DNA 挿入によって宿主の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、5' 末端近傍配列（1,000 bp）及び 3' 末端近傍配列（1,000 bp）について、タンパク質データベース^fを用いて blastx 検索を行った。その結果、*E value* が 10 以下の既知のタンパク質が 5' 末端側で 1 個、3' 末端側で 8 個見いだされた。5' 末端側の配列はダイズ由来ではなく、また、3' 末端側で見いだされた 8 個の配列はダイズ由来の既知タンパク質と *E value* が $1 \times 10^{-18} \sim 0.002$ で相同性が認められたが、これらの相同性が見られる領域は挿入遺伝子と隣接しておらず、さらに 3' 末端側で見いだされた 8 個の配列に関連する配列が 5' 末端側に跨ってはいないことから、遺伝子導入によりダイズ内在性の既知遺伝子が損なわれたとは考えにくい（参照 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 SYHT0H2 の挿入遺伝子及び挿入遺伝子とその近傍配列と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、六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の連続する 30 アミノ酸以上の ORF が挿入遺伝子では 160 個、両近傍配列との接合部では 8 個の配列が見いだされた（参照 18, 24）。

これらの 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 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は見いだされなかった。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^gを用いて相同性検索を行った結果、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。既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、毒性タンパク質データベース^h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。

^f non-redundant GenBank CDS translation, SWISS-PROT, PIR, PRF, PDB.

^g Food Allergy Research and Resource Program (FARRP), version 12

^h NCBI Entrez® Protein Database (NCBI 2012)から構築した 23,302 配列

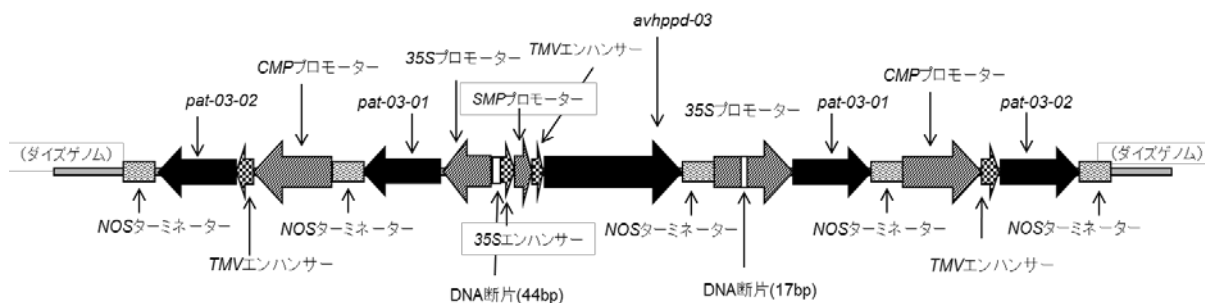


図1 ダイズ SYHT0H2 の挿入 DNA (模式図)

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

除草剤メソトリオン及び除草剤グルホシネートを散布して栽培したダイズ SYHT0H2 の葉、根、地上部、種子における AvHPPD-03 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析を行った。結果は表 2 のとおりである (参照 25)。

表 2 ダイズ SYHT0H2 における AvHPPD-03 タンパク質及び PAT タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重量)

分析組織*	AvHPPD-03 タンパク質	PAT タンパク質
葉	23.6~877.4	0.6~172.5
根	4.3~266.7	<LOD**~66.6
地上部	34.7~171.8	1.3~68.1
種子	0.4~28.4	<LOQ***~16.3

* 葉は 4,8,10 葉期及び子実肥大期、根は 8 葉期及び子実肥大期、地上部は子実肥大期、種子は成熟期の値を示した。

** 根での検出限界値 (LOD) は $0.06 \mu\text{g/g}$ 乾燥重量。

*** 種子での定量限界値 (LOQ) は $0.06 \mu\text{g/g}$ 乾燥重量。

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・大豆加工品」の平均摂取量 53.9 g (参照 26) をすべてダイズ SYHT0H2 に置き換えて計算すると、AvHPPD-03 タンパク質及び PAT タンパク質の一人一日当たりの予想平均摂取量はそれぞれ $426.3 \mu\text{g}$ 及び $209.7 \mu\text{g}$ となり、一人一日当たりのタンパク質平均摂取量 67.3 g (参照 26) に占める割合は 6.3×10^{-6} 及び 3.1×10^{-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

avhppd-03 遺伝子の供与体であるエンバクに関して、アレルギー誘発性の報告はない。また、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* 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

AvHPPD-03 タンパク質及び PAT タンパク質はヒトに対してアレルギーを誘発する可能性は極めて低いと結論されている。

(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 AvHPPD-03 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、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 27）。

E. coli で発現させた PAT タンパク質は、人工胃液中で速やかに分解されることが確認されている（参照 28）。

② 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた AvHPPD-03 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、試験開始後 1 分以内に消化され、分解物と考えられる 3 本のバンドも試験開始後 5 分以内に消失した（参照 29）。

E. coli で発現させた PAT タンパク質は、人工腸液中で速やかに分解されることが確認されている（参照 28）。

③ 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた AvHPPD-03 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、ELISA 法を用いて分析を行った。その結果、AvHPPD-03 タンパク質の免疫反応性は、65℃、30 分の加熱処理で 96.9% 失われ、95℃、30 分の加熱処理では定量限界値以下となった（参照 30）。

E. coli で発現させた PAT タンパク質は、90℃、30 分の加熱処理では分解しないことが示されている（参照 28）。PAT タンパク質の酵素活性は、55℃、30 分の加熱処理で失活することが確認されている（参照 31）。

(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

AvHPPD-03 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、アレルゲンデータベース⁸を用いて FASTA 検索を行った結果、80 以上の連続する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。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^gを用いて相同性検索を行った結果、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32）。

PAT タンパク質について同様の検索を行った結果、既知のアレルゲンと相同性を示す80以上の連続するアミノ酸配列はなく、また、相同性のある抗原決定基も存在しなかった（参照33）。

上記（1）～（4）及び前項3から総合的に判断し、AvHPPD-03 タンパク質及びPAT 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 SYHT0H2 における挿入遺伝子の分離様式を確認するために、3世代のダイズ SYHT0H2 について挿入遺伝子の分離比をPCR分析で調査した結果、ダイズ SYHT0H2 の挿入遺伝子はメンデルの分離の法則に基づいて後代に遺伝していることが示された（参照34）。

また、ダイズ SYHT0H2 に挿入された *avhppd-03* 遺伝子、*pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の安定性を確認するために、2世代のダイズ SYHT0H2 について、サザンブロット分析を行った結果、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35）。

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

AvHPPD-03 タンパク質は HPPD 阻害型除草剤によって阻害される内在性 HPPD タンパク質に代わり、チロシン代謝経路において *p*-ヒドロキシフェニルピルビン酸 (HPP) からホモゲンチジン酸 (HGA) への反応を触媒する酵素である。

AvHPPD-03 タンパク質の基質特異性を調査するために、植物体に存在すると考えられる HPP 類似化合物4種類（フェニルピルビン酸 (PP)、 α -ケトイソカプロン酸 (KIC)、 α -ケト- γ -メチルチオ酪酸 (KMTB) 及び3,4-ジヒドロキシフェニルピルビン酸 (3,4-dHPP)) 及び HPP を AvHPPD-03 タンパク質と反応させて、活性を比較した。その結果、KIC 及び KMTB では検出限界値 (0.3%) 未満であり、PP 及び 3,4-dHPP で僅かながら活性が認められたものの、HPP と比較して極めて低かった（参照36）。そのため、HPP が存在する植物体内では、これらの4種類の HPP 類似化合物 AvHPPD-03 タンパク質の基質となる可能性は低く、AvHPPD-03 タンパク質は HPP に高い基質特異性を有するとしている。

また、AvHPPD-03 タンパク質の発現による代謝経路への影響について、検討した。チロシン代謝経路において、HPPD タンパク質を単独で過剰に発現させた場合、下流の最終代謝産物であるトコフェロール及びプラストキノンの生成量への影響は大きくはないとの報告（参照37, 38, 39）及び HGA 生成の上流のチロシンの生合成は、チロシンによるフィードバック阻害により制御されているとの報

告(参照 40)があり、代謝経路に及ぼす影響は小さいと推察されている。さらに、HGA 及びその下流の代謝産物の分析を行い、検討がなされた。非組換えダイズ及びダイズ SYHT0H2 の HGA 含量を測定した結果、いずれも定量限界値(0.0002%新鮮重)未満であったことから、ダイズにおいて HGA は蓄積されず迅速に代謝され、ダイズ SYHT0H2 においても同様であることが示された(参照 41)。SYHT0H2 種子中の γ -トコフェロール及び δ -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、 α -トコフェロールは除草剤無散布区のみで有意に減少していたが、商業品種の分析値及び文献の範囲内であった(第6の7、参照 2)。また、フマル酸量においては、AvHPPD-03 タンパク質を発現する遺伝子組換えダイズ及び非組換えダイズに差異は認められなかった(参照 42)。

したがって、AvHPPD-03 タンパク質の発現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。

PAT タンパク質は、グルホシネートをアセチル化することによって、グルホシネートの除草剤としての機能を失わせる。その反応は L-グルホシネートに特異的で、類縁体との反応性は低く、生体内の L-アミノ酸に対する反応も認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

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 SYHT0H2 及び非組換えダイズについて、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 43)。

なお、ダイズ SYHT0H2 は、3~4 葉期に除草剤メソトリオン及びグルホシネートを散布した散布区及び無散布区で栽培された。また、同時に 6 種類の商業品種を栽培した。

(1) 主要構成成分

種子及び茎葉の主要構成成分(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、散布区及び無散布区において、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、その平均値は商業品種の分析値又は文献値の範囲内であった。

(2) ミネラル類

種子のミネラル類 5 種類について分析を行った結果、散布区及び無散布区において、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、商業品種の分析値又は文献値の範囲内であった。

(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、散布区及び無散布区において、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、その平均値は商業品種の分析値又は文献値の範囲内であった。

(4) 脂肪酸組成

種子の脂肪酸 22 種類について分析を行った結果、散布区及び無散布区において、9 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、商業品種の分析値又は文献値の範囲内であった。なお、13 種類の脂肪酸については、ダイズ SYHT0H2 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(5) ビタミン類

種子のビタミン類 13 種類について分析を行った結果、散布区及び無散布区の γ -トコフェロール及び δ -トコフェロール、散布区のビタミン K₁ 並びに無散布区の α -トコフェロールは、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、その平均値は商業品種の分析値及び文献値の範囲内であった。また、それ以外のビタミン類については、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。なお、4 種類のビタミンについては、ダイズ SYHT0H2 及び非組換えダイズともに定量限界未満であった。

(6) 栄養阻害物質等

種子のダイゼイン、グリシテイン、ゲニステイン、レクチン、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、散布区及び無散布区において、対照に用いた非組換えダイズとの間に統計学的有意差は認められなかった。

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及び米国農務省 (USDA) に対して無規制栽培のための申請が行われ、それぞれ 2014 年 3 月及び 4 月に安全性の確認が終了した。

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 (CFIA) に対して飼料としての安全性審査の申請が行われ、2014 年 5 月及び 6 月に安全性の確認が終了した。

オーストラリア・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、2014 年 2 月に安全性の確認が終了した。

9. 栽培方法に関する事項

ダイズ SYHT0H2 の栽培方法は、生育期間中に HPPD 阻害型除草剤及び除草剤グルホシネート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 SYHT0H2 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

「*p*-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及び除草剤グルホシネート耐性ダイズ SYHT0H2 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 2000. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 15: Consensus Document on the Biology of *Glycine max* (L) Merr. (Soybean). ENV/JM/MONO(2000)9.
2. ILSI 2010. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, v. 4.2.
3. OECD 2012. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 25. 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. ENV/JM/MONO(2012)24.
4. Maruyama N, Fukuda T, Saka S, Inui N, Kotoh J, Miyagawa M, Hayashi M, Sawada M, Moriyama T, Utsumi S. 2003. Molecular and structural analysis of electrophoretic variants of soybean seed storage proteins. *Phytochemistry* 64: 701-708.
5. Helm RM, Cockrell G, Connaughton C, Sampson HA, Bannon GA, Beilinson V, Livingstone D, Nielsen NC, Burks AW. 2000. A soybean G2 glycinin allergen. 1. Identification and characterization. *International Archives of Allergy and Immunology* 123: 205-212.
6. OECD 1999. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11: Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. ENV/JM/MONO(99)13.
7. *pat-03-01* 遺伝子及び *pat-03-02* 遺伝子の塩基配列とそれを翻訳したアミノ酸配列 (社内報告書)
8. Warner SAJ, Hawkes TR, Andrews CJ. 2002. Plant derived hydroxy phenyl pyruvate dioxygenases (HPPD) resistant against triketone herbicides and transgenic plants containing these dioxygenases. Syngenta Ltd, assignee. Patent No. WO 2002046387. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
9. Inhibition of Soybean HPPD by Mesotrione. (社内報告書)
10. Moran G. 2005. 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433, 117-128
11. AvHPPD-03: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Toxins Report for Japan Registration Requirements. (社内報告書)
12. PAT/*pat* Protein Amino Acid Sequence Homology Search with Known Toxins. (社内報告書)
13. Stavolone L, Ragozzino A, Hohn T. 2003. Characterization of Cestrum yellow leaf curling virus: a new member of the family Caulimoviridae. *J Gen Virol* 84, 3459-3464.
14. Ow DW, Jacobs JD, Howell SH, 1987. Functional regions of the cauliflower

- mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 4870-4874.
15. Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Zambryski P, Goodman HM. 1982. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1, 561-573.
 16. Maiti I, Gowda S, Kiernan J, Ghosh SK, Shepherd R. 1997. Promoter/leader deletion analysis and plant expression vectors with the figwort mosaic virus (FMV) full length transcript (FLt) promoter containing single or double enhancer domains. *Transgenic Res* 6, 143-156.
 17. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. 1987. The 5' -leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 15, 3257-3273
 18. Event SYHT0H2 Soybean: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop T-DNA ORFs with a Minimum Size of 30 Amino Acids. (社内報告書)
 19. Event SYHT0H2 Soybean: Insert Sequence Analysis. (社内報告書)
 20. Event SYHT0H2 Soybean: Functional Element Copy Number Southern Blot Analysis. (社内報告書)
 21. Event SYHT0H2 Soybean: Flanking Sequence Determination. (社内報告書)
 22. Event SYHT0H2 Soybean: Genomic Insertion Site Analysis. (社内報告書)
 23. Event SYHT0H2 Soybean: Basic Local Alignment Search Tool for Translated Nucleotides (BLASTX) Analysis of Soybean Genomic Sequences Flanking the Insert. (社内報告書)
 24. Event SYHT0H2 Soybean: Allergenicity and Toxicity Assessment of Stop to Stop Codon, Genome to Insert Junction ORFs with a Minimum Size of 30 Amino Acids. (社内報告書)
 25. Event SYHT0H2 Soybean: Quantification of ρ -Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase and Phosphinothricin Acetyltransferase in Tissues of Plants Treated with Trait-Specific Herbicides. (社内報告書)
 26. 厚生労働省 2012 : 平成 22 年国民健康・栄養調査報告. 2012, 62p, 78p.
 27. *In vitro* Digestibility of ρ -Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein under Simulated Mammalian Gastric Conditions. (社内報告書)
 28. Hérouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R-J, Rouan D. 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* 41,134-149.
 29. *In vitro* Digestibility of ρ -Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein under Simulated Mammalian Intestinal Conditions. (社内報告書)
 30. Effect of Temperature on the Immunoreactivity of ρ -Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase (AvHPPD-03) Protein. (社内報告書)

31. Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J, Schulz A. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat. Biotechnol.* 14,1274-1278.
32. AvHPPD-03: Assessment of Amino Acid Sequence Similarity to Known or Putative Allergens. (社内報告書)
33. PAT/*pat* Protein Amino Acid Sequence Homology Search with Known Allergens. (社内報告書)
34. Event SYHT0H2 Soybean: Mendelian Inheritance Analysis (Amended Report No. 1). (社内報告書)
35. Event SYHT0H2 Soybean Southern Blot Analysis of the SYHT0H2 ●●● Generation. (社内報告書)
36. Substrate specificity of the AvHPPD-03 enzyme. (社内報告書)
37. Tsegaye Y, Shintani DK, DellaPenna D. 2002. Overexpression of the enzyme *p*-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in *Arabidopsis* and its relation to tocopherol biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 40,913-920.
38. Falk J, Andersen G, Kernebeck B, Krupinska K. 2003. Constitutive overexpression of barley 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase in tobacco results in elevation of the vitamin E content in seeds but not in leaves. *FEBS Lett* 540,35-40.
39. Rippert P, Scimemi C, Dubald M, Matringe M. 2004 Engineering plant shikimate pathway for production of tocotrienol and improving herbicide resistance. *Plant Physiol* 134,92-100.
40. Rippert P, Matringe M. 2002. Purification and kinetic analysis of the two recombinant arogenate dehydrogenase isoforms of *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269: 4753-4761.
41. SYHT0H2 Soybean – Levels of Homogentisic Acid in Field Grown Seed Samples in USA, 2012. (社内報告書)
42. Clarke JD, Alexander DC, Ward DP, Ryals JA, Mitchell MW, Wulff JE, Guo L. 2013. Assessment of genetically modified soybean in relation to natural variation in the soybean seed metabolome. *Scientific Reports* 3: Article No. 3082. Supplemental Material.
43. Compositional Analysis of Forage and Seed from Soybean Event SYHT0H2 Grown During 2010 in the USA. (社内報告書)