

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

ジャガイモ疫病抵抗性、
低遊離アスパラギン、低還元糖
及び低ポリフェノール酸化酵素
ジャガイモ SPS-000Y9-7

2019年8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	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	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	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	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	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	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	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	12
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	15

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	16
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	17
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	17
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	20
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>

- 2018年7月4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0702第3号）、関係書類の接受
- 2018年7月10日 第704回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年7月27日 第177回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2019年7月8日 第190回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2019年8月6日 第752回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

佐藤 洋（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
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>

2019年3月30日まで		2019年4月1日から	
中島 春紫（座長）		中島 春紫（座長）	
小関 良宏（座長代理）		小関 良宏（座長代理）	
児玉 浩明（座長代理）		児玉 浩明（座長代理）	
岡田 由美子	手島 玲子	飯島 陽子	手島 玲子
橘田 和美	樋口 恭子	岡田 由美子	樋口 恭子
近藤 一成	山川 隆	橘田 和美	山川 隆
鈴木 秀幸	吉川 信幸	近藤 一成	吉川 信幸
柘植 郁哉		柘植 郁哉	

要 約

「ジャガイモ疫病抵抗性、低遊離アスパラギン、低還元糖及び低ポリフェノール酸化酵素ジャガイモ SPS-000Y9-7」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、ジャガイモ栽培種 (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) にジャガイモ野生種由来の疫病抵抗性遺伝子を導入して作出されており、ジャガイモ疫病抵抗性が付与されている。また、ジャガイモ栽培種由来のアスパラギン合成酵素遺伝子断片、水ジキナーゼ遺伝子プロモーター領域断片、ホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片及び液胞インベルターゼ遺伝子断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって、これらの内在性遺伝子の発現が抑制され、高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成量を低減する。さらに、ジャガイモ野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって、内在性遺伝子の発現が抑制され、打撲による黒斑形成を低減する。

「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 DNA の供与体の安全性、挿入 DNA の塩基配列等の解析、後代における挿入 DNA の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分、有害成分の比較等について確認した結果、非組換えジャガイモ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、「ジャガイモ疫病抵抗性、低遊離アスパラギン、低還元糖及び低ポリフェノール酸化酵素ジャガイモ SPS-000Y9-7」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：ジャガイモ疫病抵抗性、低遊離アスパラギン、低還元糖及び低ポリフェノール酸化酵素ジャガイモ (SPS-000Y9-7)

性質：ジャガイモ疫病抵抗性、高温加熱加工時のアクリルアミド生成量の低減及び打撲による黒斑形成の低減

申請者：J. R. Simplot Company (米国)

開発者：J. R. Simplot Company (米国)

本システムは、ジャガイモ野生種由来の疫病抵抗性遺伝子が導入され、ジャガイモ疫病抵抗性が付与されている。また、ジャガイモ栽培種由来のアスパラギン合成酵素遺伝子断片、水ジキナーゼ遺伝子プロモーター領域断片、ホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片及び液胞インベルターゼ遺伝子断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって、これらの内在性遺伝子の発現が抑制され、高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成量が低減する。さらに、ジャガイモ野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 非翻訳領域断片が導入されており、ジーンサイレンシングが誘導されることによって、内在性遺伝子の発現が抑制され、打撲による黒斑形成を低減する。

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、ナス科ナス属に属するジャガイモ (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) 品種 Atlantic である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

アスパラギン合成酵素 (*Asn1*) 遺伝子、水ジキナーゼ (*R1*) 遺伝子プロモーター領域、ホスホリラーゼ-L (*PhL*) 遺伝子プロモーター領域及び液胞インベルターゼ (*VInv*) 遺伝子の各 DNA 断片 (それぞれ *Asn1* 断片、*R1* 断片、*PhL* 断片及び *VInv* 断片という。) の供与体は、ジャガイモ栽培種 *Solanum tuberosum* である。ポリフェノール酸化酵素-5 (*Ppo5*) 遺伝子 3' 非翻訳領域 (*Ppo5* 断片という。) の供与体は、ジャガイモ野生種 *Solanum verrucosum* である。疫病抵抗性 R (*Rpi-vnt1*) 遺伝子の供与体は、ジャガイモ野生種 *Solanum venturii* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

各逆方向反復 *Asn1* 断片、*R1* 断片、*PhL* 断片、*VInv* 断片及び *Ppo5* 断片は、転写後にそれぞれ二本鎖 RNA (dsRNA) を生成し、ジーンサイレンシングを誘導して標的とする内在性遺伝子の発現を抑制する。これにより、遊離アスパ

ラギン、還元糖及びポリフェノール酸化酵素の生成を低減し、その結果、高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成量及び打撲による黒斑形成を低減する。

また、*Rpi-vnt1* 遺伝子は VNT1 タンパク質をコードし、ジャガイモ疫病に対する抵抗性を付与する。

これらの DNA 断片及び遺伝子等を、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入した。

2. 宿主の食経験に関する事項

ジャガイモは、古くから多くの食経験があり、また、Atlantic は、ポテトチップ加工用品種として北米で広く栽培されている（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

ジャガイモの可食部分は地下塊茎である。ジャガイモ塊茎の主要栄養素組成（対新鮮重量）は、タンパク質 0.70～4.60%、脂質 0.02～0.74%、灰分 0.29～1.9%、炭水化物 3.68～29.4%、粗繊維 0.17～3.50%である（参照 2、3）。

(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

ジャガイモには毒性物質として、ソラニン、チャコニン等のグリコアルカロイドが、花、葉、茎及び塊茎に分布している。ジャガイモ塊茎の総グリコアルカロイドの含有量は、1～15 mg/100 g（対新鮮重量）であり（参照 3、4）、安全許容限度である 20 mg/100 g 新鮮重を超えない（参照 5）。栄養阻害物質として、プロテアーゼインヒビター及びレクチンが含まれるが、加熱により不活化される（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

SPS-000Y9-7 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のジャガイモと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

SPS-000Y9-7 の摂取部位は、従来のジャガイモと変わらない。

(3) 摂取量

SPS-000Y9-7 の摂取量は、従来のジャガイモと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

SPS-000Y9-7 の調理及び加工方法は、従来のジャガイモと変わらない。

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

SPS-000Y9-7 と宿主との相違点は、SPS-000Y9-7 には、*Rpi-vnt1* 遺伝子の導入によりジャガイモ疫病抵抗性を有する点、Asn1 断片、R1 断片、PhL 断片及び VInv 断片の導入により遊離アスパラギン及び還元糖が低減し、高温加熱加工時におけるアクリルアミドの生成量が低減する点並びに Ppo5 断片の導入によりポリフェノール酸化酵素が低減し、打撲による黒斑形成が低減する点である。

以上1～6から、SPS-000Y9-7の安全性評価においては、既存のジャガイモ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

SPS-000Y9-7は、ジャガイモ栽培に深刻な被害をもたらす疫病への抵抗性を有しているため、ジャガイモ疫病の防除改善及び殺菌剤使用量の低減を可能とする。

また、遊離アスパラギン及び還元糖を低減させることで、高温で加熱加工した際のアクリルアミド生成量を低減させることができる。さらに、ジャガイモが物理的衝撃を受けた際の黒斑形成を低減することで、輸送中等における品質の低下を防ぐことができる。

なお、SPS-000Y9-7は、米国でポテトチップ加工用に利用される。

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、ナス科ナス属に属するジャガイモ (*S. tuberosum*) 品種 Atlantic 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

ジャガイモの原産地は南米アンデス地方で、約7,000年前から栽培されていたとの報告がある。Atlanticは、米国におけるポテトチップス加工用の標準品種であり、他の商業品種と同様に、塊茎による栄養繁殖により増殖される。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

ジャガイモ塊茎には、毒性物質であるソラニン、チャコニン等のグリコアルカロイドが含まれ、安全許容限度が示されている（参照5）。

また、栄養阻害物質であるプロテアーゼインヒビター及びレクチンを含むが、加熱により不活化されるため（参照3）、安全上の懸念は低いと考えられる。

4. アレルギー誘発性に関する事項

ジャガイモ塊茎には、リパーゼ活性を有する貯蔵糖タンパク質であるパタチンが含まれ、アレルギー作用を示唆することが知られている（参照 7）。また、調理したジャガイモに対する小児のアレルギー反応の症例報告があるが、一般的には、ジャガイモに対するアレルギー反応は極稀である（参照 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

ジャガイモが、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

ジャガイモは、調理用、加工用及びデンプン加工用として広く用いられ、安全に摂取されている。

7. 近縁の植物種に関する事項

ジャガイモは、ナス科ナス属に分類され、ナス属には 1,000 種以上の植物が含まれる。塊茎形成ジャガイモは *potatoe* 亜節に含まれ、その中の *tuberosa* 系には栽培種と野生種を含めて 54 種がある（参照 9）。

一般的な栽培ジャガイモは四倍体であり、繁殖性は低下しており、ナス属の野生種と自然交配する可能性は低い。

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

SPS-000Y9-7 の作出に使用された導入用プラスミド pSIM1278 及び pSIM1678 の外骨格領域は、プラスミド pVS1、pBR322 等に基づき構築された。

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

導入用プラスミド pSIM1278 及び pSIM1678 の外骨格領域の塩基配列は同一で、その塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 10、11）。

(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 pSIM1278 及び pSIM1678 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 pSIM1278 及び pSIM1678 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 pSIM1278 及び pSIM1678 の外骨格領域には、カナマイ

シン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pSIM1278 及び pSIM1678 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

Asn1 断片、R1 断片、PhL 断片及び VInv 断片の供与体は、ジャガイモ栽培種 *S. tuberosum* である。また、Ppo5 断片の供与体はジャガイモ野生種 *S. verrucosum* であり、*Rpi-vnt1* 遺伝子の供与体は、ジャガイモ野生種 *S. venturii* である。

(2) 安全性に関する事項

ジャガイモ栽培種 *S. tuberosum* は、古くから食用に供されている。ジャガイモ野生種 *S. verrucosum* 及び *S. venturii* は、南米に自生し、育種に利用されている。*S. venturii* は、ジャガイモ疫病抵抗性の遺伝資源として用いられている。

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

各 DNA 断片は、それぞれの供与体の配列情報を基に人工的に合成された。また、*Rpi-vnt1* 遺伝子は、*S. venturii* からクローニングされた（参照 12）。

挿入 DNA は、導入用プラスミド pSIM1278 の第 1 カセット及び第 2 カセットより構成される T-DNA 領域並びに導入用プラスミド pSIM1678 の第 1 カセット及び第 2 カセットより構成される T-DNA 領域の 2 種類である。

導入用プラスミド pSIM1278 の第 1 カセットは、Spacer-1 を挟み Asn1 断片及び Ppo5 断片をそれぞれ逆位に反復して配置し、第 2 カセットは、Spacer-2 を挟み R1 断片及び PhL 断片をそれぞれ逆位に反復して配置している。各カセットとも、ターミネーターはなく、2 種類のプロモーター（pAgp 及び pGbss）を両端に配置している。

導入用プラスミド pSIM1678 の第 1 カセットは、*Rpi-vnt1* 遺伝子並びに自身のプロモーター（pVnt1）及びターミネーター（tVnt1）から構成され、第 2 カセットは、VInv 遺伝子配列の一部を含む Spacer を挟み VInv 断片を逆位に反復して配置しており、ターミネーターはなく、2 種類のプロモーター（pAgp 及び pGbss）を両端に配置している。

(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 断片等の塩基数、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 10、11）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *Asn1* 断片

アスパラギン合成酵素は、グルタミンからアミノ基を転移することによるアスパラギンの合成を触媒する。

Asn 1 断片の導入により、ジーンサイレンシングが誘導される結果、内在性 *Asn 1* 遺伝子の発現が抑制され、遊離アスパラギンが減少する。

② *R1* 断片、*PhL* 断片及び *VInv* 断片

水ジキナーゼ、ホスホリラーゼ・L 及び液胞インベルターゼは、デンプン分解に関与している。

R1 断片、*PhL* 断片及び *VInv* 断片の導入により、ジーンサイレンシングが誘導される結果、これら内在性遺伝子の発現が抑制され、還元糖の生成が低減する。

R1 断片及び *PhL* 断片はそれぞれプロモーター配列を含んでおり、これらが転写された後、プロモーター領域がメチル化されることによるジーンサイレンシングの可能性が考えられている（参照 13、14）。

アクリルアミドは遊離アスパラギンと還元糖の反応により生成されることから、これらの成分が低減した結果、ジャガイモの高温加熱加工時におけるアクリルアミド生成を抑制することができる。

③ *Ppo5* 断片

ポリフェノール酸化酵素は、細胞が傷害を受けた際に *o*-ジフェノールを酸化しポリマー化することで、褐色色素を合成する。

Ppo5 断片の導入により、ジーンサイレンシングが誘導される結果、内在性 *Ppo5* 遺伝子の発現が抑制され、打撲黒斑の感受性を低減することができる（参照 13）。

④ *Rpi-vnt1* 遺伝子

R タンパク質は、食用作物中に存在することが数多く報告されており（参照 15）、病原体が分泌する非病原性エフェクタータンパク質を認識することにより、免疫反応を惹起する。この免疫反応は、プログラム細胞死を通して病原体に感染した植物組織を破壊することで、病原体の成長及び拡散を抑制する（参照 16）。

Rpi-vnt1 遺伝子がコードする VNT1 タンパク質は、R タンパク質の一つであり、ジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) が分泌するタンパク質を認識して、免疫反応を起こすことで、茎葉にジャガイモ疫病への抵抗性を付加することができる（参照 17）。

VNT1 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、データベース^aを用いて E-value<10⁻⁵を指標として相同性検索を行った結果、VNT1 タンパク質と相同性を有する既知の毒性タンパク質は確認されなかった（参照 18）。

また、ほ場における SPS-000Y9-7 の疫病抵抗性を評価するため、ジャガイモ疫病に感染した葉の割合に基づいて算出した病害進行曲線下面積（AUDPC: Area Under the Disease Progressive Curve）を指標にして解析した結果、非組換え体と比較して、統計学的に有意に減少していたことから、感染が抑制されていることが確認された（参照 19～22）。

（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 pSIM1278 及び pSIM1678 の外骨格領域には、カナマイシン耐性遺伝子が含まれているが、SPS-000Y9-7 には導入されていないことがシーケンス解析によって確認されている（参照 23）。

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

各 DNA 断片のプロモーターは、ジャガイモ栽培種 *S. tuberosum* 由来の ADP グルコースピロホスホリラーゼ (*Agp*) 遺伝子及び顆粒結合型デンプン合成酵素 (*Gbss*) 遺伝子のプロモーター及びそれぞれの 5' 末端非翻訳領域である。

Rpi-vnt1 遺伝子のプロモーターは自身のプロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域 (*pVnt1*) である。

（2）ターミネーターに関する事項

Rpi-vnt1 遺伝子のターミネーターは、自身のターミネーター配列 (*tVnt1*) である。

（3）その他

上記のプロモーター以外に挿入遺伝子の発現制御に関わる領域は含まれていない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

中間プラスミドに、Asn1/Ppo5 発現抑制カセット（第 1 カセット）及び R1/PhL 発現抑制カセット（第 2 カセット）を含む T-DNA 領域を挿入することにより、導入用プラスミド pSIM1278 を作製した。また、導入用プラスミド pSIM1278 の T-DNA 領域を *Rpi-vnt1* 遺伝子発現カセット（第 1 カセット）及び VInv 発現抑制カセット（第 2 カセット）で置き換えることにより、導入用プラスミド pSIM1678 を作製した。

^a NCBI データベースのうち、toxin とアノテーションされているタンパク質を抽出。検索日 2017 年 3 月 1 日

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 pSIM1278 及び pSIM1678 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 10、11）。

(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

第 6-1-(2) に記載のとおりである。

(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 pSIM1278 及び pSIM1678 の意図する挿入領域は、それぞれの右側領域 (RB) から左側領域 (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 pSIM1278 及び pSIM1678 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜により純化されている。また、目的外の遺伝子の混入がないことを、シーケンス解析により確認している（参照 23）。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

アグロバクテリウム法を用いて、導入用プラスミド pSIM1278 により Atlantic を形質転換して SPS-000J3-4 を作出後、導入用プラスミド pSIM1678 により SPS-000J3-4 を形質転換して SPS-000Y9-7 を作出した（参照 24）。

(1) SPS-000J3-4 の作出

導入用プラスミド pSIM1278 により宿主の組織断片を形質転換し、再分化させた。*ipt* 遺伝子由来の表現型を示す幼植物体を除去した後、PCR 分析にて複数の優良個体を選抜し、さらにアグロバクテリウムの混入がないことを確認した。それらの個体について、カテコール試験、サザンブロット分析及び農業学的形質の評価等の解析を行い、SPS-000J3-4 を選抜した。

(2) SPS-000Y9-7 の作出

導入用プラスミド pSIM1678 により SPS-000J3-4 の組織断片を形質転換し、導入用プラスミド pSIM1278 の場合と同様の手法により優良個体を選抜した。ジャガイモ疫病菌 *P. infestans* に対する抵抗性評価試験を行い、抵抗性を示した個体を用いてサザンブロット分析及び農業学的形質の評価等の解析を行い、SPS-000Y9-7 を選抜した。

(3) SPS-000Y9-7 の維持及び評価試料

SPS-000Y9-7 は、組織培養で継続的に維持され、栄養繁殖で増殖される。組織から再生させた植物体を温室で生育して小塊茎を生産した後、ほ場で栽培して塊茎を生産する。したがって、安全性評価に用いられた SPS-000Y9-7 の植物体材料は、全て単一起源である。

表 1 挿入 DNA の構成要素 (pSIM1278 の T-DNA)

構成 DNA	由来及び機能
LB	<i>Rhizobium radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の左側境界配列と類似の合成 DNA
第 1 カセット	
p <i>Agp</i>	ジャガイモ栽培種由来の ADP グルコースピロホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
Asn1 断片	ジャガイモ栽培種由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Ppo5 断片	ジャガイモ野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 末端非翻訳領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Spacer-1	ジャガイモゲノムの非構造領域由来のヘアピンカーブ構造形成のための配列
Ppo5 断片	ジャガイモ野生種由来のポリフェノール酸化酵素-5 遺伝子 3' 末端非翻訳領域断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Asn1 断片	ジャガイモ栽培種由来のアスパラギン合成酵素-1 遺伝子断片 (センス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
p <i>Gbss</i>	ジャガイモ栽培種由来の顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子のプロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
第 2 カセット	
p <i>Agp</i>	ジャガイモ栽培種由来の ADP グルコースホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
PhL 断片	ジャガイモ栽培種由来のホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
R1 断片	ジャガイモ栽培種由来の水ジキナーゼ R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片 (アンチセンス鎖) であり、ジーンサイレンシングを誘導
Spacer-2	ジャガイモのポリユビキチン遺伝子のイントロン由来のヘアピンカーブ構造形成のための配列

構成 DNA	由来及び機能
R1 断片	ジャガイモ栽培種由来の水ジキナーゼ R1 タンパク質遺伝子プロモーター領域断片（センス鎖）であり、ジーンサイレンシングを誘導
PhL 断片	ジャガイモ栽培種由来のホスホリラーゼ-L 遺伝子プロモーター領域断片（センス鎖）であり、ジーンサイレンシングを誘導
pGbss	ジャガイモ栽培種由来の顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子プロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
RB	<i>R. radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の右側境界配列と類似の合成 DNA

表 2 挿入 DNA の構成要素（pSIM1678 の T-DNA）

構成 DNA	由来及び機能
LB	<i>R. radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の左側境界配列と類似の合成 DNA
第 1 カセット	
pVnt1	ジャガイモ野生種由来の <i>Rpi-vnt1</i> 遺伝子のプロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
<i>Rpi-vnt1</i>	ジャガイモ野生種由来の VNT タンパク質をコードする。ジャガイモ疫病を引き起こす病原体 <i>P. infestans</i> に対する抵抗性を付加
tVnt1	ジャガイモ野生種由来の <i>Rpi-vnt1</i> 遺伝子のターミネーター領域
第 2 カセット	
pAgp	ジャガイモ栽培種由来の ADP グルコースホスホリラーゼ遺伝子プロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
VInv 断片	ジャガイモ栽培種由来の液胞インベルターゼ遺伝子断片（センス鎖）であり、ジーンサイレンシングを誘導
Spacer	ジャガイモ由来の液胞インベルターゼ遺伝子配列の一部を含むヘアピンカーブ構造形成のための配列
VInv 断片	ジャガイモ栽培種由来の液胞インベルターゼ遺伝子断片（アンチセンス鎖）であり、ジーンサイレンシングを誘導
pGbss	ジャガイモ栽培種由来の顆粒結合型デンプン合成酵素遺伝子プロモーター領域及び 5' 末端非翻訳領域
RB	<i>R. radiobacter</i> の Ti プラスミド由来の右側境界配列と類似の合成 DNA

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

SPS-000Y9-7 のゲノムに挿入された T-DNA のコピー数を確認するために、シーケンス解析を行った結果、導入用プラスミド pSIM1278 及び pSIM1678 由来の T-DNA がそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された（参照 23）。

挿入された T-DNA の塩基配列及び近傍配列について、PCR 及びシーケンス解析を行った結果、導入用プラスミド pSIM1278 由来の挿入 DNA は、全長 T-DNA の 5' 末端に *Asn1/Ppo5* 発現抑制カセット（第 1 カセット）が 1 コピー、3' 末端に *R1/PhL* 発現抑制カセット（第 2 カセット）の一部が挿入されたものであった。挿入 DNA の 5' 末端では、一部欠失した *pAgp* がジャガイモ内在性配列と隣接していたが、転写開始位置を含む領域を欠失していることから、プロモーターとして機能する可能性は低いと考えられた。また、挿入 DNA の 3' 末端では、不完全な第 2 カセット及び *Spacer-2* がジャガイモ内在性配列と隣接していることが確認された。

導入用プラスミド pSIM1678 由来の挿入 DNA は、全長 T-DNA の 5' 末端で *Rpi-vnt1* プロモーターの 5' 末端の一部が欠失し、3' 末端に *VInv* 発現抑制カセット（第 2 カセット）の一部が挿入されたものであった。

導入用プラスミド pSIM1278 及び pSIM1678 の外骨格領域が SPS-000Y9-7 のゲノムに挿入されていないことをシーケンス解析により確認した（参照 23）。

SPS-000Y9-7 のゲノムに導入用プラスミド pSIM1278 由来 T-DNA を挿入することにより 21 bp の欠失及び 5' 末端に 5 bp の付加が、導入用プラスミド pSIM1678 由来 T-DNA を挿入することにより 278 bp の欠失及び 5' 末端に 7 bp の付加が認められた（参照 23）。

DNA の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、それぞれの挿入 DNA の 5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列それぞれ 1 kb について、レファレンスゲノムのアノテーションに基づいて分析した。その結果、ジャガイモ内在性遺伝子は破壊されていないことが確認された。また、ジャガイモの転写産物データベースに対して blast 検索を行った結果、DNA の挿入位置に既知の転写産物は認められなかった（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

SPS-000Y9-7 の各挿入 DNA 領域とその両近傍配列との接合部において、意図しないオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）が生じていないことを確認するため、6 つの読み枠において、挿入 DNA 領域では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 を、両近傍配列では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 を、それ

それぞれ対象として検索を行った。その結果、pSIM1278 由来の挿入 DNA 領域で 113 個、近傍配列との接合部で 8 個の ORF が、また、pSIM1678 由来の挿入 DNA 領域で 149 個、近傍配列との接合部で 9 個の ORF が、それぞれ見出された (参照 18)。

検出された 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、ORF の全長アミノ酸と 50%以上の相同性を有し、かつ E-value $<10^{-5}$ であること、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対しては 35%以上の相同性を有すること又は連続する 8 アミノ酸配列が一致することを条件として、データベース^bを用いて解析した結果、導入用プラスミド pSIM1678 由来の挿入 DNA 領域の液胞インベルターゼの配列に関連する 3 つの ORF が、トマトのマイナーアレルゲンと相同性を示した。これはトマト中の液胞インベルターゼに関する配列であり、ジャガイモの液胞インベルターゼと 95%の相同性を有しているが、同遺伝子はジャガイモの内在性遺伝子であること及び VInv 断片が液胞インベルターゼの発現量を高めるとは考えられないことから、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

また、検出された ORF 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、NCBI データベース^aを用いて E-value $<10^{-5}$ を指標として検索を行った結果、相同性を有する既知の毒性タンパク質は見いだされなかった (参照 18)。

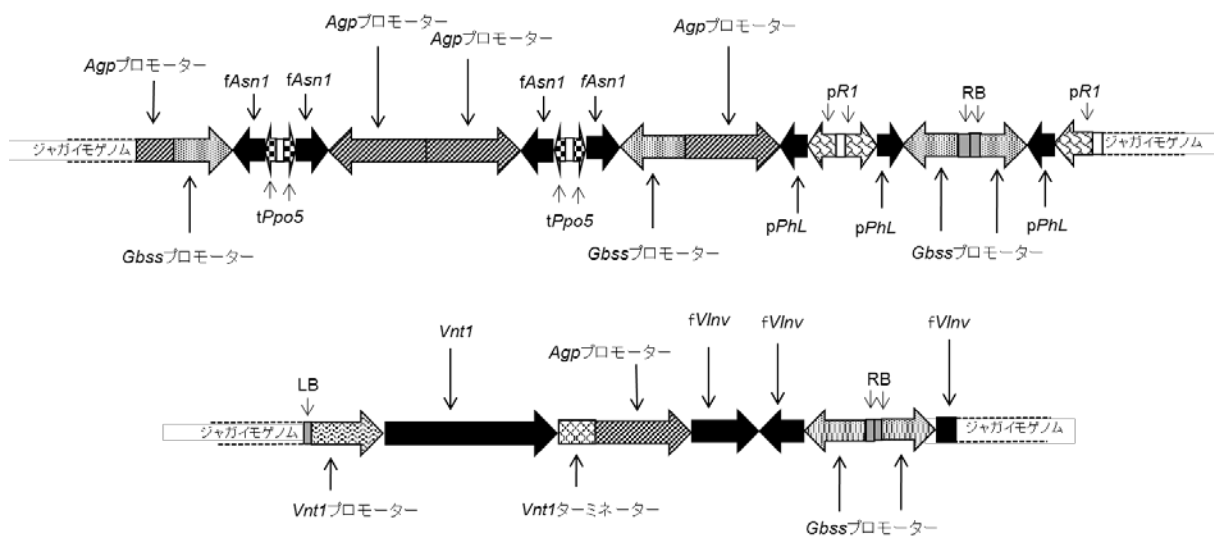


図1 SPS-000Y9-7 に挿入された DNA (模式図)

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

SPS-000Y9-7 の塊茎、葉、茎、根及び花において、各 DNA 断片の導入により、*Asn1* 遺伝子、*PhL* 遺伝子、*R1* 遺伝子、*VInv* 遺伝子及び *Ppo5* 遺伝子の発現が抑制されていることを確認するため、ノーザンブロット分析を行った。

その結果、非組換え体と比較して、塊茎においては、*Asn1* 遺伝子、*PhL* 遺伝

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 17)

子、*VInv* 遺伝子及び *Ppo5* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認された。また、葉では *Asn1* 遺伝子、花では *Asn1* 遺伝子及び *VInv* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認された（参照 25）。

SPS-000Y9-7 の塊茎及び葉の VNT1 タンパク質を測定するため、ウェスタンブロット分析を行った結果、いずれも発現量は定量限界値（塊茎：220 ppb、葉：450 ppb）未満であった（参照 26）。なお、*Rpi-vnt1* 遺伝子の対立遺伝子変異体である *Rpi-vnt1.3* 遺伝子を有するジャガイモ品種である *Alouette* の塊茎を用いて同様にウェスタンブロット分析を行った結果、VNT1 タンパク質の発現量は定量限界値（220 ppb）未満であった（参照 27）。

また、定量 Reverse Transcription PCR (RT-qPCR) 法を用いて、SPS-000Y9-7 の葉、茎、根、花及び塊茎における *Rpi-vnt1* 遺伝子の転写量について、*S. venturii* の葉から調整した RNA を陽性コントロールとして測定した結果、*Rpi-vnt1* 遺伝子の発現が確認された（参照 28）。

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

SPS-000Y9-7 に導入した *Asn1* 断片、R1 断片、PhL 断片、*VInv* 断片及び *Ppo5* 断片は、ジーンサイレンシングを誘導することを意図しており、これらの DNA 断片によりタンパク質が産生されることはないと考えられる。日本人一人が一日に摂取するジャガイモ及びジャガイモ加工品の摂取量 24.9 g（参照 29）を全て SPS-000Y9-7 に置き換えて、塊茎中の VNT1 タンパク質濃度を仮に 500 ppb として（定量限界値は 220 ppb）、VNT1 タンパク質の一日摂取量を試算すると 12.5 µg となり、一人一日当たりのタンパク質摂取量 67.7 g（参照 29:厚生労働省 2016）に占める割合は 1.8×10^{-7} となる。したがって、これらが一日蛋白摂取量の有意な量を占めることはない判断される。

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

SPS-000Y9-7 に導入された *Asn1* 断片、R1 断片、PhL 断片、*VInv* 断片及び *Ppo5* 断片により、タンパク質が産生されることはないと考えられることから、これらの遺伝子産物がアレルギー誘発性を有する可能性は低い。

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

Rpi-vnt1 遺伝子の供与体である *S. venturii* に関しては、第 5-1-(1) 及び (2) に記載のとおりである。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

VNT1 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

E. coli を用いて十分量の VNT1 タンパク質を精製することが困難であったため、物理化学的処理に対する感受性に関する分析は行っていない。

2014 年以降欧州で販売されている Alouette が有する *Rpi-vnt1.3* 遺伝子がコードする VNT1 タンパク質は、SPS-000Y9-7 に導入された *Rpi-vnt1* 遺伝子がコードする VNT1 タンパク質のアミノ酸配列と 98% の相同性を示すことが確認された。また、北米及び欧州において、野生ジャガイモ種由来の R 遺伝子が多くのジャガイモ品種に導入・栽培されており、我が国においても、*S. demissum* 由来の R 遺伝子を有するジャガイモ品種トヨシロ及びコナフブキについては、約 40 年の食経験がある。さらに、SPS-000Y9-7 塊茎中の VNT1 タンパク質の発現量は定量限界値未満であり、SPS-000Y9-7 由来の VNT1 タンパク質の摂取量も低いと推測されたことから、総合的に判断し、VNT1 タンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

- (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關与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
- VNT1 タンパク質とアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、全長アミノ酸と 50% 以上の相同性を有し、かつ E-value < 10^{-5} であること、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対しては 35% 以上の相同性を有すること又は連続する 8 アミノ酸配列が一致することを条件として、データベース^bを用いて解析した結果、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（第 6-1-(2) 参照）。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

ジャガイモは、塊茎の栄養繁殖により増殖することから、種子植物とは異なり他家受粉による変異のリスクが少ないとされているが、SPS-000Y9-7 に挿入された挿入 DNA の安定性を確認するため、葉（G0、G2、G3 及び G4^c）を用いてサザンブロット分析を行った。その結果、共通のバンドが確認され、挿入 DNA が栄養繁殖を通じて安定して受け継がれていることが確認された（参照 30）。

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

Asn1 断片、R1 断片、PhL 断片、VInv 断片及び Ppo5 断片の逆方向反復配列から生成される全ての siRNA について、標的以外の遺伝子発現を非特異的に抑制する可能性を確認するため、ジャガイモ転写産物データベース^dを用いて解析を行った。その結果、R1 断片及び PhL 断片より生成される siRNA の 21 nt と一致する塩基配列を有する 15 個の遺伝子が検出された。このうち、塩基配列の長さから、RNA 干渉を誘導する可能性を有すると考えられるのは、テトラスパニン 10 遺伝子の 2 個のスプライシング変異体であった。シロイヌナズナ由来のテトラスパニン 1 遺伝子は、植物の形態形成に關与すると報告されているが（参照 31）、

^c G0 は組織培養から増殖させた幼植物体及びこれを生育させて得られた植物体（塊茎を含む）。G0 塊茎から G1 植物体及び G1 塊茎が生産され、G2 及び G3 の植物体及び塊茎も同様に生産される。

^d Michigan State University (MSU) potato transcript database (V3.4, 56,218 sequences)

SPS-000Y9-7 の形態に異常はなく、また、その他の代謝系に関わる変化も認められなかった。さらに、標的以外のプロモーターへの影響を検討するため、R1 断片及び PhL 断片逆方向反復配列をクエリーとしてジャガイモゲノムデータベース^eを用いて解析を行った結果、90%以上の相同性を示す領域は検出されなかった。したがって、挿入遺伝子断片により標的以外の意図しない遺伝子が影響を受ける可能性は低いと考えられた（参照：32、33）。

VNT1 タンパク質は、エフェクタータンパク質を認識して植物の免疫機構を惹起する植物防御機構に関与する（参照 34）が、これ以外の機能を有することは知られていないことから、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る。

以上のことから総合的に判断し、挿入遺伝子及び遺伝子産物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 SPS-000Y9-7 と宿主である非組換えジャガイモ品種 Atlantic について、塊茎中の主要構成成分、遊離アミノ酸組成、アミノ酸組成、ビタミン類、ミネラル類、糖類、グリコアルカロイド及びアクリルアミド（ポテトチップに加工）の分析を行い、統計学的有意差について検討した。なお、Atlantic を含めた従来のジャガイモ栽培種 10 種を用いて、各構成成分の許容区間^fを設定した（参照 35）。

(1) 主要構成成分

塊茎中の水分、タンパク質、脂質、灰分、粗繊維及び炭水化物について分析を行った結果、一部の成分において、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差が認められたが、それらの平均値は従来品種の許容区間内及び文献値の範囲内であった。

(2) ビタミン類及びミネラル類

塊茎中のビタミン B₃、ビタミン B₆、ビタミン C、銅、マグネシウム及びカリウムの分析を行った結果、カリウムにおいて、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差が認められたが、それらの平均値は従来品種の許容区間内及び文献値の範囲内であった。

(3) アミノ酸組成

塊茎中のアミノ酸 18 種類の分析を行った結果、対照に用いた非組換えジャガイモと比較して、アスパラギン酸及びアスパラギンの合計が統計学的に有意

^e NCBI genome database

^f 95%の信頼度で母集団の 99%が含まれる測定値の範囲。仮に組換え体と宿主の成分含量に統計学的有意差が認められた場合であっても、従来品種の許容区間の範囲内であれば、自然変動（ばらつき）の範囲と見なすことができる。

に減少し、グルタミン酸及びグルタミンの合計が統計学的に有意に増加したが、その平均値は、従来品種又は文献値の範囲内であった。

その他多くのアミノ酸においても、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差が認められたが、それらの平均値は従来品種の許容区間内及び文献値の範囲内であった。

(4) グリコアルカロイド

ジャガイモは、毒性物質としてグリコアルカロイドを含有するため、その含有量を測定した。その結果、対照に用いた非組換えジャガイモとの間に統計学的有意差は認められなかった。

(5) 遊離アミノ酸組成

遊離アミノ酸 4 種類（アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸及びグルタミン）の分析を行った結果、対照に用いた非組換えジャガイモと比較して、統計学的に有意な遊離アスパラギンの減少、遊離グルタミン酸及びグルタミンの増加が認められた。なお、各群の平均値は、文献値の範囲内であった。

(6) 糖類

収穫時及び 6 か月間保存した塊茎について、還元糖及びショ糖を測定した。その結果、還元糖は、収穫時及び保存後のいずれにおいても、対照の非組換えジャガイモと比較して統計学的に有意に減少していたが、従来品種の許容区間内であった。

また、ショ糖については、収穫時を除き、対照に用いた非組換えジャガイモと統計学的有意差は認められなかった。

(7) アクリルアミド

収穫時及び 6 か月間保存した塊茎を用いて加工したポテトチップのアクリルアミド含量を測定した。その結果、収穫時及び保存後のいずれにおいても、対照の非組換えジャガイモから製造したものと比較して、85.1～96.8%減少し、統計学的に有意差が認められた（参照 36）。

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、米国農務省（USDA）に対して無規制裁培のための申請が、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申請が行われ、2016年10月及び2017年2月にそれぞれ安全性が確認された。

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が、カナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料・環境のための安全性審査の申請が行われ、いずれも2017年7月に安全性が確認された。

オーストラリアにおいては、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、2017年12月に安

全性が確認された。

9. 栽培方法に関する事項

SPS-000Y9-7 の栽培方法は、従来のジャガイモと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

SPS-000Y9-7 の種いもの増殖法及び管理方法は、従来のジャガイモと同じである。

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は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「ジャガイモ疫病抵抗性、低遊離アスパラギン、低還元糖及び低ポリフェノール酸化酵素ジャガイモ SPS-000Y9-7」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。

なお、本系統は、宿主の代謝系が改変され、特定の成分の含量を変化させる形質が付与されていることから、SPS-000Y9-7 を用いて開発した品種は、安全性評価が必要である。

<参照>

1. NPC (2016). National Potato Council. Potato Statistical Yearbook.
2. ILSI (2016). Summary Report Query Criteria: Crop Type Is Potato - *Solanum Tuberosum* Tuber. ILSI Crop Composition Database.
3. OECD (2002). Organization for Economic Co-Operation and Development. Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of Potatoes: Key Food and Feed Nutrients, Anti-Nutrients and Toxicants.
4. JECFA 1992 : WHOTechRept Evaluation of Certain Food Additives and Naturally Occurring Toxicants.
5. Smith, D.B., Roddick, J.G., and Jones, J.L. (1996). Potato Glycoalkaloids: Some Unanswered Questions. Trends in Food Science & Technology 7, 126–131.
6. Stadler, R.H. (2005). Acrylamide Formation in Different Foods and Potential Strategies for Reduction. Advances in Experimental Medicine and Biology 561, 157–169.
7. Astwood, J.D., Alibhai, M., Lee, T., Fuchs, R., and Sampson, H. (2000). Identification and Characterization of IgE Binding Epitopes of Patatin, a Major Food Allergen of Potato. Journal of Allergy and Clinical Immunology 105, S184.
8. DeSwert, L.F.A., Cadot, P., and Ceuppens, J.L. (2002). Allergy to Cooked White Potatoes in Infants and Young Children: A Cause of Severe, Chronic Allergic Disease. Journal of Allergy and Clinical Immunology 110, 524–529.
9. OECD (1997). Consensus Document on the Biology of *Solanum Tuberosum* Subsp. *Tuberosum* (Potato). Organization for Economic Co-Operation and Development.
10. Sequence of pSIM1278. 16-42-SPS-SEQ. (CBI) (社内文書)
11. Sequence of pSIM1678. 16-43-SPS-SEQ. (CBI) (社内文書)
12. Foster, S.J., Park, T.-H., Pel, M., Brigneti, G., Śliwka, J., Jagger, L., van der Vossen, E., and Jones, J.D.G. (2009). *Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2²K* Homolog from *Solanum Venturii*, Confers Resistance to Potato Late Blight. Molecular Plant-Microbe Interactions 22, 589-600.
13. Yan H, Chretien R, Ye J, Rommens CM (2006) New construct approaches for efficient gene silencing in plants. Plant Physiol, 141: 1508-1518.
14. He, H. J., Chen, T., Zhu, J. K., (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. Cell Research 21, 442-465.
15. Chiang, Y.-H., and Coaker, G. (2015). Effector Triggered Immunity: NLR Immune Perception and Downstream Defense Responses. The Arabidopsis Book 13, e0183.
16. Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., and Baulcombe, D.C. (2002). Interaction between Domains of a Plant NBS-LRR Protein in Disease Resistance-Related Cell Death. The EMBO Journal 21, 4511–4519.
17. Pel, M. a, Foster, S.J., Park, T.-H., Rietman, H., van Arkel, G., Jones, J.D.G.,

- Van Eck, H.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., and Van der Vossen, E. a G. (2009). Mapping and Cloning of Late Blight Resistance Genes from *Solanum Venturii* Using an Interspecific Candidate Gene Approach. *Molecular Plant-Microbe Interactions*: MPMI 22, 601–615
18. Allergen and Toxin Evaluation of Stop-to-Stop Open Reading Frames in Atlantic Y9. 17-16-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 19. 2013 Field Efficacy of Potato Events Y9, X17, and Y9 against *Phytophthora infestans* (Late Blight). 13-04-SPS-ENV. (CBI) (社内文書)
 20. 2014 Field Efficacy of Potato Events Y9, X17, and Y9 against *Phytophthora infestans* (Late Blight). 14-04-SPS-ENV. (CBI) (社内文書)
 21. 2014 Field Efficacy of Potato Event Y9, X17, and Y9 against *Phytophthora infestans* (Late Blight) Strain US-24. 16-72-SPS-ENV. (CBI) (社内文書)
 22. Madden, L.V., Hughes, G., and van den Bosch, F. (2007). Temporal Analysis I: Quantifying and Comparing Epidemics. In *The Study of Plant Disease Epidemics*, L.V. Madden, G. Hughes, and F. van den Bosch, eds. (American Phytopathological Society (APS) Press), pp. 63–116.
 23. Sequence Characterization of the Inserts in Y9. 17-27-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 24. Richael, C.M., Kalyaeva, M., Chretien, R.C., Yan, H., Adimulam, S., Stivison, A., Weeks, J.T., and Rommens, C.M. (2008). Cytokinin Vectors Mediate Marker-Free and Backbone-Free Plant Transformation. *Transgenic Research* 17, 905–917.
 25. Expression of RNAi-targeted Transcripts in Y9. 15-16-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 26. Characterization of VNT1 Protein Expression in Y9. 17-39-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 27. Characterization of VNT1 Protein Expression in Alouette. (社内文書)
 28. Developmental Gene Expression of *Rpi-vnt1* in Y9. 17-42-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 29. 厚生労働省 (2016) 平成 26 年国民健康・栄養調査報告
 30. Stability of Inserts in Vegetatively Propagated Y9. 16-97-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 31. Wang, F., Vandepoele, K., and Van Lijsebettens, M. (2012). Tetraspanin Genes in Plants. *Plant Science* 190, 9-15.
 32. Analysis of pSIM1278 siRNA Targets and Specificity in Potato. 16-73-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 33. Analysis of pSIM1678 siRNA Targets and Specificity in Potato. 16-74-SPS-MOL. (CBI) (社内文書)
 34. Panstruga, R., Parker, J.E., and Schulze-Lefert, P. (2009). SnapShot: Plant Immune Response Pathways. *Cell* 136.

35. Compositional Assessment of Y9 Compared to Atlantic. 15-112-SPS-COMP-RPT. (CBI) (社内文書)
36. Zhu, X., Richael, C., Chamberlain, P., Busse, J.S., Bussan, A.J., Jiang, J., and Bethke, P.C. (2014). Vacuolar Invertase Gene Silencing in Potato (*Solanum Tuberosum* L.) Improves Processing Quality by Decreasing the Frequency of Sugar-End Defects. PLoS ONE 9, e93381.