

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ
MON88302 系統**

**平成 25 年 2 月 7 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
(1)	遺伝的素材に関する事項	3
(2)	家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
(3)	飼料の構成成分等に関する事項	4
(4)	既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
2	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
3	宿主に関する事項	5
(1)	学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
(2)	遺伝的先祖に関する事項	5
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	5
(4)	寄生性及び定着性に関する事項	6
(5)	ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	6
(6)	自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	6
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
(8)	飼料に利用された歴史に関する事項	6
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	7
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	7
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	7
4	ベクターに関する事項	7
(1)	名称及び由来に関する事項	7
(2)	性質に関する事項	7
(3)	薬剤耐性に関する事項	8
(4)	伝達性に関する事項	8
(5)	宿主依存性に関する事項	8
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	8
(7)	発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	8
5	挿入遺伝子に関する事項	8
(1)	供与体に関する事項	8

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項	9
(3) 構造に関する事項	9
(4) 性質に関する事項	10
(5) 純度に関する事項	11
(6) コピー数に関する事項	11
(7) 安定性に関する事項	11
(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	12
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項	12
6 組換え体に関する事項	12
(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項	12
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	13
(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項	13
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	14
(5) 宿主との差異に関する事項	14
(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項	15
(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項	15
(8) 不活化法に関する事項	16
(9) 外国における認可等に関する事項	16
(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項	16
(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項	16
7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項	16
IV 審議結果	16
V 参考文献及び参考資料	16

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統」に係る安全性確認

I はじめに

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統（以下「MON88302 セイヨウナタネ」という。）について、平成 24 年 11 月 1 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名：除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統
性 質：除草剤グリホサート耐性
申請者：日本モンサント株式会社
開発者：Monsanto Company

MON88302セイヨウナタネは、除草剤グリホサートに対する耐性を付与するため、*Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する改変 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されている。

改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS たん白質は、グリホサートにより機能を阻害される植物細胞内に存在する 5-エノールピルビルシキミ酸・3-リン酸合成酵素 (EPSPS) と異なり、グリホサート存在下でも影響を受けずに芳香族アミノ酸を合成可能にすることにより、植物に除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

また、改変 CP4 EPSPS たん白質は、選択マーカーとして、MON88302 セイヨウナタネの作出過程における形質転換体の選抜にも用いられている。

MON88302 セイヨウナタネと既存のセイヨウナタネを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。そのため、MON88302 セイヨウナタネに付与された性質について安全性を評価したところ、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、MON88302 セイヨウナタネが飼料として摂取する家畜の健康を損なうおそれはないと考えられた。

なお、セイヨウナタネは主になたね油かすの形態で飼料として利用されている。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

MON88302 セイヨウナタネを作出するのに用いた宿主は、アブラナ科 (Brassicaceae) アブラナ属 (*Brassica*) に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の従来品種 Ebony である。

MON88302 セイヨウナタネに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。改変 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される改変 CP4 EPSPS たん白質のアミノ酸配列は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来

の野生型 CP4 EPSPS たん白質と比較して N 末端から 2 番目のセリンがロイシンに改変されていることを除けば同一である。

MON88302 セイヨウナタネは、改変 CP4 EPSPS たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

最近まで、セイヨウナタネは油中のエルカ酸及びナタネ¹油かす中のグルコシノレートにより、食用及び飼料用としては適していないと考えられていたが、カナダでの品種改良により低エルカ酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種²が育成された結果、現在では食用油として利用されており、搾油により生じるナタネ油かすが飼料として利用されている(杉山, 2001)。MON88302 セイヨウナタネの宿主である従来品種 Ebony についても、低エルカ酸及び低グルコシノレートの品種である。

ナタネ油かすは優れたたん白質の供給源であり、鶏、豚、乳牛用及び肉牛用飼料の原料として用いられている(CCC, 2009)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MON88302 セイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である(Mailer and Pratley, 1990、Naczka *et al.*, 1998、Pritchard *et al.*, 2000、OECD, 2001、参考資料 16、参考資料 17)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MON88302 セイヨウナタネに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS たん白質をコードしており、改変 CP4 EPSPS たん白質の働きにより MON88302 セイヨウナタネに除草剤グリホサートに対する耐性を付与している。この点を除けば、MON88302 セイヨウナタネは既存のセイヨウナタネと差異はなく、既存種と比較してア. 収穫時期(成熟程度)と貯蔵方法、イ. 家畜等の摂取(可食)部位、ウ. 家畜等の摂取量、エ. 調製及び加工方法についても変わりはない。

(1) ～ (4) より、MON88302 セイヨウナタネの飼料としての安全性評価においては、既存のセイヨウナタネとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

MON88302 セイヨウナタネは、*Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 CP4

¹ 「ナタネ」は一般的にはセイヨウナタネ (*B. napus* L.)と *B. rapa* L. のことを示すが、広くは種子を油脂原料として利用するアブラナ科アブラナ属の植物の総称である(農業・生物系特定産業技術研究機構, 2006)。

² 「カノーラ品種」は、低エルカ酸及び低グルコシノレートのセイヨウナタネ (*B. napus* L.)、*B. rapa* L. 及び *B. juncea* (L.) Czern の呼称である(OGTR, 2008)。

EPSPS たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性が付与され、効果的な雑草防除を行うことが可能となる。

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) はアブラナ科アブラナ属に属する。MON88302 セイヨウナタネの作出に用いた宿主は、従来品種 Ebony である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *B. rapa* L. (在来ナタネ、カブ、ハクサイ、コマツナ、ノザワナ、ツケナ、チンゲンサイ、パクチョイ等と呼ばれるもの全体を指す) とキャベツなどが属する *B. oleracea* L. との交雑の結果できた複二倍体種である (角田, 2001)。セイヨウナタネは、交雑親の *B. rapa* L. と *B. oleracea* L. の分布が重なる北ヨーロッパが原産地と考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (稲永, 2000)。

元来、セイヨウナタネ種子から得られた油は、有害生理活性物質のエルカ酸とグルコシノレートが種子中に高濃度で含まれていたため、食用には不向きで主に燈火用や工業用潤滑油として用いられていた (Colton and Sykes, 1992) が、1960年代に入ると、脂肪酸含量を支配する遺伝様式が明らかにされるとともに、低エルカ酸含量の新品種が次々に育成された。また、低グルコシノレート含量のセイヨウナタネ品種の育成も同様に進められ、1977年には低エルカ酸で低グルコシノレートの新品種 Candle が育成された (志賀, 1981)。現在、カナダでは *B. napus* L. ("Argentine"等)、*B. rapa* L. ("Polish"等) 及び *B. juncea* (L.) Czern から育成された低エルカ酸で低グルコシノレートのセイヨウナタネ品種 (カノーラ品種) が栽培されており、このうち *B. napus* L. がカナダの年間生産量のほとんどを占めている。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

セイヨウナタネに含まれる既知の抗栄養素として、フィチン酸、シナピン及びタンニンが知られている (OECD, 2001)。

上記以外にもセイヨウナタネにはエルカ酸及びグルコシノレートといった有害生理活性物質が含まれていることが知られている。

エルカ酸は動物における心臓疾患の誘引に関与するとされているため、Codex (Codex Alimentarius, 2005) 及び FDA (U.S. FDA, 1988) は食用のナタネ油のエルカ酸含有量は全脂肪酸の 2% を超えないよう明記している。

グルコシノレートはアブラナ属の植物に普遍的に存在している。セイヨウナタネ種子においてグルコシノレートは最も一般的なアルキル基とインドール基の 2 種類の化学基に分類される (CCC, 2009)。ブロッコリに由来する一部のグルコシノレートは健康に貢献することが知られているが、カノーラ品種中のグルコシノレートのほとんどは酵素であるミロシナーゼにより加水分解され、成長及び甲状腺

機能を阻害する甲状腺腫誘発性化合物であるイソチオシアン酸アリルを形成する (Bell, 1984)。OECD は、動物試験における単胃動物の増体重及び飼料効率に悪影響が見られない油かすの投与量をもとに、カノーラ品種の定義として油かす中のグルコシノレートの最大含有量を乾燥重量あたり 30 $\mu\text{mol/g}$ と定めている。(OECD, 2001)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

セイヨウナタネは種子植物であり、それを食する家畜等や他の生物に寄生または定着することはない。

(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

セイヨウナタネの病害として、根腐れ病、菌核病、黒斑病、べと病、うどんこ病及び萎黄病などが知られているが(NDSU, 2005、Boyles *et al.*, 2009)、これらの病原体のヒト及び家畜等への病原性は知られていない。

(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

セイヨウナタネは路傍や工場跡地のような、定期的に人の手が加えられる場所では自生化し得ることが知られており(OECD, 1997)、わが国においては、河川の土手等での生育や(清水ら, 2001、国土交通省, 2012)、海外から種子が陸揚げされる港湾周辺での生育がこれまでに報告されている (Nishizawa *et al.*, 2009)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物であり、わが国の最大の輸入先であるカナダにおいては、セイヨウナタネは春播き(春に播種、秋に収穫)で栽培される。一方、日本におけるセイヨウナタネの栽培方法は、夏から秋に播種して、翌春に収穫するのが一般的である(由比, 2004)。セイヨウナタネの生育適温は15~20℃であり、酸性や湿度には比較的強いが、重粘土や砂質で乾燥している土壌は適さない。春播き栽培において、セイヨウナタネ種子は播種から4~15日後に発芽し、40~60日後に開花始めとなり、栄養成長期が終了する(CCC, 2011)。また、開花始めから40~60日後に成熟期を迎える(CCC, 2011)。

セイヨウナタネは自家受粉によって種子を作ることが多い。花粉の稔性は24時間から1週間程度維持されるが、4日目を過ぎた段階から次第に失われていく(Mesquida and Renard, 1982)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

(2)に記載のとおり、従来のセイヨウナタネの種子中にはエルカ酸とグルコシノレートが高濃度で含まれていたために食品及び飼料用としては適していないと考えられてきたが、カナダでの品種改良により低エルカ酸で低グルコシノレートであるカノーラ品種が育成された結果、現在では食用油として利用されており、その油抽出後のナタネ油かすは飼料として利用されている(杉山, 2001)。カノーラ

品種の油抽出後のナタネ油かすには、バランスのとれた必須アミノ酸を含むたん白質が約 40%含まれており、粗繊維も約 13%含まれている (Bell, 1995)。

160 我が国では、主に育すう・成鶏用、ブロイラー用、養豚用、乳牛用及び肉牛用配合飼料の原料として利用されている (飼料月報, 2010)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

165 MON88302 セイヨウナタネの作出に用いた宿主は、エルカ酸及びグルコシノレートといった有害生理活性物質の含有量が低減されたカノーラ品種に該当する。このようなカノーラ品種は飼料として安全に利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

170 セイヨウナタネの栽培は、栽培地域の気象条件及び栽培するセイヨウナタネの品種特性により、春播きあるいは秋播きの、どちらかの栽培型を選択することで、播種時期や収穫時期が決まる。つまり、セイヨウナタネの生存・増殖能力は気候条件及び品種の特性により制限されている。また、セイヨウナタネは、除草剤や耕起等の物理的方法により容易に防除できる。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

175 セイヨウナタネ(*B. napus* L.)は *B. rapa* L. 及び *B. oleracea* L.の交雑により生じたと考えられている(U, 1935)。これら 3 種はアブラナ科に属しており、世界中で安全に摂取されてきた歴史のある野菜の重種を含んでいる。例を以下に示した。

- *B. napus* L. : スウェード又はルタバガ、シベリアンケール
- *B. rapa* L. : カブ、ハクサイ
- 180 • *B. oleracea* L. : キャベツ、カリフラワー、ブロッコリ、コラード、ケール、メキャベツ

185 これら 3 種のうち 2 種 (*B. napus* L.及び *B. rapa* L.) は、ナタネ油及びナタネ油かすの原料として利用されている (U.S. FDA, 1988、U.S. FDA, 2000、OGTR, 2008)。これら 2 種は従来育種により改良されており、油中のエルカ酸含有量が 2%未満、ナタネ油かす中のグルコシノレート含有量が 30 $\mu\text{mol/g}$ 未満となっている(OECD, 2001)。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

190 ベクターE は MON88302 セイヨウナタネの作出に用いられた導入プラスミド PV-BNHT2672 の中間プラスミドである。なお、ベクターE の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

(2) 性質に関する事項

195 ベクターE の塩基数は 8,677 bp である。また、ベクターE の全塩基配列、制限酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており(参考資料 1)、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

200 ベクターEにはスペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド修飾酵素である 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードしている *aadA* 遺伝子 (Fling *et al.*, 1985) が含まれており、*Escherichia coli* 中での選択マーカーとして用いられている。

205 (4) 伝達性に関する事項

ベクターEは伝達を可能とする配列を含まないため、伝達性はない。

(5) 宿主依存性に関する事項

210 ベクターEには、*Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) における自律増殖のための広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *ori V* と、*E. coli* における自律増殖のためのプラスミド pBR322 に由来する複製開始領域 *ori-pBR322* が組み込まれている。しかし、これらの領域によりベクターEが、植物や家畜等で増殖することは出来ない。更に導入遺伝子の解析の結果、MON88302 セイヨウナタネ中には、これらの領域を含む外側骨格領域は導入されていないことが確認されている (参考資料 5)。

215

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

220 MON88302 セイヨウナタネの作出には、導入用プラスミド PV-BNHT2672 (参考資料 3)を用いている。本導入用プラスミドは、中間プラスミドであるベクター A 及び C~H 並びに Fragment B を用いて作出されており(参考資料 2)、改変 *cp4 epsps* 遺伝子を発現する改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットからなる T-DNA 領域を有している。

(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

225 MON88302 セイヨウナタネは、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により従来セイヨウナタネ品種 *Ebony* に導入することにより作出されている。改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを含む T-DNA は、導入を促すための右側境界領域と左側境界領域を有している。

230 5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

①名称、由来及び分類に関する事項

235 MON88302 セイヨウナタネに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は *Agrobacterium* sp. CP4 株に由来する。

②安全性に関する事項

Agrobacterium sp. CP4 株は土壌中に一般的に存在する微生物類の 1 つであ

り、ヒトや家畜等に対する病原性等を示す報告はない。

240 (2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

MON88302 セイヨウナタネの作出に用いられた導入用プラスミド PV-BNHT2672 は、中間プラスミドであるベクターA 及び C~H 並びに Fragment B から構成される合成ベクターである。

245 従来セイヨウナタネ品種 Ebony の胚軸と導入用プラスミド PV-BNHT2672 を含む *Agrobacterium* を共置培養することにより形質転換を行った後、胚軸断片をカルベニシリン、チカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養培地に移すことにより、形質転換に用いた *Agrobacterium* を除去した。さらに、胚軸をグリホサート及び植物成長調整因子を添加した選択培地に移すことにより、形質転換されている植物細胞からの発芽形成を誘導した。根をつけた R₀ 個体のうち正常な表現型を示す個体を選抜し、250 土壌に移植した後、評価に用いた。

形質転換により得られた R₀ 個体を自殖させ R₁ 世代を作出し、R₀ 個体及び R₁ 世代について除草剤グリホサートに対する耐性、サザンブロット分析による改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットの有無、導入用プラスミドの外側骨格配列 (*oriV*) の有無を確認した。その後、改変 *cp4 epsps* 遺伝子をホモで有する R₁ 個体を自殖し R₂ 255 世代を作出し、R₂ 世代において、除草剤グリホサートに対する耐性を確認し、PCR 解析、サザンブロット分析により、導入遺伝子が 1 コピー導入されているホモ接合体を特定した。そのホモ個体の中から、形態特性及び詳細な導入遺伝子解析の結果に基づき、最終的な商品化系統として MON88302 セイヨウナタネを選抜した。

260

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

265 改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットは、*FMV/EF-1α* キメラプロモーターによりその発現を制御されている。植物細胞で転写を誘導する *FMV/EF-1α* キメラプロモーターは、Figwort Mosaic Virus 35S プロモーターのエンハンサー配列 (Richins *et al.*, 1987) 及び伸長因子 EF-1α をコードするシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *EF-1α* 遺伝子のプロモーター (Axelos *et al.*, 1989) を含む。

270 ② ターミネーターに関する事項

改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、リブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニット (*rbcS2*) をコードしているエンドウ (*Pisum sativum*) の *E9* 遺伝子由来の 3' 末端非翻訳領域であり (Coruzzi *et al.*, 1984)、改変 *cp4 epsps* 遺伝子からの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

275

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 PV-BNHT2672 の各構成要素の機能は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT2672 の挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *cp4 epsps* 遺伝子については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入遺伝子の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由 来 及 び 機 能
<i>FMV/ EF-1α</i> プロモーター	伸長因子 EF-1α をコードするシロイヌナズナ(<i>Arabidopsis thaliana</i>) 由来の <i>EF-1α</i> 遺伝子のプロモーター (Axelos <i>et al.</i> , 1989) に Figwort Mosaic Virus (FMV) の 35S プロモーターのエンハンサー配列 (Richins <i>et al.</i> , 1987) を結合させたキメラプロモーター。改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子の恒常的発現に関与する。
<i>EF-1α</i> リーダー配列	伸長因子 EF-1α をコードするシロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>) 由来の <i>EF-1α</i> 遺伝子の 5' 非翻訳リーダー領域 (exon 1) (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。目的遺伝子の発現を高める。
<i>EF-1α</i> イントロン	伸長因子 EF-1α をコードするシロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>) 由来の <i>EF-1α</i> 遺伝子のイントロン配列 (Axelos <i>et al.</i> , 1989)。改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子の発現を高める。
<i>CTP2</i> ターゲティング配列	シロイヌナズナ(<i>A. thaliana</i>)の EPSPS の葉緑体輸送ペプチドをコードする <i>ShkG</i> 遺伝子由来のターゲティング配列 (Klee <i>et al.</i> , 1987、Herrmann, 1995)。改変 CP4EPSPS たん白質を葉緑体へと輸送する。
改変 <i>cp4 epsps</i> 遺伝子	グラム陰性菌である <i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(CP4 EPSPS)をコードしている <i>aroA (epsps)</i> 遺伝子のコード配列 (Padgett <i>et al.</i> , 1996、Barry <i>et al.</i> , 2001)。
<i>E9</i> ターミネーター	エンドウ(<i>Pisum sativum</i>) のリブロース-1,5-二リン酸カルボキシラーゼ小サブユニットをコードする <i>rbcS2</i> 遺伝子に由来する 3' 末端非翻訳領域 (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984)。mRNA のポリアデニル化を誘導する。

【 改変*cp4 epsps*遺伝子の機能 】

除草剤グリホサートは、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の 1 つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) (E.C.2.5.1.19) と特異的に結合してその活性を阻害する (Steinrücken and Amrhein, 1980、Haslam, 1993)。その結果、グリホサートを散布された植物は、EPSPS が阻害され、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯死する。一方で、改変 CP4 EPSPS たん白質を発現する組換え植物はその働きによりグリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、シキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。

(5) 純度に関する事項

導入遺伝子は、導入用プラスミド PV-BNHT2672 の T-DNA 領域由来の 4,428 bp である。塩基配列解析により、T-DNA に目的外の遺伝子の混入がないことを確認している。

(6) コピー数に関する事項

MON88302 セイヨウナタネに導入された遺伝子（以下「導入遺伝子」とする）の挿入箇所数、コピー数及び外側骨格配列の有無を確認するため、サザンブロット分析を行った。その結果、導入用プラスミド PV-BNHT2672 に由来する T-DNA 配列が、MON88302 セイヨウナタネのゲノム中の 1 ヲ所に 1 コピー導入されていることが確認された。また、これらの分析から、MON88302 セイヨウナタネのゲノム中に、導入用プラスミド PV-BNHT2672 に由来する外側骨格配列が存在しないことも確認された(参考資料 5)。

また、導入遺伝子とその近傍配列の全塩基配列を決定するため、導入遺伝子及び近傍領域の塩基配列解析を行った。この塩基配列解析により、導入遺伝子の塩基配列が PV-BNHT2672 中の対応する塩基配列と同一であるか確認した。その結果、MON88302 セイヨウナタネ中の導入遺伝子と、導入用プラスミド PV-BNHT2672 の T-DNA 領域の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された(参考資料 5)。

さらに、MON88302 セイヨウナタネの導入遺伝子挿入部位を対照の非組換えセイヨウナタネ中の塩基配列と比較し、導入遺伝子がセイヨウナタネ内在性の既知の遺伝子を破壊しているか確認した。その結果、MON88302 セイヨウナタネの導入遺伝子の挿入部位においてセイヨウナタネ内在性配列に 29 bp の欠損が認められ、MON88302 セイヨウナタネの導入遺伝子の 3' 末端とセイヨウナタネ内在性配列の間に 9 bp の付加配列が確認された。また、MON88302 セイヨウナタネの導入遺伝子の 3' 末端側の近傍配列と、その配列と対応する対照の非組換えセイヨウナタネ内在性配列の間に、1 塩基の違いが認められた(参考資料 5)。しかし、BLASTn 及び BLASTx による近傍配列の分析から、導入遺伝子の挿入による既知の内在性の遺伝子の破壊はないと考えられた(参考資料 6)。

(7) 安定性に関する事項

MON88302 セイヨウナタネ中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認するため、4 世代の MON88302 セイヨウナタネから得られたゲノム DNA を用いて、サザンブロット分析を実施したところ、改変 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセットを持つ T-DNA 領域が複数世代にわたり安定して遺伝していることが確認された(参考資料 5)。

また、改変 CP4 EPSPS たん白質の発現の複数世代にわたる安定性を確認するため 4 世代の MON88302 セイヨウナタネの葉組織サンプルを用いて改変 CP4 EPSPS たん白質のウェスタンブロット分析を実施したところ、改変 CP4 EPSPS たん白質が複数世代にわたり安定して発現していることが確認された(参考資料 7)。

さらに、導入遺伝子の分離様式を確認するため、3 世代の MON88302 セイヨウナタネを用いて改変 *cp4 epsps* 遺伝子の接合性を real-time TaqMan PCR により確認した。その結果、3 世代における改変 *cp4 epsps* 遺伝子の分離比の実測値と期待値との間に、カイ二乗検定による統計学的な有意差は認められなかったことから、MON88302 セイヨウナタネ中の導入遺伝子はメンデルの法則に従って後代に遺伝していると考えられた(参考資料 8)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MON88302 セイヨウナタネにおける改変 CP4 EPSPS たん白質の発現量を ELISA 法により測定した(参考資料 9)。米国の 3 ヶ所及びカナダの 3 ヶ所のは場から採取された MON88302 セイヨウナタネの組織を供試し、組織サンプル中の改変 CP4 EPSPS たん白質発現量を測定した。その結果、供試したすべての組織サンプル(地上部、種子、葉及び根)から改変 CP4 EPSPS たん白質が検出された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV-BNHT2672 には、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド修飾酵素である 3''(9)-O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼをコードしている *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している (Fling *et al.*, 1985)。なお、MON88302 セイヨウナタネ中に *aadA* 遺伝子を含む外側骨格領域が導入されていないことは、サザンブロット分析で確認されている(参考資料 5)。

(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

遺伝子の導入により、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質と相同性のある新規の ORF が形成されてないことを確認するため、MON88302 セイヨウナタネの導入遺伝子と 5' 及び 3' 末端近傍配列の両境界領域について、ストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンまでの配列を 6 フレーム全てについて検索した。その結果、8 アミノ酸以上の ORF が 11 個確認された(参考資料 10)。これら 11 個の ORF について、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった。

また、MON88302 セイヨウナタネ中の導入遺伝子において、目的以外の新規たん白質が産生される可能性を想定し、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性検索を行った(参考資料 11)。その結果、既知の毒素たん白質、アレルゲン及び生理活性のあるたん白質との相同性は確認されなかった。

6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

MON88302 セイヨウナタネに導入された改変 *cp4 epsps* 遺伝子は、

380 *Agrobacterium* sp. CP4 株由来の改変 CP4 EPSPS たん白質をコードしており、
MON88302 セイヨウナタネに除草剤グリホサートに対する耐性を付与している。
この点を除けば、MON88302 セイヨウナタネは従来のセイヨウナタネとその形態
及び生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も従来と変わら
ない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

385 改変 CP4 EPSPS たん白質が既知の毒素たん白質と相同性を有するか確認する
ために、TOX_2010 データベースを用いて FASTA 型アルゴリズムにより *E-score*
(expectation score; 期待値)が 1×10^{-5} 以下の相同性を示す配列の検索を行った。
その結果、TOX_2010 に登録された既知の毒素たん白質及びその他のヒトや家畜
等に有害なたん白質との間に構造相同性は認められなかった (参考資料 4)。

390 (3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

E. coli で大量発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質を用いて人工胃液 (SGF)
及び人工腸液 (SIF) 消化試験を行った。*E. coli* から調製した改変 CP4 EPSPS
たん白質と MON88302 セイヨウナタネ中で発現する改変 CP4 EPSPS たん白質
の同等性に関しては、免疫反応性 (ウエスタンブロット分析)、分子量 (SDS-
PAGE)、グリコシル化状態及び機能活性により確認している (参考資料 12)。

① 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

400 SDS-PAGE 及びウエスタンブロット分析により、*E. coli* で発現させた改変
CP4 EPSPS たん白質の人工胃液 (SGF) 中での消化性を評価した。その結果、
改変 CP4 EPSPS たん白質は 15 秒以内に検出限界 (SDS-PAGE : 10 ng、ウエ
スタンブロット分析 : 0.05 ng) 以下まで消化されることが確認された (参考資
料 13)。

② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

405 ウエスタンブロット分析により、*E. coli* で発現させた改変 CP4 EPSPS たん
白質の人工腸液 (SIF) 中での消化性を評価した。

その結果、試験開始 10 分後には、試験開始直後と比較して、50%以上の改
変 CP4 EPSPS たん白質が消化・分解されることが確認された。また、試験開
始 100 分後以降に改変 CP4 EPSPS たん白質が検出されることはなかった (参
考資料 14)。

③ 熱処理

415 ELISA 分析により、*E. coli* で発現させた改変 CP4 EPSPS たん白質の加熱
処理感受性を評価した。その結果、15 分間の条件下の場合、25 及び 37℃では
非加熱と比較して減少は認められなかったが、55℃では 46%に減少していた。
さらに、75 及び 95℃では検出限界以下であった。また、30 分間の条件下の場
合、25℃では非加熱と比較して 92%、37℃では 82%、55℃では 17%にそれぞ

れ減少していた。さらに、75 及び 95℃では検出限界以下であった。

これらの結果から、改変 CP4 EPSPS たん白質は加熱処理によって免疫応答性を失うことが確認された (参考資料 15)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

EPSPS は、植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の 1 つであり、植物の葉緑体又は色素体に存在する(Della-Cioppa *et al.*, 1986)。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である (Haslam, 1974、Haslam, 1993)。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプツロン酸-7-リン酸 (DAHP) 合成酵素により制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸 (EPSP) の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階が中間代謝物質や最終生成物で阻害・抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている (Weiss and Edwards, 1980、Herrmann, 1983)。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、EPSPS 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。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されている (Smart *et al.*, 1985)。さらに、アミノ酸分析により、芳香族アミノ酸含量に MON88302 セイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で相違のないことが確認されている (参考資料 16)。

また、EPSPS は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) から、EPSP と無機リン酸塩 (Pi) を生じる可逆反応を触媒する酵素であり (Levin and Sprinson, 1964)、これらの基質と特異的に反応することが知られている (Gruys *et al.*, 1992)。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、Gruys らの論文を元に計算すると、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えにくい。

以上のことから、内在性の EPSPS たん白質と機能的に同一である改変 CP4 EPSPS たん白質の発現によって、植物の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低いと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

MON88302 セイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネとの構成成分の同等性を確認するため、米国の 2 ヶ所及びカナダの 3 ヶ所のほ場において栽培した MON88302 セイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネの種子について、①主要構成成分、②脂肪酸組成、③アミノ酸組成、④ミネラル類、⑤ビタミン類及び⑥有害生理活性物質の分析を行った (参考資料 16、参考資料 17)。また、各ほ場 4 品種ずつ合計 7 品種の商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行った。MON88302 セイヨウナタネに関しては、5~6 葉期に最大使用薬量である 1,800 g acid equivalent /ha (a.e./ha)で除草剤グリホサート処理を行った。

460

①主要構成成分

種子中の水分、たん白質、総脂質、灰分、炭水化物、酸性デタージェント繊維(ADF)、中性デタージェント繊維(NDF)及び総食物繊維について分析した結果、いずれの成分も対照の非組換えセイヨウナタネと同等又は従来商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

465

②脂肪酸組成

種子中の脂肪酸組成について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えセイヨウナタネと同等又は従来商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

470

③アミノ酸組成

種子中のアミノ酸組成について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に差異は認められなかった。

475

④ミネラル類

種子中のミネラル類について分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に差異は認められなかった。

480

⑤ビタミン類

種子中のビタミン E について分析した結果、対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に差異は認められなかった。

485

⑥有害生理活性物質

種子中の有害生理活性物質として、フィチン酸、シナピン酸、総タンニン(可溶性及び不溶性)、アルキルグルコシノレート、イドリルグルコシノレート及び総グルコシノレートについて分析した結果、いずれの有害生理活性物質も対照の非組換えセイヨウナタネと同等又は従来商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

490

なお、エルカ酸は分析値の半分以上が定量限界(0.04%)未満であったため、統計解析から除外された。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

495

2005 年以来、米国を中心として延べ 154 ヶ所で行われたほ場試験において、MON88302 セイヨウナタネの生存及び増殖能力は対照の非組換えセイヨウナタネと同等であることが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

MON88302 セイヨウナタネの生存・増殖能力は非組換えセイヨウナタネと同等

であり、生存・増殖能力の制限要因にも両者の間に変化はないと考えられる。

500

(8) 不活化法に関する事項

MON88302 セイヨウナタネは、物理的防除(耕耘)や化学的防除(感受性を示す除草剤の使用)など、セイヨウナタネを枯死させる従来の方法で不活化される。

505

(9) 外国における認可等に関する事項

2011 年 8 月に欧州食品安全機関 (EFSA) へ食品、飼料及び輸入のための申請を行った。

2012 年 3 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) へ食品の輸入のための申請を行った。

510

2012 年 4 月に米国食品医薬局 (FDA) において食品・飼料としての安全性審査が終了した。

2012 年 6 月にカナダ保健省 (Health Canada) において食品としての、また、カナダ食品検査庁 (CFIA) において環境・飼料としての安全性審査が終了した。

515

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MON88302 セイヨウナタネの栽培方法は、生育期に雑草防除のために除草剤グリホサートを使用できることを除いて、従来のセイヨウナタネと同様である。

MON88302 セイヨウナタネへの使用が想定される除草剤グリホサートについて、MON88302 セイヨウナタネへの残留を検証した結果 (参考資料 18)、安全上の問題は認められなかった。

520

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

MON88302 セイヨウナタネの種子の製法及び管理方法は従来のセイヨウナタネと同様である。

525

- 7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項該当しない。

530

IV 審議結果

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ MON88302 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、同第 3 条第 1 項による確認を行って差し支えないと判断された。

535

V 参考文献及び参考資料

参考文献

- 1 Axelos, M., C. Bardet, T. Liboz, A. Le Van Thai, C. Curie and B. Lescure. 1989. The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1a: Molecular cloning, characterization and expression. *Molecular and General Genetics* 219: 106-112.

- 2 Barry, G.F., G.M. Kishore, S.R. Padgette and W.C. Stallings. 2001. Glyphosate-tolerant 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases. Patent 6,248,876, U.S. Patent Office, Washington, D.C.
- 3 Bell, J.M. 1984. Nutrients and toxicants in rapeseed meal: A review. *Journal of Animal Science* 58: 996-1010.
- 4 Bell, J.M. 1995. Meal and by-product utilization in animal nutrition. Pages 301-337 in *Brassica Oilseeds: Production and Utilization*. D.S. Kimber and D.I. McGregor (eds.). CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- 5 Boyles, M., J. Criswell, F. Epplin, K. Giles, C. Godsey, W. Heer, G. Hergert, J. Holman, D. Jardine, C. Jones, V. Martin, D. Mengel, T. Peeper, D. Peterson, K. Roozeboom, T. Royer, H. Sanders, P. Sloderbeck, M. Stamm and C. Thompson. 2009. Great Plains canola production handbook. Kansas State University Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, Manhattan, Kansas.
- 6 CCC. 2009. Canola meal: Feed industry guide. Fourth Edition. Canola Council of Canada, Winnipeg, Manitoba.
- 7 CCC. 2011. Growth Stages: Growth Stages of the Canola Plant. Canola Council of Canada, Winnipeg, Manitoba.
<http://www.canolacouncil.org/crop-production/canola-grower's-manual-contents/chapter-3-growth-stages/growth-stages> [Accessed December 14, 2012].
- 8 Codex Alimentarius. 2005. Codex standard for named vegetable oils. Pages 1-13 in Codex-STAN 210. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- 9 Colton, R.T. and J.D. Sykes. 1992. Canola: Agfact P5.2.1. Fourth Edition. NSW Agriculture, Orange, New South Wales.
- 10 Coruzzi, G., R. Broglie, C. Edwards and N.-H. Chua. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase. *The EMBO Journal* 3: 1671-1679.
- 11 Della-Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley and G.M. Kishore. 1986. Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 6873-6877.
- 12 Fenwick, G.R., R.K. Heaney and R. Mawson. 1989. Glucosinolates. Pages 1-41 in *Toxicants of Plant Origin. Volume II. Glycosides*. P.R. Cheeke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- 13 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn 7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Research* 13: 7095-7106.
- 14 Gruys, K.J., M.C. Walker and J.A. Sikorski. 1992. Substrate synergism and the steady-state kinetic reaction mechanism for EPSP synthase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 31: 5534-5544.
- 15 Haslam, E. 1974. The shikimate pathway: Biosynthesis of the aromatic amino acids.

- Pages 3-48 in The Shikimate Pathway. Butterworth & Co (Publishers) Ltd., London.
- 16 Haslam, E. 1993. Introduction, commentary and overview. Pages 1-16 in Shikimic Acid: Metabolism and Metabolites. John Wiley and Sons, Inc., Chichester, England.
 - 17 Herrmann, K.M. 1983. The common aromatic biosynthetic pathway. Pages 301-322 in Amino Acids: Biosynthesis and Genetic Regulation. K.M. Herrmann and R.L. Somerville (eds.). Addison-Wesley Publishing Company, Reading, Massachusetts, U.S.A.
 - 18 Herrmann, K.M. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell* 7: 907-919.
 - 19 Klee, H.J., Y.M. Muskopf and C.S. Gasser. 1987. Cloning of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: Sequence analysis and manipulation to obtain glyphosate-tolerant plants. *Molecular and General Genetics* 210: 437-442.
 - 20 Levin, J.G. and D.B. Sprinson. 1964. The enzymatic formation and isolation of 3-enolpyruvylshikimate 5-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 239: 1142-1150.
 - 21 Mailer, R.J. and J.E. Pratley. 1990. Field studies of moisture availability effects on glucosinolate and oil concentration in the seed of rape, (*Brassica napus* L.) and turnip rape (*Brassica rapa* L. var. *silvestris* (Lam.) Briggs). *Canadian Journal of Plant Science* 70: 399-407.
 - 22 Mesquida, J. and M. Renard. 1982. Study of the pollen dispersal by wind and of the importance of wind pollination in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Metzger). *Apidologie* 4: 353-366.
 - 23 Naczki, M., R. Amarowicz, A. Sullivan and F. Shahidi. 1998. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: A review. *Food Chemistry* 62: 489-502.
 - 24 NDSU. 2005. Canola production field guide. A-1280. North Dakota State University Extension Service, Fargo, North Dakota.
 - 25 Nishizawa, T., N. Nakajima, N. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo and A. Saji. 2009. Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a Japanese roadside: 3-year observations. *Environmental Biosafety Research* 8: 33-34.
 - 26 OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (Oilseed rape). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.7. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
 - 27 OECD. 2001. Consensus document on key nutrients and key toxicants in low erucic acid rapeseed (Canola). ENV/JM/MONO(2001)13. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No.1. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
 - 28 OGTR. 2008. The biology of *Brassica napus* L. (canola). Australian Government, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, ACT, Australia.
 - 29 Padgett, S.R., D.B. Re, G.F. Barry, D.E. Eichholtz, X. Delannay, R.L. Fuchs, G.M. Kishore and R.T. Fraley. 1996. New weed control opportunities: Development of soybeans with a Roundup Ready™ gene. Pages 53-84 in *Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects*. S.O. Duke (ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

- 30 Pritchard, F.M., H.A. Eagles, R.M. Norton, P.A. Salisbury and M. Nicolas. 2000. Environmental effects on seed composition of Victorian canola. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 40: 679-685.
- 31 Richins, R.D., H.B. Scholthof and R.J. Shepherd. 1987. Sequence of figwort mosaic virus DNA (caulimovirus group). *Nucleic Acids Research* 15: 8451-8466.
- 32 Smart, C.C., D. Johanning, G. Müller and N. Amrhein. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimate acid 3-phosphate synthase in a plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *The Journal of Biological Chemistry* 260: 16338-16346.
- 33 Steinrücken, H.C. and N. Amrhein. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 94: 1207-1212.
- 34 U, N. 1935. Genome-analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilization. *Japanese Journal of Botany* 7: 389-452.
- 35 U.S. FDA. 1988. Rapeseed oil. 21 CFR 184.1555. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
<http://cfr.vlex.com/vid/184-rapeseed-oil-19707525> [Accessed November 2, 2010].
- 36 U.S. FDA. 2000. Agency response letter GRAS notice no. GRN 000033. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C.
- 37 Weiss, U. and J.M. Edwards. 1980. Regulation of the shikimate pathway. Pages 287-301 in *The Biosynthesis of Aromatic Compounds*. John Wiley & Sons, Inc., New York, New York.
- 38 稲永 忍 2000. IV. 油料作物. 2. ナタネ. 作物学 II. —工芸・飼料作物編— 文永堂 東京 pp.108-118
- 39 国土交通省 2012. 河川環境データベース (2010年度調査結果)
http://mizukoku.nilim.go.jp/ksnkankyo/01/index.files/map_sch.jsp [Accessed on Sep. 10, 2012]
- 40 志賀 敏夫 1981. V 油料. 工芸作物学. 栗原 浩(編) 農山漁村文化協会 東京 pp.89-110
- 41 清水 矩宏・森田 弘彦・廣田 伸七 2001. アブラナ科. 日本帰化植物写真図鑑 全国農村教育協会 東京 pp.85-115
- 42 飼料月報 2010. 飼料月報 平成 22 年 8 月. 社団法人 配合飼料供給安定機構
- 43 杉山信太郎 2001. 日本人とナタネ. I 日本人の生活とナタネ. 転作全書. Volume 3 雑穀 農山漁村文化協会 東京 pp.273-278
- 44 角田重三郎 2001. ナタネの起源と特性. I 原産と来歴. 転作全書. Volume 3 雑穀. 農山漁村文化協会 東京 pp.283-287
- 45 農業・生物系特定産業技術研究機構 2006. ナタネ. 最新農業技術事典 農山漁村文化協会 東京 p.1124
- 46 由比 進 2004. 15 園芸作物 菜類. 洋種ナタネ類 新編 農学大事典 養賢堂東京 p.547

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1 Information on Intermediate Plasmid (Vector E)
- 2 PV-BNHT2672 Plasmid Lineage
- 3 Sequence of Genetic Elements in PV-BNHT2672
- 4 Updated Bioinformatics Evaluation of the CP4 EPSPS Protein Utilizing the AD_2011, TOX_2011, and PRT_2011 Databases (RAR-2011-0083)
- 5 Molecular Analysis of Glyphosate-Tolerant Roundup Ready® 2 (RR2) Canola MON 88302 (MSL0022523)
- 6 Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in MON 88302: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0023331)
- 7 Demonstration of the Presence of CP4 EPSPS Protein in Canola Leaf Tissue of MON 88302 Across Multiple Generations by Western Blot Analysis Produced in U.S. Greenhouse during 2009-2010 (MSL0022592)
- 8 Segregation of the cp4 epsps Coding Sequence in MON88302 in the F2, F3 and F4 Populations (RPN-10-085)
- 9 Amended Report for MSL 0022681: Assessment of CP4 EPSPS Protein Levels in Canola Tissues Collected from MON 88302 Produced in United States and Canadian Field Trials during 2009 (MSL0023090)
- 10 Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in MON 88302: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0023088)
- 11 Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in MON 88302 Utilizing the AD_2010, TOX_2010, and PRT_2010 Databases (MSL0023155)
- 12 Characterization of the CP4 EPSPS Protein Purified from the Seed of MON 88302 and Comparison of the Physicochemical and Functional Properties of the MON 88302-produced and *E. coli*-Produced CP4 EPSPS Proteins (MSL 0022841)
- 13 Assessment of the *in vitro* digestibility of purified *E. coli*-produced CP4 EPSPS protein in simulated gastric fluid (MSL17566)
- 14 Assessment of the *in vitro* digestive fate of CP4 EPSPS synthase (MSL12949)
- 15 Immunodetection of CP4 EPSPS Following Heat Treatment (MSL0022764)
- 16 Amended Report for MSL0022807: Compositional Analyses of Canola Seed Collected from Glyphosate Treated MON 88302 Grown in the United States and Canada during the 2009 Growing Season (MSL0023615)
- 17 Analysis of Tannins in Canola Seed Collected from Glyphosate-Treated MON 88302 Grown in the United States and Canada during the 2009 Growing Season (RAR-2011-0237)
- 18 Overview and Tolerance Proposals for Glyphosate Residues in Glyphosate Tolerant Canola Raw Agricultural Commodities Following Applications of a Glyphosate-Based Formulation (MSL0023286)