

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔
セイヨウナタネ MS11**

**平成 3 1 年 3 月 1 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	4
(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	4
(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	5
(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	5
(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	5
(7)	有性生殖周期及び交雑性に関する事項	5
(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	6
(10)	生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	6
(11)	近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	6
4	ベクターに関する事項	6
(1)	名称及び由来に関する事項	6
(2)	性質に関する事項	6
(3)	薬剤耐性に関する事項	6
(4)	伝達性に関する事項	7
(5)	宿主依存性に関する事項	7
(6)	発現ベクターの作成方法に関する事項	7
(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	7
5	挿入遺伝子に関する事項	7
(1)	供与体に関する事項	7

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項	7
(3) 構造に関する事項	8
(4) 性質に関する事項	8
(5) 純度に関する事項	10
(6) コピー数に関する事項	10
(7) 安定性に関する事項	10
(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	10
(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	11
(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	11
6 組換え体に関する事項	11
(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	11
(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項	11
(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	12
(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	13
(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	15
(9) 外国における認可等に関する事項	15
(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

「除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ MS11」に係る安全性確認

I はじめに

除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ MS11（以下「MS11 セイヨウナタネ」という。）について、平成 29 年 10 月 13 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：除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ MS11

性 質：除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔

申請者：BASF ジャパン株式会社

開発者：BASF Agricultural Solutions Seed US LLC

MS11セイヨウナタネは、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与するため、放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* 由来の改変 *bar* 遺伝子が、雄性不稔形質を付与するため、土壌細菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の改変 *barnase* 遺伝子が、さらに改変 *barnase* 遺伝子の非意図的な働きを抑えるため、*B. amyloliquefaciens* 由来の *barstar* 遺伝子が導入されている。

改変 *bar* 遺伝子から産生されるホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素（以下「改変PATたん白質」という。）が、除草剤グルホシネートを除草活性のない化合物に変換することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

また改変 *barnase* 遺伝子から産生されるリボヌクレアーゼである改変BARNASEたん白質が、葯のタペート細胞において発現、RNAを分解することで花粉形成を阻害し、これにより雄性不稔形質を付与する。

さらに *barstar* 遺伝子から産生されるBARSTARたん白質が改変BARNASEたん白質を特異的に阻害するため、葯組織以外で非意図的な改変 *barnase* 遺伝子が発現した際にその活性を抑えることができる。

MS11セイヨウナタネと既存の非組換えセイヨウナタネを比較したところ、遺伝子組換え技術を用いて付与された上記の性質を除き、差異は認められなかった。このため、MS11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、MS11セイヨウナタネは、飼料として摂取する家畜等の健康に影響を及ぼす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

MS11 セイヨウナタネに用いた宿主は、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.) のカノーラ品種 N90-740 系統である。

MS11 セイヨウナタネに導入された改変 *bar* 遺伝子は *S. hygroscopicus* に由来する。また、改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子は土壌細菌 *B. amyloliquefaciens* に由来する。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

セイヨウナタネは、搾油後に生じる油かすが配合飼料として利用されており、広範な家畜等の飼養経験を持つ (石田, 2004、OECD, 2011)。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

MS11 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量は明らかとなっており、比較が可能である (参考資料 1)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

MS11 セイヨウナタネは、改変 PAT たん白質の発現により、除草剤グルホシネート耐性が付与されている。また改変 BARNASE たん白質の発現により、雄性不稔形質が付与されている。これらの点を除けば、MS11 セイヨウナタネは非組換えセイヨウナタネと差異はなく、①収穫時期 (成熟程度) と貯蔵方法、②家畜等の摂取 (可食) 部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法についても非組換えセイヨウナタネと変わりはない。

(1) ~ (4) より、MS11 セイヨウナタネの飼料としての安全性評価においては、非組換え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

MS11 セイヨウナタネは、改変 PAT たん白質を発現することにより、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与されており、除草剤グルホシネートを散布されても影響を受けずに生育することができる。そのため、除草剤グルホシネートを生育期間中に散布することができ、効率的な雑草防除が可能になる。

また、改変 BARNASE たん白質の発現により雄性不稔形質を持つため、*barstar* 遺伝子を有する稔性回復性遺伝子組換えセイヨウナタネを花粉親として交配させることにより、確実に F1 種子を得ることができる。

なお、MS11 セイヨウナタネの飼料としての利用目的及び利用方法は非組換えセイヨウナタネと相違ない。

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

MS11 セイヨウナタネの宿主は、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.) のカノーラ品種 N90-740 系統であ

る。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

85 セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、キャベツ、カリフラワー等が属する *B. oleracea* と、ハクサイ、コマツナ等が属する *B. rapa* との種間交雑に由来すると考えられている (OECD, 1997、飛驒, 2004、由比, 2004)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

90 セイヨウナタネには、有害生理活性物質としてエルシン酸、グルコシノレート、タンニン、フィチン酸及びシナピンが含まれている (OGTR, 2008、OECD, 2011)。エルシン酸含量の多い油を多量に摂取すると心機能障害を起こす可能性があり、含硫配糖体のグルコシノレートには甲状腺肥大作用がある (生井, 2010)。タンニンはたん白質や炭水化物と結合し、消化能力を低下させる (OECD, 2011)。
95 フィチン酸は、動物におけるミネラルの吸収量を減少させる (OECD, 2011)。シナピンは、辛味及び苦味を与えるアルカロイドである (OGTR, 2008)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

100 セイヨウナタネは種子植物であり、家畜等に対する寄生性又は定着性は知られていない。

(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

105 セイヨウナタネには、ウイルス、細菌及び糸状菌の感染によって各種病害が発生することが知られている (OECD, 1997)。しかし、これら病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

(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

110 セイヨウナタネは、原産地のカナダで、道路沿いや廃棄物処理場等で自生が認められている (OECD, 1997)。我が国では、北海道から九州にかけて河原や線路沿いで自生が確認されている (清水ら, 2008、中井, 2003)。港周辺で運搬時のこぼれ落ちが原因と考えられる生育も確認されているが、他の植物との競合がおこる条件下では、セイヨウナタネの生育が確認できないか、生育が確認された場合でも極めて短期間に消滅することが報告されている (農林水産省, 2009)。

115 (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る。我が国では秋播き品種が用いられ、東北地方のような寒地では 8～9 月に播種し、翌年の 6～7 月に収穫する。また、九州のような暖地では 10～11 月に播種し、翌年の 4～5 月に収穫する (石井, 1999)。

120 また、セイヨウナタネと自然交雑可能な近縁野生種 (OECD, 1997、FitzJohn *et al*, 2007、OGTR, 2008) のうち、我が国に生育する種として、カラシナ (*B. juncea*)、アブラナ (在来ナタネ; *B. rapa*)、セイヨウノダイコン (*Raphanus*

raphanistrum)、ノハラガラシ (*Sinapis arvensis*)、クロガラシ (*B. nigra*) 及びダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*) が知られている (村中, 2003、清水ら, 2008、中井, 2003)。

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

MS11 セイヨウナタネの宿主であるカノーラ品種は、低エルシン酸及び低グルコシノレートの品種として開発され、飼料として広く利用されている (OGTR, 2008)。

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

セイヨウナタネのカノーラ品種は、エルシン酸及びグルコシノレートの含量が低減されており、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

主な栽培国であるカナダの大部分のセイヨウナタネ品種は、春播き品種であり、2℃以下で発芽率が低下し (Canola Council of Canada, 2003)、-6℃未満で生存が困難となる (CFIA, 1994)。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

アブラナ属植物 (*Brassica*) は、種子にエルシン酸が (Yaniv *et al.*, 1991、Velasco *et al.*, 1998、Mandal *et al.*, 2002)、種子及び茎葉にグルコシノレートが含まれることが知られている (Daxenbichler *et al.*, 1991、Antonious *et al.*, 2009)。セイヨウナタネにもエルシン酸、グルコシノレートが含まれているが、カノーラ品種は、品種改良によりこれらの含量が低くなっている (生井, 2010)。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

MS11 セイヨウナタネの作出に用いられた改変 *bar* 遺伝子、改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子を含む直鎖状 DNA 断片は、プラスミド pTCO113 から切り出した断片である。プラスミド pTCO113 は大腸菌 (*Escherichia coli*) 由来のプラスミド pGSC1700 を基本骨格として作製されている。なお、プラスミド pTCO113 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

プラスミド pTCO113 の塩基数は 13,540 bp である。また、プラスミド pTCO113 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、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

プラスミド pTCO113 には抗生物質スペクチノマイシン及びストレプトマイシン

165 に対する耐性を付与する *aadA* 遺伝子が含まれており、同プラスミドを含む微生物
の選抜マーカーとして用いられているが、形質転換に用いられた直鎖状 DNA 断片
には含まれていない。なお、*aadA* 遺伝子が MS11 セイヨウナタネに挿入されてい
ないことはサザンブロット分析により確認されている（参考資料 4）。

(4) 伝達性に関する事項

170 プラスミド pTCO113 には、宿主植物から他の生物へ伝達を可能とする配列は含
まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

175 プラスミド pTCO113 の宿主域は、大腸菌 (*E. coli*) 等数種のグラム陰性菌に限
られており、他の植物、家畜等が宿主となることはない。

(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

180 プラスミド pGSC1700 に改変 *bar* 遺伝子カセット、改変 *barnase* 遺伝子カセッ
ト及び *barstar* 遺伝子カセットを挿入することによりプラスミド pTCO113 を作製
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

185 宿主への遺伝子の導入には、アグロバクテリウム法を用いており、導入用プラ
スミド pTCO113 の T-DNA 領域をセイヨウナタネゲノム中に挿入した。

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

190 MS11 セイヨウナタネに導入された改変 *bar* 遺伝子の供与体は、放線菌
S. hygroscopicus である。また、改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の供与
体は、土壌細菌 *B. amyloliquefaciens* である。

② 安全性に関する事項

195 *S. hygroscopicus* は、土壌及び水中に広範に存在する放線菌であり、根菜や
その他の野菜を介してヒトが食してきた経験がある。またヒト及び家畜に対し
ての病原性は知られていない。

B. amyloliquefaciens は、自然環境中に広く存在する一般的な土壌細菌であ
り、食品としては世界各国で発酵食品に利用されている。またヒト及び家畜に
対する病原性は知られていない（参考資料 3）。

200

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

宿主であるカノーラ品種 N90-740 系統に対し、改変 *bar* 遺伝子、改変 *barnase*
遺伝子及び *barstar* 遺伝子を含む導入用プラスミド pTCO113 を用いて、アグロバ
クテリウム法により形質転換を行った。形質転換体を除草剤グルホシネート耐性

205 の有無により選抜し、再生個体を得た。その後、自殖及び既存の優良品種との交配を行うことにより MS11 セイヨウナタネを得た。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

210 改変 *bar* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のリブローズ-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニット遺伝子のプロモーター領域である *PssuAt* が用いられている (Krebbers *et al.*, 1988)。

215 改変 *barnase* 遺伝子のプロモーターは、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の葯特異的遺伝子 *TA29* のプロモーター領域である *Pta29* が用いられている (Seurinck *et al.*, 1990)。

 改変 *barstar* 遺伝子のプロモーターは、*R. radiobacter* 由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター領域である *Pnos* が用いられている (Depicker *et al.*, 1982)。

220

② ターミネーターに関する事項

 改変 *bar* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子のターミネーターは、*R. radiobacter* 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子のターミネーター領域 3'g7 が用いられている (Dhaese *et al.*, 1983)。

225 改変 *barnase* 遺伝子のターミネーターは、*R. radiobacter* 由来 pTiT37 プラスミドのノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター領域 3'nos が用いられている (Depicker *et al.*, 1982)。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

230 導入用プラスミド pTCO113 に含まれる全ての挿入 DNA 領域の各構成要素の由来及び機能は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていない (参考資料 2)。

(4) 性質に関する事項

235 導入用プラスミド pTCO113 の挿入 DNA 領域の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。改変 *bar* 遺伝子、改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の機能については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の構成要素の由来及び機能

構成要素	由 来 及 び 機 能
改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット	
3'g7 ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 のターミネーター領域で、転写を終結させる (Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。
改変 <i>bar</i> 遺伝子	<i>S. hygroscopicus</i> 由来のホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素 (改変 PAT たん白質) をコードする遺伝子で、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する (Thompson <i>et al.</i> , 1987)。

PssuAt プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のリブロー-1,5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ小サブユニット遺伝子の転写を誘導するプロモーターで、緑色組織での発現を誘導する (Krebbers <i>et al.</i> , 1988)。
3'nos ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> 由来プラスミド pTiT37 のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域で、転写を終結させる。
改変 <i>barnase</i> 遺伝子	<i>B. amyloliquefaciens</i> 由来のリボヌクレアーゼ (改変 BARNASE たん白質) をコードする遺伝子で、薬特異的プロモーターPta29 によりタペート細胞において改変 BARNASE たん白質を発現し、RNA を破壊することで雄性不稔形質を付与する (Hartley, 1988)。
Pta29 プロモーター	タバコ(<i>Nicotiana tabacum</i>)由来の薬特異的遺伝子 <i>TA29</i> のプロモーターで、薬のタペート細胞において特異的に転写を誘導する (Seurinck <i>et al.</i> , 1990)。
Pnos プロモーター	<i>R. radiobacter</i> 由来のノパリン合成酵素遺伝子のプロモーターで非常に低い転写活性を示す。
<i>barstar</i> 遺伝子	<i>B. amyloliquefaciens</i> 由来のリボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR たん白質) をコードする遺伝子で、これにより改変 BARNASE たん白質の活性を阻害する (Hartley, 1988)。
3'g7 ターミネーター	<i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子のターミネーター領域で、転写を終結させる (Dhaese <i>et al.</i> , 1983)。

240 【 改変 *bar* 遺伝子の機能 】

改変 *bar* 遺伝子から発現する改変 PAT たん白質は、植物に除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する。

245 植物は窒素代謝の過程で、硝酸塩の還元、アミノ酸の分解、光呼吸等によりアンモニアを生成する。生成されたアンモニアの無毒化にはグルタミン合成酵素が中心的役割を果たしているが、除草剤グルホシネートを散布すると、グルタミン合成酵素が
250 阻害されてアンモニアが蓄積し植物は枯死する。一方で改変 PAT たん白質は、グルホシネートをアセチル化して無毒性の N-アセチル-L-グルホシネートへと代謝し、グルホシネートのグルタミン合成酵素への阻害活性を不活化する (OECD, 1999)。これによりアンモニアは蓄積されず、除草剤グルホシネートを散布しても植物は枯死しない。

250 【 改変 *barnase* 遺伝子の機能 】

改変 *barnase* 遺伝子から発現する改変 BARNASE たん白質は、植物に雄性不稔形質を付与する。

255 植物における花粉形成は葯内で行われており、葯組織のひとつであるタペート細胞は、花粉形成及び発達において栄養供給の役割を担っている (高畑, 2005)。一方で改変 BARNASE たん白質は RNA を分解するエンドリボヌクレアーゼであり、改変 *barnase* 遺伝子が薬特異的プロモーターPta29 によってタペート細胞のみにおいて発現することで、タペート細胞の RNA を分解する。その結果タペート細胞が破壊され、花粉形成が阻害される (Drews and Goldberg, 1989; Hartley, 1989; Mariani
260 *et al.*, 1990)。

【 *barstar* 遺伝子の機能 】

barstar 遺伝子から発現する BARSTAR たん白質は、改変 BARNASE たん白質を特異的に阻害する物質である (Hartley and Barker, 1972; Hartley, 1989)。

265 上述のとおり改変 *barnase* 遺伝子は薬特異的プロモーターによりタペート細胞でのみ発現するが、アグロバクテリウム法によって形質転換体を作成する際に非意図的に改変 *barnase* 遺伝子の発現が起こり、形質転換体の細胞を破壊する可能性を想定し、改変 BARNASE たん白質の活性を抑える目的で *barstar* 遺伝子が組み込まれている。

270

(5) 純度に関する事項

導入用プラスミド pTCO113 の塩基数は 13,540 bp であり、その塩基配列、構成及び由来は明らかとなっており、またシーケンス解析により目的以外の遺伝子は含まれないことが確認されている (参考資料 2)。

275

(6) コピー数に関する事項

MS11 セイヨウナタネに導入された挿入 DNA 領域のコピー数及び構成を確認するため、サザンブロット分析及び PCR 解析を行った。その結果、MS11 セイヨウナタネのゲノム中に、挿入 DNA 領域が 1 コピー挿入されていること、挿入 DNA 領域以外の導入用プラスミド pTCO113 配列が存在しないことが確認された。(参考資料 4,27)

280

MS11 セイヨウナタネ中の挿入遺伝子の構成を確認し、挿入遺伝子とその近傍配列の塩基配列を決定するため、塩基配列解析を行った。その結果、挿入部位において 40bp の欠損が見られた事を除き、挿入遺伝子 MS11 セイヨウナタネ中に挿入された遺伝子と、導入用プラスミド pTCO113 の挿入 DNA 領域の塩基配列は一致しており、各構成要素に欠損はないことが確認された (参考資料 5,6)。

285

挿入 DNA の導入による内在性の遺伝子への影響を確認するため、挿入部位の近傍配列について、BLASTn 及び BLASTx 検索を行った。その結果、5' 末端近傍配列から 3' 末端近傍配列に跨った配列は見られなかった。このため、挿入遺伝子によるセイヨウナタネ内在性遺伝子への影響はないことが確認された (参考資料 7)。

290

(7) 安定性に関する事項

MS11 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、5 世代の MS11 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、導入遺伝子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ている (参考資料 8)。

295

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

MS11 セイヨウナタネにおける改変 PAT たん白質、改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質の発現量を ELISA 法により測定した (参考資料 9)。サ

300

305 サンプル(植物体、花序、種子・根)は米国及びカナダの 3 か所のほ場から、異なる生育時期に採取した。測定の結果、改変 PAT たん白質は供試したすべての組織サンプルから発現が確認された。また改変 BARNASE たん白質はすべての組織サンプルで検出限界以下であり、BARSTAR たん白質は茎伸長期（根）及び開花初期（植物体、花序、根）において微量の発現が確認された。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

310 導入用プラスミド pTCO113 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 *aadA* 遺伝子が存在するが、形質転換には導入プラスミド pTCO113 から切断された挿入遺伝子領域のみを含む断片が用いられているため、MS11 セイヨウナタネ中に *aadA* 遺伝子は挿入されていない。なお、MS11 セイヨウナタネ中に抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことは、サザンブロット分析により確認されている（参考資料 4）。

315

(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

320 MS11 セイヨウナタネの導入遺伝子とその近傍配列の両境界領域におけるオープンリーディングフレーム（ORF）の形成の有無を確認するため、6 つの読み枠でストップコドンからストップコドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF 検索を行った結果、107 個の ORF が検出された。これら 107 個の ORF について、既知の毒性たん白質等との相同性検索を行った結果、相同性を示す配列は認められなかった（参考資料 10）。

325 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

330 MS11 セイヨウナタネに導入された改変 *bar* 遺伝子は、改変 PAT たん白質をコードしており、MS11 セイヨウナタネに除草剤グルホシネートに対する耐性を付与している。また改変 *barnase* 遺伝子は改変 BARNASE たん白質をコードしており、MS11 セイヨウナタネに雄性不稔形質を付与している。さらに、*barstar* 遺伝子は BARSTAR たん白質をコードしており、MS11 セイヨウナタネに葯組織以外での改変 BARNASE たん白質の活性を抑える性質が付与されている。これらの点を除けば、MS11 セイヨウナタネは非組換え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変わらない。

335

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

340 改変 PAT たん白質、改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質と既知の毒素たん白質との構造相同性を確認するため、National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されている全てのたん白質データベースを対象に相同性検索を行った。その結果、改変 PAT たん白質、改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質との間に相同性は認められなかった（参考資料 11）。

(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

345 *E. coli* で発現させた改変 PAT たん白質、改変 BARNASE たん白質及び
BARSTAR たん白質を用いて人工胃液 (SGF) 及び人工腸液 (SIF) 消化試験並び
に加熱処理感受性試験を行った。なお、*E. coli* で発現させたこれらのたん白質と
MS11 セイヨウナタネ中で発現するこれらたん白質の同等性に関しては、改変
PAT たん白質については分子量、ペプチド分析、免疫反応性、アミノ酸配列 (N
350 末端分析)、酵素活性及び糖たん白質染色分析の有無により (参考資料 12)、ま
た改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質については、アミノ酸配列の
相同性により確認されている (参考資料 13)。

① 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

355 SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により、改変 PAT たん白質、
改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質の人工胃液中での消化性を評
価した。その結果、改変 PAT たん白質の SDS-PAGE 分析では、試験開始 30 秒
後には改変 PAT たん白質のバンドは検出されなくなった。またウエスタンブ
ロット分析においても、試験開始 30 秒後には改変 PAT たん白質のバンドは検出
360 されず、分解産物のバンドも認められなかった。このことから、改変 PAT たん
白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認されている (参考資料 14)。

また改変 BARNASE たん白質について人工胃液処理を行ったところ、SDS-
PAGE 分析では試験開始の 30 秒後には改変 BARNASE たん白質のバンドは検
出されなくなった。またウエスタンブロット分析においても、試験開始の 30 秒
365 後には改変 BARNASE たん白質のバンドは検出されず、分解産物のバンドも認
められなかった。このことから、改変 BARNASE たん白質は人工胃液中で速や
かに消化されることが確認されている (参考資料 18)。

同様に BARSTAR たん白質については、SDS-PAGE 分析では試験開始 30 秒
後には BARSTAR たん白質のバンドは検出されなくなった。またウエスタンブ
370 ロット分析においても、試験開始 30 秒後には BARSTAR たん白質のバンドは
検出されず、多量体や分解産物のバンドも認められなかった。このことから、
BARSTAR たん白質は人工胃液中で速やかに消化されることが確認されている
(参考資料 22)。

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

375 SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析により、改変 PAT たん白質、
改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質の人工腸液中での消化性を評
価した。その結果、改変 PAT たん白質については SDS-PAGE 分析及びウエス
タンブロット分析において試験開始直後から改変 PAT たん白質のバンドが検出
380 されなかった。このことから、改変たん白質は人工腸液中で速やかに消化され
ることが確認されている (参考資料 15)。

また改変 BARNASE たん白質について人工腸液処理を行ったところ、SDS-
PAGE 分析では反応開始 60 分後まで改変 BARNASE たん白質及びその分解物

385 と考えられるバンドが確認された。ウエスタンブロット分析においても反応開始 60 分後まで改変 BARNASE たん白質及びその二量体と考えられるバンドが確認された。このことから、改変 BARNASE たん白質は 60 分間の人工腸液処理においては分解されないことが確認されている（参考資料 19）。

390 同様に BARSTAR たん白質については、SDS-PAGE 分析では陽性対照に比べ薄いものの、反応開始 60 分後まで BARSTAR たん白質のバンドが確認された。ウエスタンブロット分析においては反応時間に伴い徐々にバンドが薄くなり、反応開始 20 分後において陽性対照以下であるものの、バンドが確認された。このことから、BARSTAR たん白質は人工腸液処理において徐々に分解されることが確認されている（参考資料 23）。

395 ③ 加熱処理

改変 PAT たん白質、改変 BARNASE たん白質及び BARSTAR たん白質の加熱処理に対する感受性を、ELISA 分析によって評価した。その結果、改変 PAT たん白質について 55℃以上で 30 分間処理した場合、改変 PAT たん白質は検出されなくなった（参考資料 16）。また改変 PAT たん白質の加熱時の酵素活性を測定した結果、55℃以上で 30 分間処理した場合、改変 PAT たん白質の活性は測定されなかった（参考資料 17）。以上から、改変 PAT たん白質は 55℃以上の熱で失活することが確認されている。

400 また改変 BARNASE たん白質について加熱処理を行ったところ、55℃で 30 分間処理した場合 70%に濃度が低下した。さらに 95℃で 30 分間処理した場合、濃度は 19%まで低下した（参考資料 20）。酵素活性についても 55℃で 30 分間処理した場合、83%まで低下し、95℃の場合は活性が測定されなかった（参考資料 21）。以上から、改変 BARNASE たん白質は 55℃以上の熱に不安定であることが確認されている。

410 同様に BARSTAR たん白質については、75℃以上で 30 分間処理した場合に濃度の低下が見られ、95℃では 54%まで減少した。また改変 BARNASE たん白質阻害活性については、改変 BARNASE たん白質を用いた滴定を用いて測定した。その結果、BARSTAR たん白質は 75℃以上の処理で改変 BARNASE たん白質阻害活性が低下し、95℃で 30 分間の処理により活性が失われることが示された（参考資料 24）。以上から、BARSTAR たん白質は 75℃以上の熱に不安定であり、95℃以上で改変 BARNASE たん白質阻害活性を失うことが確認されている。

（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

① 改変 PAT たん白質

420 PAT たん白質は、グルホシネートをアセチル化することで、植物に対して毒性のない N-アセチル-L-グルホシネートへ代謝する酵素である。PAT たん白質は、アミノ酸に分類されるグルホシネートに高い基質特異性を示すものの、他の各種アミノ酸にアセチル基を転移することはなく、特に構造が類似しているグルタミン酸への特異性も低い（Thompson *et al.*, 1987）。また、過剰の各種ア

425 ミノ酸の存在下でも、PAT たん白質によるグルホシネートへのアセチル基転移
反応が阻害されることはなかった (Wehrmann *et al.*, 1996)。これらから、改
変 PAT たん白質は高い基質特異性を有し、生体内において改変 PAT たん白質
の発現が宿主の代謝経路に影響を及ぼすことはないと考えられる。

430 ② 改変 BARNASE たん白質

改変 BARNASE たん白質は MS11 においては薬特異的プロモーター Pta29 に
誘導され発現するが、その発現はタペート細胞でのみ確認されている (Mariani
et al., 1990)。また ELISA 法により MS11 における改変 BARNASE たん白質
435 の発現量を確認したところ、全ての組織において検出限界以下であった。この
ため、改変 BARNASE たん白質がタペート細胞以外の植物組織において発現し、
RNA を分解する可能性は考えにくい。このため、改変 BARNASE たん白質が
宿主の持つ代謝経路に影響を及ぼす可能性はないと考えられる。

③ BARSTAR たん白質

440 BARSTAR たん白質は BARNASE たん白質と特異的に結合し、その複合体の
安定性は高い (Makarov *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1995)。また、植物中の
リボヌクレアーゼに対する BARSTAR たん白質の阻害作用は報告されておらず、
またヒトや動物のリボヌクレアーゼとは結合しない (Smeaton and Elliott,
1967; Hill *et al.*, 1983; Hartley, 1988, 1989)。また MS11 において *barstar* 遺
445 伝子は転写活性の低い Pnos プロモーターによって発現するため、その発現量は
微量である。このため、BARSTAR たん白質が宿主の持つ代謝経路に影響を及
ぼす可能性はないと考えられる。

(5) 宿主との差異に関する事項

450 MS11 セイヨウナタネ及び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、2014 年に米国及びカナダの 9 か所のほ場において栽培した MS11 セイ
ヨウナタネ、対照の非組換えセイヨウナタネ (宿主 N90-740 系統) 及び複数の商
業品種 (非組換えカノーラ品種) の種子について、①主要構成成分、②脂肪酸、
③アミノ酸、④ミネラル、⑤ビタミン及び⑥有害生理活性物質の分析を行ってい
455 る (参考資料 25)。

① 主要構成成分

種子中の水分、灰分、炭水化物、粗脂肪、粗たん白質、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した結果、炭水化物を除く成分について
460 対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に統計学的有意差が認められたが、
いずれの成分も同条件で栽培した商業品種から得られた分析値の範囲内であっ
た。

② 脂肪酸

465 種子中の各脂肪酸について分析した結果、パルミチン酸、ステアリン酸、オ

レイン酸、アラキジン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ネルボン酸について対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に統計学的有意差が認められたが、いずれの脂肪酸も同条件で栽培した商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

470

③ アミノ酸

種子中の各アミノ酸について分析した結果、アラニン、シスチン、リジン、フェニルアラニン、プロリン、セリンについて統計学的有意差が認められたが、いずれのアミノ酸も同条件で栽培した商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

475

④ ミネラル

種子中の各ミネラルについて分析した結果、銅、マグネシウム、リン、カリウム、亜鉛について統計学的有意差が認められたが、いずれのミネラルも同条件で栽培した商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

480

⑤ ビタミン

種子中の各ビタミンについて分析した結果、γ-トコフェロール及びビタミンKについて統計学的有意差が認められたが、いずれのビタミンも同条件で栽培した商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

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、グルコシノレート類、タンニン、フィチン酸及びシナピンについて分析した結果、グルコナピン、不溶性タンニン、プロゴイトリン及び総グルコシノレートにおいて統計学的有意差が認められたが、いずれの有害生理活性物質も同条件で栽培された商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

490

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

495

これまでに行われたほ場試験において、非組換えセイヨウナタネと MS11 との間に生存及び増殖能力の差異は認められていない。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

500

MS11 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。

(8) 不活化法に関する事項

505

MS11 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。

(9) 外国における認可等に関する事項

2016 年 8 月に米国食品医薬品局 (FDA) へ食品・飼料としての安全性確認審査の申請を行い、2017 年 10 月に承認を得ている。また同時に米国農務省 (USDA) へ無規制栽培の申請を行い、2017 年 7 月に承認を得ている。

510 2017 年 1 月にカナダ保健省 (Health Canada) へ食品としての、またカナダ食品検査庁 (CFIA) へ環境及び飼料としての安全性確認審査の申請を行い、2018 年 1 月に承認を得ている。

2016 年 12 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) へ食品についての安全性確認審査の申請を行い、2017 年 12 月に承認を得ている。

515

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

MS11 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ルホシネートを使用できることを除いて、非組換えセイヨウナタネと同様である。

520 MS11 セイヨウナタネへの使用が想定される除草剤グルホシネートについて、その代謝物 (N-アセチルグルホシネート及び 3-メチルホスフィニコ-プロピオン酸) を含め MS11 セイヨウナタネへの残留を検証した結果 (参考資料 26)、安全上の問題は認められなかった。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

525 MS11 セイヨウナタネの種子の製法及び管理方法は非組換えセイヨウナタネと同様である。

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

530 該当しない。

IV 審議結果

535 除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ MS11 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続」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Antonious, G.F., Bomford, M. and Vincelli, P. 2009. Screening *Brassica* species for glucosinolate content. *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 44: 311-316.
2. Canola Council of Canada. 2003. Chapter 5 - temperature, frost, hail. *Canola Grower's Manual*. (<http://www.canolacouncil.org/crop-production/canola-grower's-manual-contents/>) Accessed on January 11. 2013.
3. CFIA. 1994. Biology Document BIO1994-09: The biology of *Brassica napus* L. (canola/rapeseed). Canadian Food Inspection Agency. (<http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dir/dir9409e.pdf>) Accessed on January 11. 2013.

4. Daxenbichler, M.E., Spencer, G.F., Carlson, D.G., Rose, G.B., Brinker, A.M. and Powell, R.G. 1991. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. *Phytochemistry*. 30: 2623-2638.
5. Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., Goodman, H.M., (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1, 561-573.
6. Dhaese, P., De Greve, H., Gielen, J., Seurinck, L., Van Montagu, M., Schell, J., (1983) Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *The EMBO Journal* 2, 419-426.
7. Drews, G.N., Goldberg, R.B., (1989) Genetic control of flower development. *Trends in Genetics* 5, 256-261.
8. FitzJohn, R. G., Armstrong, T. T., Newstrom-Lloyd, L. E., Wilton A. D. and Cochrane M. 2007. Hybridisation within *Brassica* and allied genera: evaluation of potential for transgene escape. *Euphytica*. 158:209-230.
9. Hartley, R.W., Barker, E.A., (1972) Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nature new biology* 235, 15-16.
10. Hartley, R.W., (1988) Barnase and barstar: Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *Journal of Molecular Biology* 202, 913-915.
11. Hartley, R.W., (1989) Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends in Biochemical Sciences* 14, 450-454.
12. Hill, C., Dodson, G., Heinemann, U., Seanger, W., Mitsui, Y., Nakamura, K., Borisov, S., Tischenko, G., Polyakov, K., Pavlovsky, S. (1983) The structural and sequence homology of a family of microbial ribonucleases. *Trends in Biochemical Sciences*. 8: 364-369.
13. Krebbers, E., Seurinck, J., Herdies, L., Cashmore, A., Timko, M., (1988) Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 11, 745-759.
14. Makarov, A.A., Protasevich, II, Kuznetsova, N.V., Fedorov, B.B., Korolev, S.V., Struminskaya, N.K., Bazhulina, N.P., Leshchinskaya, I.B., Hartley, R.W., Kirpichnikov, M.P., et al., (1993) Comparative study of thermostability and structure of close homologues-barnase and binase. *Journal of biomolecular structure & dynamics* 10, 1047-1065.
15. Mandal, S., Yadav, S., Singh, R., Begum, G., Poonam, S. and Singh, M. 2002. Correlation studies on oil content and fatty acid profile of some cruciferous species. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 49: 551-556.
16. Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R.B., (1990) Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature* 347, 737-741.
17. Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L., Schreiber, G., Fersht, A.R., (1995) A calorimetric study of the thermal stability of Barstar and its interaction with Barnase. *Biochemistry*, 34, 5224-5233.
18. OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (Oilseed rape). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No. 7.

- (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/biosafety-biotrack/27531440.pdf>)
19. 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.
 20. OECD. 2011. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Series on the safety of novel foods and feeds No. 24.
(<http://www.oecd.org/chemicalsafety/biosafety-biotrack/49343153.pdf>).
 21. OGTR. 2008. Office of the gene technology regulator (OGTR), Department of health and ageing, Australian government. The Biology of *Brassica napus* L. (canola). pp.2-3, 21-23.
 22. Seurinck, J., Truettner, J., Goldberg, R.B., (1990) The nucleotide sequence of an anther-specific gene. Nucleic Acids Research 18, 3403.
 23. Smeaton, J.R., Elliott, W.H., (1967) Isolation and properties of a specific bacterial ribonuclease inhibitor. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis 145, 547-560.
 24. Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Cramer, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., Botterman, J., (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. The EMBO journal 6, 2519-2523.
 25. Velasco, L., Goffman, F.D. and Becker, H.C. 1998. Variability for the fatty acid composition of the seed oil in a germplasm collection of the genus *Brassica*. Genetic Resources and Crop Evolution. 45: 371-382.
 26. 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. Nature Biotech 14, 1274-1278.
 27. Yaniv, Z., Elber, Y., Zur, M. and Schafferman, D. 1991. Differences in fatty acid composition of oils of wild cruciferae seed. Phytochemistry. 30: 841-843.
 28. 石井龍一. 1999. “5.1.c.生育特性と栽培”. 作物学各論. 朝倉書店. p.112.
 29. 石田正彦. 2004. “特用作物”. 新編 農学大事典 第1版. 養賢堂. pp.614-615.
 30. 清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七. 2008. “セイヨウアブラナ”. 改訂版. 日本帰化植物写真図鑑. 全国農村教育協会. pp.90-91.
 31. 高畑義人. 2005. “タペート細胞”. 植物育種学辞典. 培風社. p.409.
 32. 中井秀樹. 2003. “アブラナ科”. 日本の帰化植物. 清水建美編. 平凡社. pp.80-96.
 33. 生井兵治. 2010. “アブラナ科作物（ブラシカ）”. 品種改良の世界史 作物編. 鶴飼保雄, 大澤良 編著. 悠書館. pp.376-378.
 34. 農林水産省. 2009. 輸入港周辺におけるセイヨウナタネ個体群の調査結果（続報）
(http://www.s.affrc.go.jp/docs/press/pdf/090304_1-01.pdf) Accessed on January 11. 2013.
 35. 飛騨健一. 2004. “園芸作物”. 新編 農学大事典 第1版. 養賢堂. pp.542-543.
 36. 村中孝司. 2003. “外来種リスト（維管束植物）”. 外来種ハンドブック. 日本生態学会. 初版. 地人書館. pp.320-353.
 37. 由比進. 2004. “園芸作物”. 新編 農学大事典 第1版. 養賢堂. pp.544-546.

1. C. Dharmasri *et al.*, 2017: MS11 *B.napus*-Composition analysis of field samples grown in Canada and the USA during 2014.
2. K. Peeters, 2015: Sequence determination of plasmid pTCO113.
3. A. Capt, 2009: Barnase and Barstar proteins –History of safe use.
4. K. Peeters, 2017: Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in *Brassica napus* MS11.
5. V. Habex, 2008: Full DNA sequence of event insert and integration site of *Brassica napus* transformation event MS11.
6. K. Mertens, 2016: Determination of additional flanking sequences and corresponding insertion locus in *Brassica napus* MS11.
7. A. Kindt, 2016: Bioinformatics analysis of MS11 *Brassica napus* insertion locus
8. K. Peeters, 2016: Structural stability analysis of *Brassica napus* MS11
9. C. Dharmasri *et al.*, 2016: MS11 *Brassica napus* –Summary of protein expression analyses of field samples grown in Canada and the USA during 2014.
10. J. B. Rasclé, 2016: MS11 *Brassica napus* –Identification of Open Reading Frames(ORF) and homology search of sequences of more than 30 amino acids to known allergens and toxins.
11. A. Capt, 2016: PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins.
12. N. Vandermarliere, 2015: Characterization of plant produced PAT/*bar* protein purified from MS11 *Brassica napus* plants (batch 1520_PAT bar(MS11)) and comparability with the recombinant protein batch 1215_PAT bar.
13. H. Vigeolas, 2017: Barnase and Barstar proteins in MS11 *Brassica napus*: equivalency.
14. J. B. Rasclé, 2009: PAT/*bar* protein *in vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid.
15. D. Rouquie, 2016: PAT/*bar* protein *in vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid.
16. M. Cheever, 2016: The effect of temperature on PAT/*bar* as assessed by ELISA.
17. H. Serrano, 2016: The effect of temperature on PAT/*bar* as assessed by the PAT quantitative activity assay.
18. S. Lautraite, 2012: BARNASE protein *in vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid at pH1.2.
19. D. Rouquie, 2016: BARNASE protein *in vitro* digestibility study in human simulated intestinal fluid.
20. H. Serrano, 2013: The effect of temperature on microbially produced Barnase assessed by ELISA.
21. H. Serrano, 2014: The effect of temperature on microbially-produced Barnase assessed by the Barnase quantitative activity assay.
22. S. Lautraite, 2012: BARSTAR protein *in vitro* digestibility study in human simulated gastric fluid at pH1.2.

23. D. Rouquie, 2016: BARSTAR protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid.
24. H. Serrano, 2014: The effect of temperature on microbially-produced Barstar assessed by the Barstar quantitative activity assay.
25. C. Dharmasri et al., 2017: MS11 *B.napus*-Composition analysis of field samples grown in Canada and the USA during 2014.
26. A. M. Harbin, 2017 : Glufosinate –Ammorium: Magnitude of residue in/on MS11xRF3 canola following two applications of Liberty150 SN in Canada.
27. K. Peeters, 2018: Additional vector backbone analysis for MS11 *Brassica napus*.