

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

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

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.....	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	6
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	7
第3. 宿主に関する事項.....	7
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	7
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	7
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	7
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	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.....	10
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	11
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	12
第6. 組換え体に関する事項.....	13
1. 遺伝子導入に関する事項.....	13

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	14
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	15
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項.....	15
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	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.....	20
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	20
第7. 第2から第6までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項.....	20
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	20
<参照>.....	22

<審議の経緯>

- 2019年4月5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0403第1号）、関係書類の接受
- 2019年4月9日 第738回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2019年4月26日 第186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>

中島 春紫（座長）
小関 良宏（座長代理）
児玉 浩明（座長代理）
飯島 陽子 手島 玲子
岡田 由美子 樋口 恭子
橘田 和美 山川 隆
近藤 一成 吉川 信幸
柘植 郁哉

要 約

「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、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、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素遺伝子を導入して作出されており、改変 PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートを散布してもその影響を受けずに生育できるとされている。また、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の改変 *barnase* 遺伝子は改変 BARNASE タンパク質をコードし、薬特異的プロモーターPta29 の支配下で薬のタペート細胞においてリボヌクレアーゼである改変 BARNASE タンパク質を発現する。その結果、薬形成時にタペート細胞において RNA を分解することにより花粉形成を阻害し、雄性不稔形質を付与する。なお、*B. amyloliquefaciens* 由来の *barstar* 遺伝子は、BARSTAR タンパク質をコードし、アグロバクテリウム法により形質転換効率を向上させる目的で導入した。

「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等について確認した結果、非組換えセイヨウナタネと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「除草剤グルホシネート耐性及び雄性不稔セイヨウナタネ MS11」は、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

名称：除草剤グ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（米国）

「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「セイヨウナタネ MS11」という。）は、*Streptomyces hygroscopicus* に由来する改変ホスフィノスリシン・アセチル基転移酵素遺伝子を導入して作出されており、改変 PAT タンパク質を発現することで、除草剤グルホシネートを散布してもその影響を受けずに生育できるとされている。また、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の改変 *barnase* 遺伝子は改変 BARNASE タンパク質をコードし、薬特異的プロモーター Pta29 の支配下で薬のタペート細胞においてリボヌクレアーゼである改変 BARNASE タンパク質を発現する。その結果、薬形成時にタペート細胞において RNA を分解することにより花粉形成を阻害し、雄性不稔形質を付与する。なお、*B. amyloliquefaciens* 由来の *barstar* 遺伝子は、BARSTAR タンパク質をコードし、アグロバクテリウム法により形質転換効率を向上させる目的で導入した。

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、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の商業品種 N90-740 である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

改変 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygroscopicus* である。改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の供与体は、*B. amyloliquefaciens* である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *bar* 遺伝子は、除草剤グルホシネート耐性を付与する改変 PAT タンパク質をコードする。改変 *barnase* 遺伝子は、改変 BARNASE タンパク質をコードし、薬特異的プロモーター Pta29 の支配下で薬のタペート細胞においてリボヌクレアーゼである改変 BARNASE タンパク質を発現する。その結果、薬形成時にタペート細胞において RNA を分解することにより花粉形成を阻害し、雄性不稔形質を付与する。*barstar* 遺伝子は、BARSTAR タンパク質をコードし、形質転換効率を向上させる。これらの遺伝子は、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

低エルカ酸及び低グルコシノレートのカノーラ品種が育成され、種子から得られた油が食用として利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主の可食部分の主要栄養素等（タンパク質、脂質等）の種類及びその量の概要

セイヨウナタネの種子中の主要栄養組成(対乾燥重量)は、粗タンパク質 21.0～35.6%、粗脂質 26.4～49.7%、粗繊維 14.0～25.4%（酸性デタージェント繊維）及び 17.1～29.4%（中性デタージェント繊維）、灰分 1.36～7.99%並びに炭水化物 20.7～37.3%である（参照 1）。

(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

セイヨウナタネの種子中のエルカ酸及び総グルコシノレートの含有量は、それぞれ<2.0%（全脂肪酸（参照 2））及び 0.673～26.6 µmol/g（対乾燥重量）である。その他の栄養阻害物質（対乾燥重量）は、フィチン酸 0.31～3.78%、シナピン 0.337～1.022%、不溶性タンニン 0～0.749%及び可溶性タンニン 0～0.194%である（参照 1）。

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

セイヨウナタネ MS11 の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

セイヨウナタネ MS11 の摂取部位は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(3) 摂取量

セイヨウナタネ MS11 の摂取量は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(4) 調理及び加工方法

セイヨウナタネ MS11 の調理及び加工方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

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

セイヨウナタネ MS11 は、改変 *bar* 遺伝子の導入によって改変 PAT タンパク質を発現すること、改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の導入によって改変

BARNASE タンパク質及び BARSTAR タンパク質を発現することが宿主との相違点である。

以上1～6により、セイヨウナタネ MS11 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

セイヨウナタネ MS11 は、改変 PAT タンパク質を発現することによって、除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育することができる。また、改変 BARNASE タンパク質の発現により雄性不稔形質を有するが、*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との交配により、F1 種子を得ることができる。

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、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) の商業品種 N90-740 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

セイヨウナタネ (*B. napus*) は、*B. oleracea* と *B. rapa* との交雑に由来すると考えられている。従来のセイヨウナタネには、ヒトやその他の動物に有害なエルカ酸とグルコシノレートが含まれるため、これらの含量の低い品種の育種が行われた。すなわち、カナダにおける品種改良により開発された低エルカ酸及び低グルコシノレートのカノーラ品種である（参照 3）。

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有害生理活性物質として、エルカ酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン及びタンニンがある。エルカ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るため（参照 4、5）、コーデックス委員会では、全脂肪酸中のエルカ酸含量は 2%未満と規定されている（参照 2、6）。

グルコシノレートは含硫配糖体であり、それ自体は無害であるが、セイヨウナタネに含まれる酵素により加水分解されることで甲状腺腫誘発性作用等をもたらす可能性がある。このため、OECD のコンセンサス文書では油かす中のグルコシノレート含量を 30 $\mu\text{mol/g}$ 未満（対乾燥重量）とすることが示されている（参照 3）。

フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛等のミネラル吸収量を減少させる。シナピンは、腸内でトリメチルアミンに代謝され、さらに排泄しやすいトリメチルアミンオキシドに代謝されるが、これを速やかに異化できない動物が知られている。タンニンは、タンパク質や炭水化物と結合して消化能力を低下させる（参照 3）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

セイヨウナタネのカノーラ品種から得られるなたね油がアレルギー誘発性を持つという報告はない（参照 3）。

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

セイヨウナタネには、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

セイヨウナタネのカノーラ品種から得られるなたね油が食用に用いられる。

7. 近縁の植物種に関する事項

アブラナ属植物にはこれまで安全に摂取されてきた野菜が含まれる。主要な油糧作物であるアブラナには、セイヨウナタネと同様にエルカ酸及びグルコシノレートが含まれることが知られている。

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

セイヨウナタネ MS11 の作出に用いられた導入用プラスミド pTCO113 の外骨格領域である。

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 pTCO113 の外骨格領域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

導入用プラスミド pTCO113 の外骨格領域の制限酵素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 pTCO113 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 pTCO113 の外骨格領域には、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アミノグリコシドアデニル基転移酵素 (*aadA*) 遺伝子が含まれているが、セイヨウナタネ MS11 のゲノム中には挿入されていないことがサザンブロット分析により確認されている（参照 7）。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド pTCO113 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

改変 *bar* 遺伝子の供与体は、*S. hygrosopicus* である。改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の供与体は、*B. amyloliquefaciens* である（参照 8）。

(2) 安全性に関する事項

改変 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygrosopicus* は、土壌及び水中等に存在している放線菌であり、ヒトは根菜及びその他の野菜を生食する際に直接食している経験がある。ヒト、家畜等に対する病原体としては知られていない（参照 9）。

改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の供与体である *B. amyloliquefaciens* は、広く存在する土壌細菌で、発酵食品に利用されており、ヒト、家畜等に対する病原体としては知られていない（参照 10）。

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

改変 *bar* 遺伝子は、野生型 *bar* 遺伝子のコドンで植物における発現に適するように最適化して人工的に合成した。その結果、N-末端のメチオニンに続くセリンはアスパラギン酸に置換されている。

改変 *barnase* 遺伝子は、野生型 *barnase* 遺伝子のコドンで植物における発現に適するように最適化して人工的に合成した。その結果、N-末端のメチオニンに続くアラニン及びグルタミンはバリン及びプロリンにそれぞれ置換されている。

(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

T-DNA領域の塩基数、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11）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

①改変 *bar* 遺伝子

改変 *bar* 遺伝子がコードする改変 PAT タンパク質は、グルホシネートを N-アセチル化することにより、グルホシネートのグルタミン合成酵素に対する阻害作用を不活化する。通常、除草剤グルホシネートの散布により、植物の窒素代謝で生成されたアンモニアを無毒化するグルタミン合成酵素が阻害され、アンモニアが蓄積して生育不可となるが、セイヨウナタネ MS11 は、アンモニア

が蓄積しないため、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になるとされている。

改変 PAT タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^a及び毒性タンパク質データベース^bを用いて相同性検索を行った。その結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されなかった（参照 12）。

②改変 *barnase* 遺伝子

改変 *barnase* 遺伝子がコードする改変 BARNASE タンパク質は、リボヌクレアーゼの一つであり、薬特異的プロモーターPta29の制御下で、タペート細胞において一本鎖 RNA 分子を加水分解する。その結果、タペート細胞が破壊され、花粉形成を阻害する（参照 13、14）。

改変 BARNASE タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^a及び毒性タンパク質データベース^bを用いて相同性検索を行った。その結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されなかった（参照 15）。

③*barstar* 遺伝子

barstar 遺伝子がコードする BARSTAR タンパク質は、BARNASE タンパク質と 1:1 で特異的に非共有結合し、BARNASE タンパク質のリボヌクレアーゼ活性を阻害する（参照 13）。セイヨウナタネ MS11 では、T-DNA 領域に組み込まれた *barstar* 遺伝子により、改変 BARNASE タンパク質の薬組織以外の細胞での非意図的発現を抑制する。その結果、アグロバクテリウム法による形質転換効率が向上した。

BARSTAR タンパク質と既知の毒性タンパク質との構造相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^a及び毒性タンパク質データベース^bを用いて相同性検索を行った。その結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されなかった（参照 16）。

(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 pTCO113 は、T-DNA 領域外に、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* 遺伝子を有するが、セイヨウナタネ MS11 に挿入されていないことがサザンブロット分析により確認されている（参照 7）。

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

^a NCBI non-redundant protein database, version 2018.0106.

^b Bayer toxin database:公開されているタンパク質データベースの毒性に関するキーワード検索などから構築した自社毒性タンパク質データベース。

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 RuBisCo 小サブユニット遺伝子の PssuAt プロモーターである (参照 17)。

改変 *barnase* 遺伝子のプロモーターは、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の 蒟特異的遺伝子 *TA29* の Pta29 プロモーターであり (参照 18)、蒟のタペート細胞において遺伝子を発現させる。

barstar 遺伝子のプロモーターは、アグロバクテリウム (*Rhizobium radiobacter*) 由来のノパリン合成酵素遺伝子の Pnos プロモーターであり (参照 19)、プロモーター活性は低い。

(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 7 の 3' 非翻訳領域である 3' g7 ターミネーターである (参照 20)。

改変 *barnase* 遺伝子のターミネーターは、*R. radiobacter* 由来ノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域である 3'nos ターミネーターである。

- (3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること
該当する塩基配列はない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド pTCO113 は、プラスミド pGSC1700 を基に作製した。

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 pTCO113 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

第 6-1-(2) に記載したとおりである。

- (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 pTCO113 の T-DNA 領域の右側領域 (RB) から左側領域 (LB) までである。

- (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 pTCO113 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜により純化され、目的外の遺伝子の混入はないことがシーケンス解析により確認されている（参照 11）。

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 pTCO113 及びヘルパーTi プラスミド pGV4000 を用いて、アグロバクテリウム法による形質転換後、グルホシネートアンモニウムを含む培地で選抜を行い、グルホシネート耐性カルスから再生個体を得た。得られた再生個体は不稔であるため、宿主品種及び商業品種との交配によりセイヨウナタネ MS11 が得られた。

表 1 挿入 DNA 構成要素

構成要素	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>Rhizobium radiobacter</i> 由来の DNA 領域
(改変 <i>bar</i> 遺伝子発現カセット)	
3' g7 ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する。
改変 <i>bar</i>	<i>S. hygrosopicus</i> 由来の改変 PAT タンパク質をコードする遺伝子 除草剤グルホシネート耐性を付与する。
PssuAt プロモーター	プロモーター領域 シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来の RuBisCo 小サブユニット遺伝子のプロモーター配列 緑色組織においてのみ目的遺伝子の発現を誘導する。
(改変 <i>barnase</i> 遺伝子発現カセット)	
3' nos ターミネーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> 由来 pTiT37 のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する。
3' <i>barnase</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> 由来 <i>barnase</i> 遺伝子の 3' 非翻訳領域の配列
改変 <i>barnase</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> 由来のリボヌクレアーゼ（改変 BARNASE タンパク質）をコードする遺伝子 薬特異的プロモーター Pta29 の支配下で薬のタペート細胞において特異的に発現し、雄性不稔形質を付与する。
Pta29 プロモーター	プロモーター領域 タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来の TA29 遺伝子のプロモーター配列。薬のタペート細胞においてのみ目的遺伝子の発現を誘導する。

(barstar 遺伝子発現カセット)	
Pnos プロモーター	プロモーター領域 <i>R. radiobacter</i> 由来ノパリン合成酵素遺伝子のプロモーター配列。非常に低い転写活性を示す。
barstar	<i>B. amyloliquefaciens</i> 由来のリボヌクレアーゼ阻害物質 (BARSTAR タンパク質) をコードする遺伝子 BARNASE タンパク質と特異的に結合し、その活性を阻害する。アグロバクテリウム法での形質転換効率を上げるために組み込まれた。
3' g7 ターミナーター	ターミネーター領域 <i>R. radiobacter</i> 由来 Ti プラスミドの TL-DNA 遺伝子 7 の 3' 非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する。
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> 由来の DNA 領域

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

セイヨウナタネ MS11 のゲノムに挿入された T-DNA のコピー数を確認するため、サザンブロット分析を行った結果、1 コピー挿入されていることが確認された (参照 21)。

セイヨウナタネ MS11 に挿入された T-DNA の塩基配列及び近傍配列についてシーケンス解析を行った結果、挿入された T-DNA の塩基配列は導入用プラスミド pTCO113 の T-DNA 領域と一致することが確認された (参照 22)。

セイヨウナタネ MS11 のゲノム中にプラスミド pTCO113 の外骨格領域が挿入されていないことを確認するため、サザンブロット分析を行った結果、外骨格領域は挿入されていないことが確認された (参照 7、21)。また、barstar 遺伝子配列をプローブとしたサザンブロット分析の結果、T-DNA 領域内の barstar 遺伝子とのハイブリダイズは認められたが、T-DNA 領域外に存在する barstar 遺伝子とのハイブリダイズは認められなかった (参照 7)。

セイヨウナタネ MS11 に挿入された T-DNA の 5' 末端近傍配列 (1,129 bp) 及び 3' 末端近傍配列 (1,302 bp) の塩基配列と宿主の塩基配列をシーケンス解析により比較した結果、セイヨウナタネ MS11 のゲノムの 40 bp の欠失を除いて一致することが確認された (参照 22)。

T-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、5' 末端近傍配列 (1,129 bp)、40 bp の欠失領域及び 3' 末端近傍配列 (1,302 bp) について、データベース[◦]を用いて blastn 及び blastx 検索を行った。その結果、既知のヌクレオチド、EST 及びタンパク質の配列との

◦ NCBI の各データベース (Nucleotide collection, Expressed Sequence tag 及び Non-redundant protein sequence) 検索日 2017 年 4 月

相同性が確認されたが、いずれの配列も T-DNA の挿入により中断されていないことが示された (参照 23)。したがって、T-DNA の挿入によって宿主の内在性遺伝子が影響を受けた可能性は低いと考えられた。

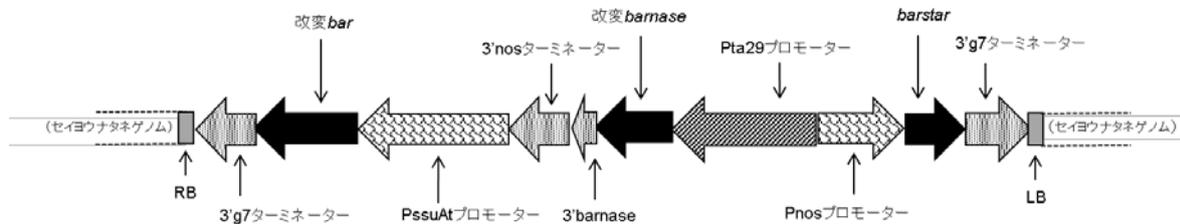


図1 セイヨウナタネ MS11 の挿入 DNA (模式図)

(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

セイヨウナタネ MS11 の挿入 DNA 領域と 5' 末端近傍配列及び 3' 末端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に、6つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終始コドンから終始コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 107 個見いだされた (参照 24)。

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に、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列について 35%以上の相同性を示す配列及び連続する 8 アミノ酸配列と一致する既知のアレルゲンは検出されなかった (参照 24)。また、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、NCBI タンパク質データセット^e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検出されなかった (参照 24)。

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

セイヨウナタネ MS11 の植物体 (地上部の全組織)、根、花序及び種子^fにおける改変 PAT タンパク質、改変 BARNASE タンパク質及び BARSTAR タンパク質の発現量を ELISA 法によって分析した (参照 25)。結果は表 2 のとおりである。

^d FARRP version 16

^e NCBI non-redundant protein database, version 2016.0206

^f MS11 と商業品種 N90-740 を掛け合わせた種子を用いた。

表2 セイヨウナタネ MS11 における改変 PAT タンパク質、改変 BARNASE タンパク質及び BARSTAR タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織*	改変 PAT タンパク質	改変 BARNASE タンパク質**	BARSTAR タンパク質***
植物体 (第3~5葉期)	35.40	ND	ND
植物体 (茎伸長期及び開花初期)	14.82~21.82	ND	ND~0.21
根	0.37~0.39	ND	0.39~0.50
花序	23.89	ND	0.68
種子	0.49	ND	ND

*植物体は、第3~5葉期、茎伸長期及び開花初期、根は茎伸長期及び開花初期、花序は開花初期、種子は成熟期の値を示す。

** LLOQ は、 $0.03\mu\text{g/g}$ (第3~5葉期の植物体) $0.05\mu\text{g/g}$ (茎伸長期及び開花初期の植物体及び種子)、 $0.04\mu\text{g/g}$ (花序)、 $0.25\mu\text{g/g}$ (根)

*** LLOQ は、 $0.03\mu\text{g/g}$ (茎伸長期及び開花初期の植物体、花序及び種子)、 $0.05\mu\text{g/g}$ (第3~5葉期の植物体及び根)

ND(not determined):全てのサンプルで LLOQ を下回ったため、算出できなかった。

セイヨウナタネ MS11 における改変 *barnase* 遺伝子の発現をノーザンブロット分析により解析した結果、タペート細胞を含む蕾において改変 *barnase* 遺伝子産物は検出されなかった。表現型の観察において花器官に蒴が正常に形成されておらず、改変 BARNASE タンパク質の発現によるタペート細胞の破壊が示唆された。また、稔性回復系統との交配により雄性不稔が回復することが確認された(参照 26)。

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

組換え由来のタンパク質は、セイヨウナタネの植物性油脂加工過程で除去及び分離されるため、植物油からは検出されない。したがって、一日タンパク質摂取量に影響を及ぼすとは考えられない。

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

改変 *bar* 遺伝子の供与体である *S. hygroscopicus* 並びに改変 *barnase* 遺伝子及び *barstar* 遺伝子の供与体である *B. amyloliquifaciens* がアレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

改変 PAT タンパク質、改変 BARNASE タンパク質及び BARSTAR タンパク質に関して、アレルギー誘発性を有するとの報告はない。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 改変 PAT タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

Escherichia coli で発現させた改変 PAT タンパク質の人工胃液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内にバンドが消失することが確認された。ウェスタンブロット分析では、試験開始後 2 分以内にバンドが消失することが確認された（参照 27）。

b. 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 PAT タンパク質の人工腸液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内にバンドが消失することが確認された。ウェスタンブロット分析では、反応開始直後に改変 PAT タンパク質の分解物と考えられる約 6kDa のバンドが確認されたが、2 分以内に消失することが確認された（参照 4）。

c. 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 PAT タンパク質の加熱に対する感受性を ELISA 法を用いて解析した。その結果、55℃以上の加熱処理では、改変 PAT タンパク質は検出されなかった（参照 28）。さらに、*E. coli* で発現させた改変 PAT タンパク質の加熱による酵素活性の変化を分析した。その結果、酵素活性は、55℃・30 分間の加熱処理で消失することが確認された（参照 29）。

② 改変 BARNASE タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 BARNASE タンパク質の人工胃液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析いずれにおいても、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 30）。

b. 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた改変 BARNASE タンパク質の人工腸液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 60 分まで継続して改変 BARNASE タンパク質のバンドが観察された。また、6 kDa より小さい改変 BARNASE タンパク質の分解物と考えられるバンドも継続して認

められた。ウェスタンブロット分析では、試験開始後 60 分まで改変 BARNASE タンパク質のバンドとその二量体と考えられるバンドが観察された (参照 31)。

c. 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた改変 BARNASE タンパク質の加熱に対する感受性を ELISA 法を用いて解析した。その結果、55℃以上の加熱処理で改変 BARNASE タンパク質の相対濃度は減少し、95℃・30 分間の加熱処理で 19.1%まで減少した (参照 32)。さらに、*E. coli* で発現させた改変 BARNASE タンパク質の加熱による酵素活性の変化を分析した。その結果、酵素活性は、55℃以上の加熱処理で減少し、95℃・30 分間の加熱処理では失活することが確認された (参照 33)。

③ BARSTAR タンパク質

a. 人工胃液に対する感受性

E. coli で発現させた BARSTAR タンパク質の人工胃液中における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。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始後 30 秒以内に BARSTAR タンパク質のバンドが消失することが確認された。ウェスタンブロット分析では、試験開始直後に BARSTAR タンパク質の多量体のバンドが確認されたが、30 秒以内に消失することが確認された (参照 34)。

b. 人工腸液に対する感受性

E. coli で発現させた BARSTAR タンパク質の人工腸液中における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。SDS-PAGE 分析では、試験開始後 60 分まで継続して BARSTAR タンパク質のバンドが観察された。ウェスタンブロット分析では、反応開始直後から BARSTAR タンパク質のバンドが認められたが、30 分以内に消失することが確認された (参照 5)。

c. 加熱処理に対する感受性

E. coli で発現させた BARSTAR タンパク質の加熱に対する感受性を ELISA 法を用いて解析した。その結果、75℃及び 95℃で 30 分間の加熱処理で BARSTAR タンパク質の相対濃度はそれぞれ 76.2%及び 54.0% まで減少した (参照 35)。さらに、*E. coli* で発現させた BARSTAR タンパク質の加熱による影響を検討するため、加熱処理した BARSTAR タンパク質に改変 BARNASE タンパク質を滴定し、残った改変 BARNASE タンパク質の酵素活性を測定して、BARSTAR タンパク質の IC₅₀ を算出した。その結果、75℃・30 分間の加熱処理で IC₅₀ が 1.66 に上昇し、95℃・30 分間の加熱処理では BARSTAR タンパク質の阻害活性が失われることが確認された (参照 36)。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。）との構造相同性に関する事項
改変 PAT タンパク質、改変 BARNASE タンパク質及び BARSTAR タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^gを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見出されなかった（参照 12、15、16）。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^cを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列と一致する配列は見出されなかった（参照 12、15、16）。

上記（1）～（4）及び前項 3 から総合的に判断し、改変 PAT タンパク質、改変 BARNASE タンパク質及び BARSTAR 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。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

セイヨウナタネ MS11 に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、5 世代のセイヨウナタネ MS11 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 37）。

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

(1) 改変 PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-グルホシネートをアセチル化することによって、植物に対して毒性のない物質へと代謝させる酵素である。その反応は L-グルホシネートに特異的で、セイヨウナタネ MS11 中で基質となる物質は考えられないことから、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。

(2) 改変 BARNASE

BARNASE タンパク質は、リボヌクレアーゼ活性を有し、薬特異的プロモーター Pta29 の制御によりタペート細胞でのみ発現するため（参照 14）、他の組織で発現して RNA を分解することは考え難い。したがって、改変 BARNASE タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

(3) BARSTAR タンパク質

BARSTAR タンパク質は、細菌由来のリボヌクレアーゼである BARNASE タンパク質と 1:1 で特異的に非共有結合するため、その複合体の安定性は高く、植物中のリボヌクレアーゼを阻害するとの報告はない（参照 13）。セイヨウナタネ MS11 においては、*barstar* 遺伝子を制御する Pnos プロモーターの誘導

^g Comprehensive Protein Allergen Resource (version COMPARE18)

は弱いため、BARSTAR タンパク質の発現は微量であり、稔性を回復する程度ではないことを表現型で確認している（参照 26）。したがって、BARSTAR タンパク質が宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

米国及びカナダのほ場で栽培されたセイヨウナタネ MS11 及び宿主である非組換えセイヨウナタネについて、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類、ミネラル類及び有害生理活性物質の分析を行った。セイヨウナタネ MS11 については、除草剤グルホシネートの散布を行った処理区及び散布を行わなかった無処理区を設定した。統計学的有意差については、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 無処理区及び非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区についてそれぞれ検討が行われた（参照 1）。

(1) 主要構成成分

水分、灰分、炭水化物、粗脂質、粗タンパク質、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維の分析を行った。その結果、炭水化物以外の項目において、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

(2) アミノ酸組成

アミノ酸 18 種類の分析を行った。その結果、アラニン、シスチン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン及びセリンにおいて、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

(3) 脂肪酸組成

脂肪酸 13 種類の分析を行った。その結果、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、リグノセリン酸及びネルボン酸において、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

(4) ビタミン類

ビタミン類 4 種類の分析を行った。その結果、 γ -トコフェノール及びビタミン K において、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

^h 同時に栽培した 6 系統の商業品種の測定値に基づき算出された数値で「95%の信頼率で母集団の 99%が含まれる範囲」

(5) ミネラル類

ミネラル 9 種類の分析を行った。その結果、銅、マグネシウム、リン、カリウム及び亜鉛において、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

(6) 有害生理活性物質

グルコシノレート類、フィチン酸、シナピン、不溶性タンニン、可溶性タンニン及び総縮合型タンニンの分析を行った。その結果、グルコナピン、プロゴイトリン及び総グルコシノレートにおいて非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 処理区との間に、グルコナピン及び不溶性タンニンにおいて非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ MS11 無処理区との間に、それぞれ統計学的有意差が認められたが、有意差が認められた項目の平均値は、商業品種の許容区間内^hであった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国食品医薬品庁 (FDA) に対して食品及び飼料としての安全性審査の申請が行われ、2017 年 10 月に承認された。また、米国農務省 (USDA) に対して無規制裁培の申請が行われ、2017 年 7 月に承認された。

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の申請及びカナダ食品検査庁 (CFIA) に対して飼料・環境としての安全性審査の申請が行われ、ともに 2018 年 1 月に承認された。

オーストラリア及びニュージーランドにおいては、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) に対して食品としての安全性審査の申請が行われ、2017 年 12 月に承認された。

9. 栽培方法に関する事項

セイヨウナタネ MS11 の栽培方法は、雑草防除に除草剤グルホシネートが散布可能である点を除き、従来のセイヨウナタネと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

セイヨウナタネ MS11 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じである。

第 7. 第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 6 までの事項により安全性の知見が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「除草剤グ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. Dharmasri C. MS11 *B.napus*-Composition analysis of field samples grown in Canada and the USA during 2014 [M-549080-02-1]. 2016.
2. Codex: Codex Alimentarius Commission (CAC). (2015) Section 2. Codex standards for fats and oils from vegetable sources Fats, oils and related. The codex alimentarius volume 8 2015
3. OECD. 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. . OECD Environment, Health and Safety Publications. 2011.
4. Rouquie D. PAT/*bar* protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid [M-208793-04-1]. 2016.
5. Rouquie D. BARSTAR protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid [M-429800-02-1]. 2016.
6. Office of the Gene Technology Regulator (OGTR) A G. The Biology of *Brassica napus* L. (canola). Version 2.1. 2011.
7. Peeters K: Additional vector backbone analysis for MS11 *Brassica napus* 2018
8. Hartley R W: Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. J Mol Biol 1988; 202: 913-5
9. OECD. Consensus Document on General Information Concerning the Genes and Their Enzymes that Confer Tolerance to Phosphinothricin Herbicide. Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No. 11. OECD Environmental Health and Safety Publications. 1999.
10. Capt A. Barnase and Barstar proteins -History of safe use [M-355152-01-1]. 2009.
11. Peeters K. Sequence determination of plasmid pTCO113 [M-531765-01-1]. 2015.
12. Deltort S. PAT/*bar* protein amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins. 2018.
13. Hartley R W: Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. Trends Biochem Sci 1989; 14: 450-4
14. Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J, Leemans J, and Goldberg R B: Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. Nature 1990; 347: 737-41
15. Deltort S. Barnase protein amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins. 2018.
16. Deltort S. Barstar protein amino acid sequence homology search with known allergens and known toxins [M-552416-02-1. 2018.
17. Krebbers E, Seurinck J, Herdies L, Cashmore A R, and Timko M P: Four

- genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1988; 11: 745-59
18. Seurinck J, Truettner J, and Goldberg R B: The nucleotide sequence of an anther-specific gene. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 3403
 19. Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, and Goodman H M: Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *J Mol Appl Genet* 1982; 1: 561-73
 20. Dhaese P, De Greve H, Gielen J, Seurinck L, Van Montagu M, and Schell J: Identification of sequences involved in the polyadenylation of higher plant nuclear transcripts using *Agrobacterium* T-DNA genes as models. *Embo j* 1983; 2: 419-26
 21. Peeters K. Detailed insert characterization and confirmation of the absence of vector backbone sequence in *Brassica napus* MS11 [M-547543-02-1]. 2017.
 22. Habex V. Full DNA sequence of event insert and integration site of *Brassica napus* transformation event MS11 [M-304805-01-1]. 2008.
 23. Kindt A. Bioinformatics analysis of MS11 *Brassica napus* insertion locus [M-307568-03-1]. 2016.
 24. Rasclé J B. 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 [M-552421-01-1]. 2016.
 25. Dharmasri C. MS11 *Brassica napus* - Summary of protein expression analyses of field samples grown in Canada and the USA during 2014 [M-549123-01-1]. 2016.
 26. Herdies L. Analysis of floral morphology and pollen viability of transgenic MS11, RF3 and MS11xRF3 *Brassica napus* lines in comparison with their non-transgenic counterpart [M-304071-01-1]. 2008.
 27. Rasclé J B. PAT/*bar* protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid [M-217195-04-1]. 2009.
 28. Cheever M. The effect of temperature on PAT/*bar* as assessed by ELISA [M-557508-01-1]. 2016.
 29. Serrano H. The effect of temperature on PAT/*bar* as assessed by the PAT quantitative activity assay [M-554703-01-1]. 2016.
 30. Lautraite S. BARNASE protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid at pH1.2 [M-430109-01-1]. 2012.
 31. Rouquie D. BARNASE protein in vitro digestibility study in human simulated intestinal fluid [M-430112-02-1]. 2016.
 32. Serrano H. The effect of temperature on microbially produced Barnase assessed by ELISA [M-475710-01-1]. 2013.
 33. Serrano H. The effect of temperature on microbially-produced Barnase assessed by the Barnase quantitative activity assay [M-490632-01-1]. 2014.

34. Lautraite S. BARSTAR protein in vitro digestibility study in human simulated gastric fluid at pH1.2 [M-429793-01-1]. 2012.
35. New S. The effect of temperature on microbially produced Barstar assessed by ELISA [M-479248-01-1]. 2014.
36. Serrano H. The effect of temperature on microbially-produced Barstar assessed by the Barstar quantitative activity assay [M-490635-01-1]. 2014.
37. Peeters K. Structural stability analysis of *Brassica napus* MS11 [M-547544-01-1]. 2016.