

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノ
ン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK

令和 2 年 9 月 30 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.....	4
5	(1) 遺伝的素材に関する事項.....	4
	(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
10	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.....	5
15	(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.....	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.....	6
20	(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.....	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
25	(3) 薬剤耐性に関する事項.....	7
	(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.....	8
30	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.....	12
	(3) 構造に関する事項.....	12
	(4) 性質に関する事項.....	12
35	(5) 純度に関する事項.....	12
	(6) 安定性に関する事項.....	12
	(7) コピー数に関する事項.....	12
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	13
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	13
40	(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.....	13
	6 組換え体に関する事項.....	13
	(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.....	13
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	13
45	(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
50	(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
55	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

「長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性
セイヨウナタネ LBFLFK」に係る安全性確認

I はじめに

60 長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK（以下「LBFLFK」という。）について、令和2年6月4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。

65

II 確認対象飼料の概要

飼料名：長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK

性 質：DHAを産生する。イミダゾリノン系除草剤に耐性を持つ。

70 申請者：BASF ジャパン株式会社

開発者：BASF Agricultural Solutions Seed US LLC

LBFLFKは、セイヨウナタネのキャノーラ品種 Kumily に、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を合成させる Δ -12 デサチュラーゼ (*Ps*) (*D12D(Ps)*) 遺伝子、 Δ -6 デサチュラーゼ (*Ot*) (*D6D(Ot)*) 遺伝子、 Δ -6 エロンガーゼ (*Tp*) (*D6E(Tp)*) 遺伝子、 Δ -6 エロンガーゼ (*Pp*) (*D6E(Pp)*) 遺伝子、 Δ -5 デサチュラーゼ (*Tc*) (*D5D(Tc)*) 遺伝子、 ω -3 デサチュラーゼ (*Pir*) (*O3D(Pir)*) 遺伝子、 ω -3 デサチュラーゼ (*Pi*) (*O3D(Pi)*) 遺伝子、 Δ -5 エロンガーゼ (*Ob*) (*D5E(Ob)*) 遺伝子、 Δ -4 デサチュラーゼ (*Tc*) (*D4D(Tc)*) 遺伝子、 Δ -4 デサチュラーゼ (*Pi*) (*D4D(Pi)*) 遺伝子及びイミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する AHAS (*At*) 遺伝子を導入し作成された。そのため DHA を産生し、さらにイミダゾリノン系除草剤への耐性を持つ。

LBFLFKと非組換えキャノーラを比較したところ、遺伝子組換え技術を用いて付与されたこれらの性質を除き、差異は認められなかった。含有する油脂成分に関しては、従来から飼料に添加し使用されてきた魚油等を比較対象に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。従って、LBFLFKは、家畜等の健康に影響を及ぼす恐れはないと考えられた。

一般にキャノーラは油糧用に栽培され、その搾油かすは飼料原料として用いられる。このため、LBFLFKは、飼料原料（油かす及び油脂）の供給源としての利用が見込まれる。また、DHAを産生するため、魚油の代替として飼料に利用される。

90

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

95 (1) 遺伝的素材に関する事項

LBFLFK 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.) のキャノーラ品種 Kumily である。

100 LBFLFK には、7 種のデサチュラーゼ及び 3 種のエロンガーゼ遺伝子並びに *AHAS(At)* 遺伝子が導入されている。デサチュラーゼ及びエロンガーゼは、種子中に DHA) を産生させる。詳細は 5 (1) に記載の通り。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

105 1970 年代後半に、低エルシン酸かつ低グルコシノレートのキャノーラ品種がカナダで品種改良されてから、キャノーラ品種は油糧原料として広く用いられている。家畜の飼料としては、種子から油を搾油した後の油かすが利用される。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

110 LBFLFK 及び非組換えキャノーラ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。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

LBFLFK では、収穫時期、家畜の摂取量・摂取部位、調整・加工方法において既存のキャノーラと相違ない。

115 *AHAS(At)* 遺伝子の導入により、イミダゾリノン系除草剤耐性を獲得しているため、イミダゾリノン系除草剤を散布しても影響を受けずに生育することができる。

120 (1) ~ (4) により、LBFLFK の飼料としての安全性評価においては、非組換えキャノーラとの比較に加えて、含有する油脂成分に関しては魚油及び水産飼料への使用経験がある *Mortierella alpina* (油脂生産糸状菌) 油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

125 LBFLFK は、導入された 10 個の遺伝子により、DHA を産生することが出来る。DHA の供給源である魚油は、原料である魚が有限の資源であること及び高価であることから、LBFLFK 油は魚油の代替として利用される。

従来のキャノーラと同様に、LBFLFK は搾油用として使用され、搾油後の油かす

を飼料に混ぜて使用される予定で、利用目的及び方法に相違はない。

130 さらに AHAS たん白質により、イミダゾリノン系除草剤への耐性を獲得しているため、複数種類の除草剤散布の必要性が減り、環境負荷を低減させる。

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

135 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.)のキャノーラ品種 Kumily である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

140 セイヨウナタネ (*B. napus*) は、アブラナ科アブラナ属の *Brassica rapa* L. (在来ナタネ、カブ、ハクサイ等) とキャベツなどが属する *Brassica oleracea* L.との交雑の結果できた複二倍体種である (農業技術大系)。キャノーラ品種は、エルシン酸やグルコシノレートといった有害物質の含有量を低く抑えたブランド品種である (OGTR, 2017)。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

145 セイヨウナタネの有害生理活性物質として、エルシン酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン、タンニンが知られている。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、グルコシノレートには甲状腺肥大作用がある。フィチン酸は、動物のミネラル吸収量を減少させる。シナピンは、辛味及び苦味を与えるアルカロイドである。タンニンは、たん白質や炭水化物の消化を抑制する。

150 エルシン酸及びグルコシノレートについては、キャノーラ品種においては精油中のエルシン酸含量が2%未満、グルコシノレート含有量が油かす1g当たり30 μmol 未満である (OECD, 2011) ことが規定されている。

155 その他の有害生理活性物質についてもセイヨウナタネと含有量は変わらなかった。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

160 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及び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

セイヨウナタネに感染する病害には根朽病、菌核病、根こぶ病等がある (OECD, 2012a)が、これらが家畜に対する病原性因子となることは

知られていない。

165

(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

セイヨウナタネは栽培作物であり、日本におけるセイヨウナタネ集団の雑草性の強さ及び競合性についての知見はない(津田ら, 2016)。オーストラリアなどのセイヨウナタネ生産国では農耕地及びその周辺の主要な雑草とされるも、未攪乱の土地に侵入する植物ではないと考えられている(OGTR, 2011)。

170

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

セイヨウナタネは自家不和合性を持たず自家受精するが、部分的には他殖も行われる(OECD, 2012a)。セイヨウナタネの同一ほ場内における他殖率は平均で20~40%で、主として開花時の環境条件によって著しく異なる(OECD, 2012a)。

175

日本におけるセイヨウナタネと交雑可能な近縁外来種として、*B. rapa* (アブラナ)、*B. juncea* (カラシナ、タカナ等)、*B. nigra* (クロガラシ)、*Hirschfeldia incana* (ダイコンモドキ)、*Raphanus raphanistrum* (セイヨウノダイコン) 及び *Sinapis arvensis* (ノハラガラシ) が挙げられる(OECD, 2012a; OGTR, 2017; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2017)。

180

(8) 飼料に利用された歴史に関する事項

カナダにおいて低グルコシノレート、低エルシン酸のキャノーラ品種が開発され、1970年以降広く利用されるようになった。飼料としては、食用油として種子を搾油した後の油かすが利用されている(OGTR, 2008)。

185

(9) 飼料の安全な利用に関する事項

キャノーラ品種の開発により、ナタネ油粕における有害生理活性物質であるエルシン酸及びグルコシノレートの量は低量である。また、ナタネ油と油粕を製造する搾油工程において、ミロシナーゼが不活化されグルコシノレートの30%~70%が熱劣化する(OECD, 2011a)。その他にセイヨウナタネは、フィチン酸、シナピンを産生することが知られているが、家畜の生育に有害と考えられるレベルの産生性は知られておらず、飼料として安全に利用されている。

190

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

セイヨウナタネは、発芽に変温条件が必要である(OGTR, 2011)。

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)。日本では、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おり(清水ら, 2008、中井, 2003)、港周辺で運搬時のこぼ

195

200 れ落ちが原因と考えられる生育も確認しているが、他の植物との競合がおこる条件では、セイヨウナタネの生育が確認できないか、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）。また、地表では初めの1年を越えて生存することができない（OECD, 2012a）。

205 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

アブラナ科植物（*Brassicaceae*）には、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、
210 キャノーラ品種は、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

LBFLFK の作出のために用いたベクターは、ベクターpCH20（*Hamilton*, 1997）
215 由来の LTM593 である。

(2) 性質に関する事項

LTM593 の塩基数は 60,074 bp であり、LTM593 の全塩基配列及び構成要素の性質は明らかになっている。また、導入用プラスミドの外骨格領域に存在する
220 全ての構成要素は、その特性が各々明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

(3) 薬剤耐性に関する事項

LTM593 の外骨格領域には、選抜マーカーとして、カナマイシン耐性を付与する *Tn903* 由来 *KanR* 遺伝子が含まれているが、T-DNA 領域の外側にあり、
225 LBFLFK に外骨格領域が挿入されていないことは NGS 解析により確認している。

(4) 伝達性に関する事項

LTM593 の外骨格領域には、伝達を可能とする配列は含まれていない。
230

(5) 宿主依存性に関する事項

LTM593 に含まれる全ての構成要素の性質は明らかにされており、植物や動物での複製を可能とする配列を含まない。

235 (6) 発現ベクターの作成方法に関する事項

LBFLFKの作出に用いられたLTM593は、プラスミド LTM586 を基に作製した。

(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

240 LTM593 は、アグロバクテリウム法によりキャノーラ品種 Kumily に挿入された。

5 挿入遺伝子に関する事項

(1) 供与体に関する事項

245 ① 名称、由来及び分類に関する事項

以下の表に、導入された遺伝子の名称及びその由来を示す。

表 1

遺伝子	由来及び機能
<i>D6E(Pp)</i> 発現カセット	
<i>P-USP(Vf)</i>	<i>Vicia faba</i> 由来の種子特異的プロモーター領域。
<i>i-At1g01170</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D6E(Pp)</i>	<i>Physcomitrella patens</i> 由来の Δ -6 エロンガーゼ (GenBank Accession No: AF428243)を産生する遺伝子。本酵素は、 γ -リノレン酸のカルボキシル末端に 2 つの炭化水素基を追加しジホモ- γ -リノレン酸への変換を触媒する。
<i>t-CaMV35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター。
<i>D5D(Tc)1</i> 発現カセット	
<i>p-CNL(Lu)</i>	<i>Linum usitatissimum</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>i-At5g63190</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D5D(Tc)1</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -5 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: AF489588)を産生する遺伝子。本酵素は、ジホモ- γ -リノレン酸のカルボキシル末端から数えて 5 番目の位置に二重結合を導入してアラキドン酸への変換を触媒する。
<i>t-OCS</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のターミネーター。
<i>D6D(Ot)</i> 発現カセット	
<i>p-SBP(Vf)</i>	<i>V. faba</i> 由来のプロモーター。種子成熟段階の後期に遺伝子を活性化させる。
<i>i-At1g65090</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D6D(Ot)</i>	<i>Ostreococcus tauri</i> 由来の Δ -6 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: AY746357)を産生する遺伝子。本酵素は、リノール酸のカルボキシル末端から数えて 6 番目の位置に二重結合を導入して γ -リノレン酸への変換を触媒する。
<i>t-CATHD(St)</i>	<i>Solanum tuberosum</i> 由来のターミネーター。

<i>D6E(Tp)</i> 発現カセット	
<i>p-PXR(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>i-At1g62290</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D6E(Tp)</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i> 由来の Δ -6 エロンガーゼ (GenBank Accession No: XM_002288445)を産生する遺伝子本酵素は、 γ -リノレン酸のカルボキシル末端に 2 つの炭化水素基を追加しジホモ- γ -リノレン酸への変換を触媒する。
<i>t-PXR(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のターミネーター。
<i>D12D(Ps)</i> 発現カセット	
<i>p-napA(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>i-At5g63190</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D12D(Ps)</i>	<i>Phytophthora sojae</i> 由来の Δ -12 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: GY508423)を産生する遺伝子。本酵素は、オレイン酸のカルボキシル末端から数えて 12 番目の位置に二重結合を導入してリノール酸への変換を触媒する。
<i>t-rbcS(Ps)</i>	<i>Pisum sativum</i> 由来のターミネーター。
<i>O3D(Pir)1</i> 発現カセット	
<i>p-SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>O3D(Pir)1</i>	<i>Pythium irregulare</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: FB753541)を産生する遺伝子本酵素は、アラキドン酸の ω (メチル) 末端から数えて 3 番目の位置に二重結合を導入し、エイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
<i>t-SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来のターミネーター。
<i>O3D(Pi)</i> 発現カセット	
<i>p-USP(Vf)</i>	<i>V. faba</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>i-At1g01170</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>O3D(Pi)</i>	<i>Phytophthora infestans</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: XM_002902553)を産生する遺伝子。本酵素は、アラキドン酸の ω 末端から数えて 3 番目の位置に二重結合を導入してエイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
<i>t-CaMV35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーター。
<i>D5D(Te)2</i> 発現カセット	
<i>p-SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>D5D(Te)2</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -5 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: AF489588)を産生する遺伝子。本酵素は、ジホモ- γ -リノレン酸のカルボキシル末端から数えて 5 番目の位置に二重結合を導入して、アラキドン酸への変換を触媒する。
<i>t-SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来のターミネーター。
<i>D4D(Te)</i> 発現カセット	
<i>p-ARC5(Pv)</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> 由来の種子特異的プロモーター。
<i>D4D(Te)</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -4 デサチュラーゼ (GenBank

	Accession No: GN042654)を産生する遺伝子。本酵素は、クルパノドン酸のカルボキシル末端から数えて4番目の位置に二重結合を導入してドコサヘキサエン酸への変換を触媒する。
t- <i>ARC(Pv)</i>	<i>P. vulgaris</i> 由来のターミネーター。
<i>O3D(Pir)2</i> 発現カセット	
p- <i>PXR(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子特異的プロモーター。
i- <i>AGO4(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>O3D(Pir)2</i>	<i>P. irregulare</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼ(GenBank Accession No: FB753541)を産生する遺伝子。本酵素は、アラキドン酸の ω 末端から数えて3番目の位置に二重結合を導入してエイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
t- <i>PXR(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の終結因子。
<i>D4D(P)</i> 発現カセット	
p- <i>CNL(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子特異的プロモーター。
i- <i>AtIg65090</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D4D(P)</i>	<i>Pavlova lutheri</i> 由来の Δ -4 デサチュラーゼ(GenBank Accession No: AY332747)を産生する遺伝子。本酵素は、クルパノドン酸のカルボキシル末端から数えて4番目の位置に二重結合を導入してドコサヘキサエン酸への変換を触媒する。
t- <i>OCS</i>	<i>A. tumefaciens</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のターミネーター。
<i>D5E(Ot)</i> 発現カセット	
p- <i>FAEI(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来のプロモーター。
i- <i>AtIg62290</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のイントロン。
<i>D5E(Ot)</i>	<i>O. tauri</i> 由来の Δ -5 エロンガーゼ(GenBank Accession No: CS020159)を産生する遺伝子。本酵素は、エイコサペンタエン酸のカルボキシル末端に2つの炭化水素基を追加し、クルパノドン酸への変換を触媒する。
t- <i>FAEI(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のターミネーター。
<i>AHAS(At)</i> 発現カセット	
p- <i>Ubi4(Pc)</i>	<i>Petroselinum crispum</i> 由来のプロモーター。
i- <i>Ubi4(Pc)</i>	<i>P. crispum</i> 由来イントロン。
<i>AHAS(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来。AHAS(<i>At</i>) たん白質を産生し、植物体に除草剤耐性を付与する。AHAS(<i>At</i>) たん白質におけるアミノ酸の変異により、イミダゾリノン系除草剤の結合が阻害され、通常の生合成が影響を受けることなく除草剤耐性が付与される。
t- <i>AHAS(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の AHAS(<i>At</i>) 遺伝子のターミネーター。

② 安全性に関する事項

- *D12D(Ps)* 遺伝子の供与体である *P. sojae* は、バイオセーフティーレベル

1 (ATCC, 2017a)に分類される卵菌類である。バイオセーフティーレベル 1 に分類される生物は、ヒト又は動物に病気を引き起こす知見のない生物である。

・ *D6D(Ot)* 遺伝子及び *D5E(Ot)* 遺伝子の供与体である *O. tauri* は、海洋で一般的に存在する海洋微生物緑藻であり、毒素を生産しない(Réveillon *et al.*, 2015)ことが報告されている。

255

・ *D6E(Tp)* 遺伝子の供与体である *T. pseudonana* は、海洋珪藻である。神経毒 BMAA を産生することが報告されている (Lage *et al.*, 2015、Jiang *et al.*, 2014)が、*D6E(Tp)* 遺伝子は BMAA の産生に関与しない。また、BMAA の生産は生育環境にも左右され、毒素を生産しない生育条件によって生育された *T. pseudonana* は、水産餌料の一つとして頻繁に使用されている (Brown, 2002)。

260

・ *D6E(Pp)* 遺伝子の供与体である *Physcomitrella patens* はコケの一種であり、この種がヒトに影響を与える病気や毒素の生産への関連を示す報告はない。

・ *D4D(Tc)* 遺伝子及び *D5D(Tc)* 遺伝子の供与体である *Thraustochytrium sp.* は、海洋で一般的に存在する海洋原生生物であり、栄養補助食品に使用される DHA の供給源として使用されている実績を持つ。*Thraustochytrium sp.* が毒素及び栄養阻害物質を含有すること、またそれらを生産すること、ヒトや動物に病気を引き起こすことは報告されていない。

265

・ *O3D(Pi)* 遺伝子の供与体である *Phytophthora infestans* は、バイオセーフティーレベル 1 (ATCC, 2017a)に分類される卵菌類である。

270

・ *O3D(Pir)* 遺伝子の供与体である *Pythium irregulare* は、バイオセーフティーレベル 1 (ATCC, 2017a)に分類される卵菌類である。

・ *D4D(P)* 遺伝子の供与体である *Pavlova lutheri* は、バイオセーフティーレベル 1 (ATCC, 2017d)に分類される海洋微細藻類である。*Pavlova lutheri* は海洋生物 (主に貝類) に対する飼料によく使われている。

275

・ *AHAS(At)* 遺伝子の供与体である *A. thaliana* は、アブラナ科の一種である。

以上全ての供与体に関して、Web of Science データベースを使用して、安全性、供与体を摂食することによる供与体への曝露、摂食以外の方法による供与体への曝露のそれぞれに関連するキーワードを用いて文献検索を行った (2016 年 7 月 28、29 日及び同年 8 月 2、4 日) 結果、毒性への関与を示すものは確認されなかった。なお、*D6E(Tp)* 遺伝子の供与体である *T. pseudonana* は神経毒の BMAA を産生するという報告があるが、上述のように、BMAA を産生しない生育条件では産生せず、さらに今回 LBFLFK に導入した本供与体の *D6E(Tp)* 遺伝子は BMAA の産生に全く関連のない脂肪酸合成酵素である。

280

285

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

制限酵素を用いてベクターの T-DNA 領域に目的の塩基配列を挿入した後、アグロバクテリウム法により、宿主へベクターを導入した。

290

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

11 個の挿入遺伝子には、それぞれ、ナタネ、ソラマメ、アマ、インゲンマメ及びパセリ由来のプロモーターが使用されている。

295

② ターミネーターに関する事項

11 個の挿入遺伝子には、それぞれ、エンドウ、シロイヌナズナ、カリフラワーモザイクウイルス、アグロバクテリウム、ナタネ、インゲンマメ、由来のターミネーターが使用されている。

300

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ベクター LTM593 のすべての遺伝要素は純化されていて、その塩基配列、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を含まない。

305

(4) 性質に関する事項

挿入遺伝子によって生産されるデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、小胞体の膜に局在しており、デサチュラーゼは脂肪酸の不飽和化を起こし、エロンガーゼは、炭素鎖を伸長する。デサチュラーゼ及びエロンガーゼが、ヒト及び家畜に対して有害であるという報告はない。各遺伝子の機能は表 1 に示した通り。

310

(5) 純度に関する事項

ベクター LTM593 は外骨格領域に抗生物質耐性マーカーを有しており、これを利用して選抜及び純化されている。また、LTM593 の塩基配列に目的外の遺伝子が混入していないことをシーケンス解析により確認している。

315

(6) 安定性に関する事項

LBFLFK に挿入された遺伝子の安定性を、次世代シーケンサー及び相同性検索を用いて調べた。その結果、挿入された 2 つの T-DNA 領域は安定して後代に遺伝していることが確認された。

320

(7) コピー数に関する事項

LBFLFK のゲノム中の 2 カ所にそれぞれ 1 コピーずつ、合計 2 コピーが挿入さ

325 れている。1 コピー目において、挿入された 13 の遺伝子カセットの中で 2 カ所塩基の置換が確認され、たん白質が 1 つアミノ酸置換されていた。また、2 コピー目において、*D4D(P)* の翻訳領域内で 1 塩基置換されたことによりたん白質が 1 つアミノ酸置換されていた。なお、NGS 解析により、ベクター外骨格配列に相当するリードは存在しないことが確認された。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

330 導入した 11 種類のたん白質の発現量を、ロゼット期の全植物体、開花期の全植物体、成熟初期の葉及び根、未成熟種子、完熟種子において確認したところ、全てのたん白質が、未成熟種子及び成熟種子の両方、または片方のみでの発現が確認された。また、*AHAS(At)* たん白質は、成熟種子及び全植物体 (開花期)を除く全ての組織で発現が確認された。

335

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

ベクター *LTM593* の外骨格領域には、カナマイシン耐性マーカー *KanR* 遺伝子を有するが、この遺伝子は外骨格領域に存在しており、*LBFLFK* に挿入されていないことは NGS 解析により確認している。

340

(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

LBFLFK に挿入された DNA 配列及びその両近傍配列の接合部において、ORF を検索した。この結果 1449 個の ORF が確認されたが、これらの ORF において、既知の毒性たん白質の配列との相同性は確認されなかった。

345

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

350 *DHA* 合成に関わる遺伝子が合計 11 種類導入されているため、*DHA* 産生能を獲得している。さらに、変異型アセトヒドロキシ酸合成酵素 (*AHAS(At)*) 遺伝子が導入されているため、イミダゾリノン系除草剤への耐性を獲得している。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

355 *LBFLFK* の作出に用いた *DHA* 生合成に関わる酵素群に毒性があることは知られていない。

(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

10 個の挿入遺伝子により発現するデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、膜たん

360 白質であるため、物理化学的処理に対する感受性試験を行える量を得ることが困難であった。そのため、未成熟種子の胚から抽出・精製された膜たん白質画分を用いて、人工胃液による酸処理及び酵素(ペプシン)処理、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、加熱処理を行った。また、AHAS(*At*)たん白質についても同様に、膜たん白質画分を用いて試験を行った。

365 その結果、人工胃液及び腸液中で、全てのたん白質が速やかに分解されることが示された。また、ほとんどのたん白質が50°C以上の熱処理で変性し、安定性を持たないことが示された。なお、LBFLFKの未成熟種子の胚の膜たん白質画分を用いて行ったELISA法及び定量的ウェスタンブロット法においても、D6E(*Pp*)及びO3D(*Pt*)たん白質は検出することができなかったため、人工胃液、人工腸液及び加熱処理による処理は行えなかった。そのため、導入遺伝子の供与体及び導入遺伝子によって産生されるたん白質の文献調査、導入遺伝子によって産生されるたん白質と食品又は飼料に存在する同機能酵素との相同性検索並びにラット及びサケへの投与試験を行った。その結果、全ての導入遺伝子によって産生されるたん白質が家畜に悪影響を及ぼさないことが確認された。

375 (4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

LBFLFKには10種類の脂肪酸合成酵素が導入されているため、当該品目の種子から得られたキャノーラ油の脂肪酸組成は、宿主と異なっており、オレイン酸は減少、リノール酸は有意に増加、その他新規に導入された脂肪酸、EPA及びDHAについても有意に増加した。この脂肪酸組成について、従来から飼料へ添加し使用された経験のあるキャノーラ油、魚油と比較したところ、非組換えキャノーラにおいても産生される脂肪酸は、従来のキャノーラ品種の範囲内であり、新規に導入された脂肪酸においても、魚油の範囲内であったため、LBFLFKの油及び油かすを家畜へ給与しても悪影響はないと考えられた。

385 また、AHASたん白質は非組換えキャノーラにも内在するたん白質であり、導入されたAHAS(*At*)たん白質は、変異によりイミダゾリノン系除草剤に対する耐性を持つが元々のアミノ酸生合成も維持しているため、宿主代謝系への影響はないと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

390 LBFLFKには、脂肪酸合成に関わる10個の遺伝子が挿入されたことにより、EPA及びDHAを含む長鎖多価不飽和脂肪酸の割合の増加、前駆体及び中間体脂肪酸に当たるオレイン酸の減少及びリノール酸の増加(キャノーラと比べて1.5倍)、トランス脂肪酸の割合の増加が確認された。トランス脂肪酸については、飼料に供される油かす及び油脂に含まれる割合はわずかであり、家畜の健康に悪

395 影響を及ぼす量ではないため、安全性に問題はないと考えられた。その他の脂肪酸
酸については、非組換えキャノーラと同程度である。

精製油中の脂肪酸において、導入された脂肪酸合成酵素の副反応から生じた
EPA 又は DHA に変換されない 3 種類の脂肪酸が確認されたが、これらの安全
性を確認するため、ラット及びサケへ LBFLFK 油の投与試験を行ったところ、毒
400 性を示さないことを確認された。

また、アブラナ科植物の有害生理活性物質として、グルコシノレート類とエル
シン酸を分析した結果、グルコシノレート類については宿主との統計学的有意差
が確認されたものもあるが、組換え体の平均値及び測定範囲は、商業用品種の範
囲内であった。また、グルコイベリン、グルコラファニン及びタンニンは定量下
405 限 (LOQ) 以下だった。エルシン酸については、分析の結果、定量限界値未満で
あった。これは宿主がキャノーラ品種であるためと考えられる (キャノーラ品種
は精油中のエルシン酸含量が 2%未満であることが必須とされる)。

その他、粗繊維、アミノ酸、ビタミン類、無機塩類において、組換え体と宿主
との間に統計学的有意差が確認されたものがあつたが、それらの平均値や測定範
410 囲は、商業品種の範囲内にあり、これらの相違が安全性に影響を与えているとは
考えられない。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

これまでに実施した圃場試験において、LBFLFK と非組換えキャノーラとの間
415 に、外界における生存及び増殖能力の差異は認められなかった。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

LBFLFK と非組換えキャノーラにおいて、生存・増殖能力の制限要因に関して
も変わりはない。

420

(8) 不活化法に関する事項

LBFLFK も従来のキャノーラと同様に、物理的防除 (耕起) や化学的防除 (感
受性を示す除草剤の使用) など、キャノーラを枯死させる従来の方法で不活化され
る。

425

(9) 外国における認可等に関する事項

表 2 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
米国	FDA 申請中	FDA 申請中	USDA 承認 (2019 年 8 月)

カナダ	CFIA 承認 (2019年12月)	HC 認 (2019年12月)	CFIA 承認 (2019年12月)
韓国	RDA 申請中	MFDS 申請中	RDA 申請中

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

430 LBFLFK には *AHAS* (*At*) 遺伝子が導入されているため、イミダゾリノン系除草剤を使用できるという点を除けば、従来のキャノーラ品種の栽培方法と相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

435 従来のキャノーラと相違はない。また、LBFLFK を特異的に識別する方法 (PCR 法) を確立している。

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

440 該当しない。

IV 審議結果

長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK 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した。

445

V 参考文献及び参考資料

参考文献 (申請者提出 社外秘)

- 450 1. Adkisson, H. D., Risener, Jr., F. S., Zarrinkar, P. P., Walla, M. D., Christie, W. W., Wuthier, R. E. 1991. Unique fatty acid composition of normal cartilage: discovery of high levels of n-9 eicosatrienoic acid and low levels of n-6 polyunsaturated fatty acids. FASEB Journal: 344-353.
- 455 2. Alasalvar, C., Taylor, K., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M. 2002. Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. Food Chemistry, 79, 145-150.
- 460 3. Alvarenga, T. I. R. C., Chen, Y., Lewandowski, P., Ponnampalam, E. N., Sediq, S., Clayton, E. H., van de Ven, R. J., Perez, J. R. O., Hopkins, D.L. 2016. The expression of genes encoding enzymes regulating fat metabolism is affected by maternal

nutrition when lambs are fed algae high in omega-3. *Livestock Science*, 187, 53-60.

- 465 4. Andre, C., Buesen, R., Riffle, B., Wandelt, C., Sottosanto, J. B., Marxfeld, H., Strauss, V., van Ravenzwaay, B., Lipscomb, E. A. 2019. Safety assessment of EPA+DHA canola oil by fatty acid profile comparison to various edible oils and fat-containing foods and a 28-day repeated dose toxicity study in rats. *Food Chem Toxicol.* 124:168-181.
- 470 5. Aranda-Burgos, J. A., da Costa, F., Nóvoa, S., Ojea, J. and Martínez-Patiño, D. 2014. Effects of microalgal diet on growth, survival, biochemical and fatty acid composition of *Ruditapes decussatus* larvae. *Aquaculture*, 420, 38-48.
- 475 6. Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M. 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306, 79-86.
- 480 7. Arriagada, P. I., Capdeville, A. M., Iassonova, D. 2017. Fish feed prepared from oilseed plants producing omega-3 fatty acids. WO2017210426A1.
- 485 8. ATCC, 2017a, online. *Phytophthora sojae*. https://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cPhytophthora+sojae%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Phytophthora+sojae&redir=1 (閲覧日 2017 年 3 月 16 日)
- 490 9. ATCC, 2017b, online. *Phytophthora infestans*. (https://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cPhytophthora+infestans%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Phytophthora+infestans&redir=1) (閲覧日 2017 年 3 月 16 日)
- 495 10. ATCC, 2017c, online. *Pythium irregulare*. (https://www.atcc.org/Search_Results.aspx?dsNav=Ntk:PrimarySearch%7cPythium+irregulare%7c3%7c,Ny:True,Ro:0,N:1000552&searchTerms=Pythium+irregulare&redir=1) (閲覧日 2017 年 3 月 16 日)
- 500 11. ATCC, 2017d, online. *Pavlova lutheri*. (<https://www.atcc.org/Products/All/50092.aspx>) (閲覧日 2017 年 3 月 16 日)
12. Atienza, G., Arafles, K., Carmona, M., Garcia, J., Macabago, A., Peñacerrada, B., Cordero, P., Bennett, R., Dedeles G. 2012. Carotenoid analysis of locally isolated Thraustochytrids and their potential as an alternative fish feed for *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Mycosphere* 3, 420-428.

- 505 13. Barker, G. C., Larson, T. R., Graham, I. A., Lynn, J. R., King, G. J. 2007. Novel insights into seeds fatty acid synthesis and modification pathways from genetic diversity and quantitative trait loci analysis of the *Brassica C* genome. *Plant Physiology* 144: 1827-1842.
- 510 14. Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson, D. V., Kemp, J. D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2, 335-350.
- 515 15. Bauer, J., Senger, T. 2010. Promoters from *Brassica napus* for seed specific gene expression. Patent WO2010000708, World Intellectual Property Organization.
- 520 16. Bäumlein, H., Boerjan, W., Nagy, I., Bassfüner, R., Van Montagu, M., Inzé, D., Wobus, U. 1991. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in transgenic tobacco and Arabidopsis plants. *Molecular and General Genetics* 225, 459-467.
- 525 17. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E., Reiss, B., Schaller, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19, 327-336.
- 530 18. Bergé, J.-P., Barnathan, G. 2005. Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. In: *Marine biotechnology I*. Springer, 49-125.
- 535 19. Beudeker, R.F., Coutteau, P. 1999. Microbial arachidonic acid (ARA) for use in marine feed. US6638561B1.
- 540 20. Blasbalg, T. L., Hibbeln, J. R., Ramsden, C. E., Majchrzak, S. F., Rawlings, R. R. 2011. Changes in consumption of omega-3 and omega-6 fatty acids in the United States during the 20th century. *American Journal of Clinical Nutrition* 93, 950-962.
21. Braybrook, S. A., Stone, S. L., Park, S., Bui, A. Q., Le, B. H., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J. 2006. Genes directly regulated by LEAFY COTYLEDON2 provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3468-3473.
22. Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición*

Acuícola 3, 281-292.

545

23. Brugnano, C., Guglielmo, L., Zagami, G. 2008. Food type effects on reproduction of hyperbenthic calanoid species *Pseudocyclops xiphophorus* Wells, 1967, under laboratory conditions. *Chemistry and Ecology*, 24, 111-117.

550

24. Bushey, D. F., Bannon, G. A., Delaney, B. F., Graser, G., Hefford, M., Jiang, X., Lee, T. C., Madduri, K. M., Pariza, M., Privalle, L. S., Ranjan, R., Saab-Rincon, G., Schafer, B. W., Thelen, J. J., Zhang, J. X. Q., Harper, M. S. 2014. Characteristics and safety assessment of intractable proteins in genetically modified crops. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 69: 154-170.

555

25. Caers, M. Coutteau, P. Sorgeloos, P., Gajardo, G. 2003. Impact of algal diets and emulsions on the fatty acid composition and content of selected tissues of adult broodstock of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture*, 217, 437-452.

560

26. Chardin, H., Mayer, C., Senechal, H., Wal, J., Poncet, P., Desvaux, F., Peltre, G. 2003. Lipid transfer protein 1 is a possible allergen in *Arabidopsis thaliana*. *International Archives of Allergy and Immunology*, 131, 85-90.

565

27. Chardingy J.-M., Sébédio, J.-L., and Berdeaux, O., 1996. Trans polyunsaturated fatty acids: Occurrence and nutritional implications. In: *Advances in Applied Lipid Research*, Volume 2. JAI Press Inc., 1-33.

570

28. Chen, X., Pfeil, J. E., Gal, S. 2002. The three typical aspartic proteinase genes of *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed. *European Journal of Biochemistry* 269, 4675-4684.

575

29. Cheng, B., Wu, G., Vrinten, P., Falk, K., Bauer, J., Qiu, X. 2010. Towards the production of high levels of eicosapentaenoic acid in transgenic plants: The effects of different host species, genes and promoters. *Transgenic Research* 19, 221-229.

580

30. Cirpus, P., Bauer, J. 2006. Method for producing polyunsaturated c20 and c22 fatty acids with at least four double bonds in transgenic plants. Patent WO2006100241 A2, World Intellectual Property Organization.

31. Codex Alimentarius Commission (CAC), 2009. Codex standard for named vegetable oils (CODEX-STAN 210-1999). Food and Agricultural Organization of the United Nations and the World Health Organization.

- 585 32. Codex Alimentarius Commission. 2015. Section 2. Codex standards for fats and oils from vegetable sources Fats, oils and related. The codex alimentarius volume 8. (<http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm#bm4>) (閲覧日 2017年4月10日).
- 590 33. Coruzzi, G., Broglie, R., Edwards, C., Chua, N.-H. 1984. Tissue-specific and light-regulated expression of a pea nuclear gene encoding the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase. *EMBO Journal* 3, 1671.
- 595 34. Cove, D. J., Perroud, P.-F., Charron, A. J., McDaniel, S. F., Khandelwal, A., Quatrano R. S. 2009. The moss *Physcomitrella patens*: A novel model system for plant development and genomic studies. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009, pdb-emo115.
- 600 35. Decker, E. L., Parsons, J., Reski, R., 2014. Glyco-engineering for biopharmaceutical production in moss bioreactors. *Frontiers in Plant Science* 5, 346..
- 605 36. Delalat, B., Sheppard, V. C., Ghaemi, S. R., Rao, S., Prestidge, C. A., McPhee, G., Rogers, M.-L., Donoghue, J. F., Pillay, V., Johns, T. G. 2015. Targeted drug delivery using genetically engineered diatom biosilica. *Nature communications*, 6.
- 610 37. Delaunay, F., Marty, Y., Moal, J., Samain, J.-F. 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 173, 163-179
- 615 38. Delfourne, E., Bastide, J., Badon, R., Rachon, A., Genix, P. 1994. Specificity of plant acetohydroxyacid synthase: formation of products and inhibition by herbicides. *Plant Physiol. Biochem.* 32(4), 473-477
- 620 39. Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H., Heinz, E. 2005. *In vivo* characterization of the first acyl-CoA Δ^6 -desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochemical Journal* 389, 483-490.
- 625 40. Doroudi, M., Southgate, P. C., Lucas, J. 2003. Variation in clearance and ingestion rates by larvae of the black - lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) feeding on various microalgae. *Aquaculture Nutrition*, 9, 11-16.
41. D'souza, F., Lecossois, D., Heasman, M., Diemar, J., Jackson, C., Pendrey, R. 2000. Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* Fabricius larvae. *Aquaculture Research*, 31, 661-670.
42. Duggleby, R. G., Pang, S. S. 2000. Acetohydroxyacid synthase. *Journal of*

Biochemistry and Molecular Biology 33, 1-36.

630

43. Duwenig, E., Loyall, L. P. 2006. Expression cassettes for seed-preferential expression in plants. Patent WO2006089950 A2, World Intellectual Property Organization.

44. Ellerström, M., Stålberg, K., Ezcurra, I., Rask, L. 1996. Functional dissection of a napin gene promoter: Identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Molecular Biology* 32, 1019-1027.

635

45. EPA, 2017. Part 725—Reporting requirements and review processes for microorganisms. Section §725.421—Introduced genetic material. In: *U.S. Code of Federal Regulations (CFR). Title 40: Protection of Environment.* (U.S. Environmental Protection Agency). Washington (DC): U.S. Government Printing Office (GPO). available at <http://www.gpo.gov/fdsys/browse/collectionCfr.action?collectionCode=CFR>.

640

46. FAO, 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome.

645

47. FAO, 2019. Atlantic salmon-Nutritional requirements. <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/atlantic-salmon/nutritional-requirements/en/> (閲覧日 : 2019年7月19日)

650

48. FDA, 2001, online. GRN 80: GRAS notice for extending the level of use of ARASCO (single cell oil) as a source of arachidonic acid in infant formulas. Accessed on October 13, 2017.

655

49. Forrester-Anderson, I. T., McNitt, J., Way, R., Way, M. 2006. Fatty acid content of pasture-reared fryer rabbit meat. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 715-719.

660

50. Gagné, R., Tremblay, R., Olivier, F., Pernet, F., Miner, P., Samain, J.-F. 2012. Effect of shear velocity and flow regimes on scallop post-larval detachment feed on two different diets. *Aquaculture*, 370, 172-178

665

51. Ghioni, C., Porter, A. E. A., Taylor, G. W., Tocher, D. R. 2002. Metabolism of 18:4n-3 (stearidonic acid) and 20:4n-3 in salmonid cells in culture and inhibition of the production of prostaglandin F₂α (PGF₂α) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 81-96.

52. González - Araya, R., Quéau, I., Quéré, C., Moal, J., Robert, R. 2011. A

physiological and biochemical approach to selecting the ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part A). *Aquaculture Research*, 42, 710-726.

- 670 53. González-Araya, R., Lebrun, L., Quéré, C., Robert, R. 2012. The selection of an ideal diet for *Ostrea edulis* (L.) broodstock conditioning (part B). *Aquaculture*, 362, 55-66.
54. González-Araya, R., Quillien, V., Robert, R. 2013. The effects of eight single microalgal diets on sex-ratio and gonad development throughout European flat oyster (*Ostrea edulis* L.) conditioning. *Aquaculture*, 400, 1-5.
- 675 55. Goossens, A., Geremia, R., Bauw, G., Montagu, M., Angenon, G. 1994. Isolation and characterisation of arcelin - 5 proteins and cDNAs. *European Journal of Biochemistry* 225, 787-795.
- 680 56. Goossens, A., Dillen, W., De Clercq, J., Van Montagu, M., Angenon, G. 1999. The *arcelin-5* gene of *Phaseolus vulgaris* directs high seed-specific expression in transgenic *Phaseolus acutifolius* and Arabidopsis plants. *Plant Physiology* 120, 1095-1104.
- 685 57. Gouda, R., Kenchington, E., Hatcher, B., Vercaemer, B. 2006. Effects of locally-isolated micro-phytoplankton diets on growth and survival of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) larvae. *Aquaculture*, 259, 169-180.
- 690 58. Gremare, A., Amouroux, J., Chaabeni, Y., Charles, F. 1998. Experimental study of the effect of kaolinite on the ingestion and the absorption of monospecific suspensions of *Pavlova lutheri* by the filter-feeding bivalve *Venus verrucosa*. *Vie et Milieu*, 48, 295-307.
- 695 59. Grimes, H. D., Overvoorde, P. J., Ripp, K., Franceschi, V. R., Hitz, W. D. 1992. A 62-kD sucrose binding protein is expressed and localized in tissues actively engaged in sucrose transport. *Plant Cell* 4, 1561-1574.
- 700 60. Hagerman, A. E. 2002. Tannins as metal iron chelators. *The tannin handbook*. (<http://www.users.miamioh.edu/hagermae/>) (閲覧日 2017 年 4 月 21 日)
61. Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P. 1994. The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Molecular Biology* 25, 989-994.
- 705 62. Hamilton, C. M. 1997. A binary-BAC system for plant transformation with high-molecular-weight DNA. *Gene* 200, 107-116.

- 710 63. Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zähringer, U., Borchardt, D. S., Wolter, F. P., Heinz, E., Frentzen, M. 2001. Functional characterization of β -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Molecular Biology* 46, 229-239.
- 715 64. Hannapel, D. J. 1993. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the 22-kilodalton cathepsin D inhibitor protein of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Physiology* 101, 703.
- 720 65. Harris, R. P. 1977. Some aspects of the biology of the harpacticoid copepod, *Scottolana canadensis* (Willey), maintained in laboratory culture. *Chesapeake Science*, 18, 245-252.
66. Haslam, T. M., Kunst, L. 2013. Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science* 210, 93-107.
- 725 67. Haslekås, C., Stacy, R. A., Nygaard, V., Culiáñez-Macià, F. A., Aalen, R. B. 1998. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, *AtPer1*, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. *Plant Molecular Biology* 36, 833-845.
- 730 68. Hawkins, L., Hutchinson, S., Laing, I. 2005. The effects of temperature and food ration on metabolite concentrations in newly settled king scallop (*Pecten maximus*) spat. *Aquaculture*, 250, 841-848.
- 735 69. Heim, U., Wang, Q., Kurz, T., Borisjuk, L., Golombek, S., Neubohn, B., Adler, K., Gahrtz, M., Sauer, N., Weber, H. 2001. Expression patterns and subcellular localization of a 52 kDa sucrose-binding protein homologue of *Vicia faba* (VfSBPL) suggest different functions during development. *Plant Molecular Biology* 47, 461-474.
- 740 70. Helsing, M., Eichenlaub, R. 1986. Twelve 43-base-pair repeats map in a cis-acting region essential for partition of plasmid mini-F. *Journal of Bacteriology* 165, 1043-1045.
- 745 71. HHS, Public Health Service, Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes of Health. 2009. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 5th edition, U.S. Dept. of Health and Human Services, Washington (DC), 437 pp.
72. ILSI. 2019. Crop composition database search results, ver.7.0. (検索日 : 2019年6月24日).

73. Jelínek, R., Kyzlink, V., Blatný, C. 1976. An evaluation of the embryotoxic effects of
750 blighted potatoes on chicken embryos. *Teratology*, 14, 335-342.
74. Jiang, L., Eriksson, J., Lage, S., Jonasson, S., Shams, S., Mehine, M., Ilag, L. L.,
Rasmussen, U. 2014. Diatoms: A novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic
755 environments. *PloS One* 9, e84578.
75. Jonsson, P., Berntsson, K., André, C., Wängberg, S.-Å. 1999. Larval growth and
settlement of the European oyster (*Ostrea edulis*) as a function of food quality
measured as fatty acid composition. *Marine Biology*, 134, 559-570.
76. Kashenko, S. 2007. Adaptive responses of embryos and larvae of the heart-shaped sea
760 urchin *Echinocardium cordatum* to temperature and salinity changes. *Russian Journal
of Marine Biology*, 33, 381-390.
77. Kawalleck, P., Somssich, I. E., Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. 1993.
765 Polyubiquitin gene expression and structural properties of the *ubi4-2* gene in
Petroselinum crispum. *Plant Molecular Biology* 21, 673-684.
78. Kitessa, S. M., Abeywardena, M., Wijesundera, C., Nichols P. D. 2014. DHA-
770 containing oilseed: A timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil
sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. *Nutrients* 6, 2035-2058.
79. Kliebenstein, D. J, Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J.,
Mitchell-Olds, T., 2001. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis*
glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* 126, 811-825.
- 775 80. Knauer, J., Barrett, S., Volkman, J., Southgate, P. C. 1999. Assimilation of dietary
phytosterols by Pacific oyster *Crassostrea gigas* spat. *Aquaculture Nutrition*, 5, 257-
266.
- 780 81. Kovalic, D., Garnaat, C., Guo, L., Yan, Y., Groat, J., Silvanovich, A., Ralston, L.,
Huang, M., Tian, Q., Christian, A. 2012. The use of next generation sequencing and
junction sequence analysis bioinformatics to achieve molecular characterization of
crops improved through modern biotechnology. *Plant Genome* 5, 149-163. Lage, S.,
Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S. 2015. Biotransfer of β -N-methylamino-
785 L-alanine (BMAA) in a eutrophicated freshwater lake. *Marine Drugs* 13, 1185-1201.
82. Kyle, D. J. 2003. Microalgal feeds containing arachidonic acid and their production
and use. US7396548B2.

- 790 83. Lage, S., Annadotter, H., Rasmussen, U., Rydberg, S. 2015. Biotransfer of β -N-Methylamino-L-alanine (BMAA) in a Eutrophicated Freshwater Lake. *Marine drugs*, 13, 1185-1201.
- 795 84. Laing, I. 2000. Effect of temperature and ration on growth and condition of king scallop (*Pecten maximus*) spat. *Aquaculture*, 183, 325-334.
85. Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H., Huang, Y.-S. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research* 43, 36-54.
- 800 86. Li, G., Sinclair, AJ., Li, D. 2011. Comparison of lipid content and fatty acid composition in the edible meat of wild and cultured freshwater and marine fish and shrimps from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1871-1881.
- 805 87. Li, P.-L., Farrand, S. K. 2000. The replicator of the nopaline-type Ti plasmid pTiC58 is a member of the *repABC* family and is influenced by the TraR-dependent quorum-sensing regulatory system. *Journal of Bacteriology* 182, 179-188.
- 810 88. Li, S.-C., Wang, W.-X., Hsieh, D. P. 2002. Effects of toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* on the energy budgets and growth of two marine bivalves. *Marine Environmental Research*, 53, 145-160.
- 815 89. Liu, W., Pearce, C., Alabi, A., Gurney-Smith, H. 2009. Effects of microalgal diets on the growth and survival of larvae and post-larvae of the basket cockle, *Clinocardium nuttallii*. *Aquaculture*, 293, 248-254.
- 820 90. Liu, W., Pearce, C., McKinley, R., Forster, I. 2016. Nutritional value of selected species of microalgae for larvae and early post-set juveniles of the Pacific geoduck clam, *Panopea generosa*. *Aquaculture*, 452, 326-341.
- 825 91. MacDonald, M. H., Mogen, B. D., Hunt, A. G. 1991. Characterization of the polyadenylation signal from the T-DNA-encoded octopine synthase gene. *Nucleic Acids Research* 19, 5575-5581.
- 830 92. Marx, C. J., Lidstrom, M. E. 2001. Development of improved versatile broad-host-range vectors for use in methylotrophs and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 147, 2065-2075.
93. Mazur, B. J., Chui, C.-F., Smith, J. K. 1987. Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. *Plant Physiology* 85, 1110-1117.

- 835 94. Moreno, T., Varela, A., Portela, C., Pérez, N., Carballo, J., Montserrat, L. 2007. The effect of grazing on the fatty acid profile of *longissimus thoracis* muscle in Galician Blond calves. *Animal* 1, 1227-1235.
- 840 95. Mori, H., Kondo, A., Ohshima, A., Ogura, T., Hiraga S. 1986. Structure and function of the F plasmid genes essential for partitioning. *Journal of Molecular Biology* 192, 1-15.
- 845 96. Murotsu, T., Tsutsui, H., Matsubara, K. 1984. Identification of the minimal essential region for the replication origin of miniF plasmid. *Molecular and General Genetics* 196, 373-378.
- 850 97. Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshiba, T., Kamiya, Y., Nambara, E. 2005. Genome - wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: Epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *Plant Journal* 41, 697-709.
- 855 98. Naumovski, L., Friedberg, E. C. 1983. Construction of plasmid vectors that facilitate subcloning and recovery of yeast and *Escherichia coli* DNA fragments. *Gene* 22, 203-209.
- 860 99. Newhouse, K. E., Smith W. A., Starret, M. A., Schaefer, T. J., Singh, B. K. 1992. Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. *Plant Physiology* 100, 882-886.
- 865 100. Numaguchi, K. 2000. Evaluation of five microalgal species for the growth of early spat of the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Journal of Shellfish Research*, 19, 153-157.
- 870 101. OECD, 2002a, online. Consensus document on compositional considerations for new varieties of maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. Accessed on October 4, 2017. available at <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/46815196.pdf>
102. OECD, 2002b, online. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugar beet: Key food and feed nutrients and antinutrients. Accessed on October 4, 2017. available at <https://www.oecd.org/science/biotrack/46815157.pdf>
103. OECD, 2011a. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of low erucic acid rapeseed (canola): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. Accessed on October 4, 2017. available at

<https://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/49343153.pdf>

- 875 104. OECD, 2011b, online. Consensus document on compositional considerations for new varieties of sugarcane (*Saccharum* ssp. hybrids): Key food and feed nutrients, antinutrients and toxicants. Accessed on October 4, 2017. available at <http://www.oecd.org/env/ehs/biotrack/48962816.pdf>
- 880 105. OECD, 2012a. Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.).
- 885 106. OECD, 2012b, online. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]: Key food and feed nutrients, antinutrients, toxicants and allergens. Accessed on October 4, 2017. available at [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/monono\(2012\)24&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/monono(2012)24&doclanguage=en)
- 890 107. OECD, 2016, online. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties of rice (*Oryza sativa*): Key food and feed nutrients and anti-nutrients. Accessed on October 4, 2017. available at [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/monono\(2016\)38&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/monono(2016)38&doclanguage=en)
- 895
108. OGTR, 2011. The Biology of *Brassica napus* L. (canola).
- 900 109. OGTR, 2017. The Biology of *Brassica napus* L. (canola) and *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard).
110. Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of Molecular Biology* 147, 217-226.
- 905 111. Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F., Rastrelli, L. 2002. Fatty acid composition and antioxidant levels in muscle tissue of different Mediterranean marine species of fish and shellfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7314-7322.
- 910 112. Patnaik, S., Samocha, T.M., Davis, D.A., Bullis, R.A., Browdy, C.L. 2006. The use of HUFA-rich algal meals in diets for *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 12, 395-401

- 915 113. Peason, W. R., Lipman, D. J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison.
114. Proceedings of the National Academy of Sciences 24, 2444-2448.
- 920 115. Ponis, E., Robert, R., Parisi, G., Tredici, M. 2003. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquaculture International*, 11, 69-79.
- 925 116. Ponis, E., Parisi, G., Zittelli, G. C., Lavista, F., Robert, R., Tredici, M. 2008. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. *Aquaculture*, 282, 97-103.
- 930 117. Qian, Z. J., Jung, W. K., Kang, K. H., Ryu, B., Kim, S. K., Je, J. Y., Heo, S. J., Oh, C., Kang, D. H., Park, W. S. 2012. In vitro antioxidant activities of the fermented marine microalga *Pavlova lutheri* (haptophyta) with the yeast *Hansenula polymorphal*. *Journal of Phycology*, 48, 475-482.
- 935 118. Qiu, X., Hong, H., MacKenzie, S. L. 2001. Identification of a $\Delta 4$ fatty acid desaturase from *Thraustochytrium* sp. involved in the biosynthesis of docosahexanoic acid by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Brassica juncea*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31561-31566.
- 940 119. Rask, L., Ellerström, M., Ezcurr,a I., Stålberg, K., Wycliffe, P. 1998. Seed-specific regulation of the napin promoter in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* 152, 595-599.
- 945 120. Reski, R., Parsons, J., Decker, E. L, 2015. Moss - made pharmaceuticals: From bench to bedside. *Plant Biotechnology Journal* 13, 1191-1198.
- 950 121. Réveillon, D., Abadie, E., Séchet, V., Masseret, E., Hess P., Amzil, Z. 2015. β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Marine Environmental Research*, 110, 8-18.
122. Ronquillo, J. D., Fraser, J., McConkey, A.-J. 2012. Effect of mixed microalgal diets on growth and polyunsaturated fatty acid profile of European oyster (*Ostrea edulis*) juveniles. *Aquaculture*, 360, 64-68.
123. Rosales-Mendoza, S, Orellana-Escobedo, L., Romero-Maldonado, A., Decker, E. L.

- 955 Reski, R., 2014. The potential of *Physcomitrella patens* as a platform for the production of plant-based vaccines. *Expert Review of Vaccines* 13, 203-212.
124. Rosenlund, G., Torstensen, B. E., Stubhaug, I., Usman, N., Sissener, N. H. 2016 Atlantic salmon require long-chain n-3 fatty acids for optimal growth throughout the seawater period. *J Nutr Sci.* 5, e19.
- 960 125. Rossak, M., Smith, M., Kunst, L. 2001. Expression of the *FAEI* gene and *FAEI* promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 46, 717-725.
- 965 126. Sakuradani, E., Kamada, N., Hirano, Y., Nishihara, M., Kawashima, H., Akimoto, K., Higashiyama, K., Ogawa, J., Shimizu, S. 2002. Production of 5,8,11-eicosatrienoic acid by a $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturation activity-enhanced mutant derived from a $\Delta 12$ desaturation activity-defective mutant of *Mortierella alpine* 1S-4. *Sppl Microbiol Biotechnol* 60: 281-287.
- 970 127. Semura, H. 1995. The effect of algal species and concentration on the rates of filtering, digestion, and assimilation of the adult Japanese bay scallop *Pecten albicans*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (Japan)*, 61, 673-678.
- 975 128. Shanklin, J., Cahoon, E. B. 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611-41.
- 980 129. Sharma, N., Cram, D., Huebert, T., Zhou, N., Parkin, I. A. P. 2007. Exploiting the wild crucifer *Thlaspi arvense* to identify conserved and novel genes expressed during a plant's response to cold stress. *Plant Molecular Biology* 63, 171-184.
- 985 130. Sharma, R., Willhite, C., Shupe, J., Salunkhe, D. 1979. Acute toxicity and histopathological effects of certain glycoalkaloids and extracts of *Alternaria solani* or *Phytophthora infestans* in mice. *Toxicology Letters*, 3, 349-355.
- 990 131. Shaw, B., Harrison, P., Andersen, R. 1994. Evaluation of the copepod *Tigriopus californicus* as a bioassay organism for the detection of chemical feeding deterrents produced by marine phytoplankton. *Marine Biology*, 121, 89-95. Sijtsma, L., de Swaaf, M. E. 2004. Biotechnological production and applications of the ω -3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 146-153.
132. Singh, B. K., Shaner, D. L. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field. *Plant Cell* 7, 935-944.

133. Smigocki, A. C. 1991. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. *Plant Molecular Biology* 16, 105-115.

134. Stidham, M. A., Singh, B. K. 1991 Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. In: *The imidazolinone herbicides*. Chapter 6; D. Shaner and S. O'Connor(eds.). 71-90, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

135. Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., Shaner, D. L. 2005. Imidazolinone - tolerant crops: History, current status and future. *Pest Management Science* 61, 246-257.

136. Thompson, P. A., Harrison, P. J. 1992. Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae. *Marine Biology*, 113, 645-654.

137. Thompson, P. A. Guo, M.-x., Harrison, P. J. 1996. Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 143, 379-391.

138. Thorn, K. S, Christensen, H. E, Shigeta, R., Huddler, D., Shalaby, L., Lindberg, U., Chua, N.-H., Schutt, C. E. 1997. The crystal structure of a major allergen from plants. *Structure*, 5, 19-32.

139. Tomaru, Y., Ebisuzaki, S., Kawabata, Zi., Nakano, Si. 2002. Respiration rates of the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, feeding on *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture Research*, 33, 33-36.

140. Tonon, T., David, H., Larson, T. R., Graham, I. A. 2003. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Δ^4 -desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Letters* 553, 440-444.

141. Tripathi, M., Mishra, A. 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology* 132, 1-27.

142. Truksa, M., MacKenzie, S. L., Qiu, X. 2003. Molecular analysis of flax 2S storage protein conlinin and seed specific activity of its promoter. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 141-147.

143. Twining, C. W., Brenna, J. T., Hairston, N. G., Flecker, A. S. 2016a. Highly

- unsaturated fatty acids in nature: what we know and what we need to learn. *Oikos* 125, 749-760.
- 1040 144. Twining, C. W., Brenna, J. T., Lawrence, P., Shipley, J. R., Tollefson, T. N., Winkler, D. W. 2016b. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids support aerial insectivore performance more than food quantity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 10920-10925.
- 1045 145. USDA. 2017. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Full Report (All Nutrients): 04594, Fish oil, sardine. Accessed on March 9, 2017. Available online: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/730?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&ma>
- 1050 146. Wang, Q., Jin, G., Jin, Y., Ma, M., Wang, N., Liu, C., He, L. 2014. Discriminating eggs from different poultry species by fatty acids and volatiles profiling: Comparison of SPME - GC/MS, electronic nose, and principal component analysis method. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1044-1053.
- 1055 147. Wang, Y., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Zou, J.-J., Su, Z., Wu, W.-H. 2008. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 148, 1201-1211.
- 1060 148. WHO. 2004. Laboratory Biosafety Manual. 3rd edition, World Health Organization, Geneva, 178 pp.
- 1065 149. Wolff, R. L. 1993. Heat-induced geometrical isomerization of α -linolenic acid: effect of temperature and heating time on the appearance of individual isomers. *Journal of American Oil Chemists' Society* 70, 425-430.
- 1070 150. Wu, G., Truksa, M., Datla, N., Vrinten, P., Bauer, J., Zank, T., Cirpus, P., Heinz, E., Qiu, X. 2005. Stepwise engineering to produce high yields of very long-chain polyunsaturated fatty acids in plants. *Nature Biotechnology* 23, 1013-1017.
- 1075 151. Wu, L., Roe, C. L., Wen, Z. 2013. The safety assessment of *Pythium irregulare* as a producer of biomass and eicosapentaenoic acid for use in dietary supplements and food ingredients. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97, 7579-7585.
152. Yamamori, M. 2011. Outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an experimental field. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 45, 173-179.
153. Yang, S., Zhang, H. 2016. Enhanced polyunsaturated fatty acids production in

Mortierella alpina by SSF and the enrichment in chicken breasts. Food Nutr Res 60, 30842

- 1080 154. Yates, B., De Soyza, A., Harkawat, R., Stenton, C. 2008. Occupational asthma caused by *Arabidopsis thaliana*: a case of laboratory plant allergy. European Respiratory Journal, 32, 1111-1112.
- 1085 155. Yilmaz, J. L., Lim, Z. L., Beganovic, M., Breazeale, S., Andre, C., Stymne, S., Vrinten, P., Senger, T. 2017. Determination of substrate preferences for desaturases and elongases for production of docosahexaenoic acid from oleic acid in engineered canola. Lipids 52, 207-222.
- 1090 156. Ytrestoyl, T., Aas, T. S., Asgard, T. 2015. Utilisation of feed resources in production of Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Aquaculture 448, 365-374.
- 1095 157. Zank, T., Zähringer, U., Lerchl, J., Heinz, E. 2000. Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for Δ^6 -polyunsaturated fatty acids. Biochemical Society Transactions 28, 654-658.
- 1100 158. Zank, T., Bauer, J., Cirpus, P., Abbadi, A., Heinz, E., Qiu, X., Vrinten, P., Sperling, P., Domergue, F., Meyer, A. 2005. Method for the production of multiply-unsaturated fatty acids in transgenic organisms. Patent WO2005012316 A2, World Intellectual Property Organization.
- 1105 159. Zäuner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., Benning, C. 2012. A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell. 11, 856–863.
- 1110 160. Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, SE. 2003. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. Science 299, 716-719.
- 1115 161. 小川順、櫻谷英治、安藤晃規、清水 昌. 2011. 油脂生産性糸状菌 *Mortierella alpina* による機能性脂質生産. (http://www.jsmrs.jp/journal/No27_1/No27_1_25.pdf) Microbiol. Cult. Coll. 27: 25–29.
162. 環境省, 2002. 我が国における移入種(外来種)リスト (<http://www.env.go.jp/nature/report/h14-01/mat01a.pdf>) (閲覧日 2018年11月21日)
163. 公益財団法人 日本油脂検査協会、2017. 食用植物油脂の脂肪酸組成

(<http://www.oil-kensa.or.jp/statistics/statistics.html>) (閲覧日 2018年11月21日)

- 1120 164. 清水矩宏、森田弘彦、廣田伸七. 2001. “アブラナ科”. 日本の帰化植物. 全国農村教育協会. P.90-91.
- 1125 165. 津田麻衣, 田部井豊, 大澤良, 下野綾子, 吉田康子, 吉村泰幸 2016 遺伝子組換えセイヨウアブラナの生物多様性影響評価に必要なカラシナ(*Brassica juncea*)、アブラナ(*B. rapa*)、セイヨウアブラナ(*B. napus*)の生物情報集. 農業表環境技術研究所報告, 36, p.1-45.
- 1130 166. 農林水産省, 2017. 「平成 27 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について (<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/170110-1.pdf>)

参考資料 (申請者提出 社外秘)

- 1135 1. Zhang, J. 2016. Vector Construction and Transformation for the Generation of the EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201608-007R]
- 1140 2. Fu, H. 2017. Molecular Characterization of the EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201603-003]
- 1145 3. Wenderoth, I., Lipscomb, E. 2016. History of Safe Use for the Newly Expressed Proteins in EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201608-001R]
- 1150 4. Islamovic, E. 2017. Bioinformatic Analysis of EPA+DHA Canola Event LBFLFK for Similarity to Allergens and Toxins [201705-001R]
- 1155 5. Andre, C., Schauwecker, F. 2017. Alignment of Elongases and Desaturases Contained in LBFLFK with Proteins in Food or Feed [201703-010R]
6. Carringer, R. D. 2017. Determination of the Levels of Newly Expressed Proteins in EPA+DHA Canola Field-grown Plants in the United States during 2015 [201503-003]
7. Breazeale, S., Myers, T. 2016. Production of Plant-Produced Proteins (PPP) from LBFLFK and Kumily Immature Seeds [201602-004R]
8. Olson, A. 2017. Digestive Fate of Newly Expressed Proteins Produced in Immature Seed of EPA+DHA Canola [201608-001]
9. Olson, A. 2017. Heat Stability of Newly Expressed Proteins Produced in Immature Seed of EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201604-001]

- 1160 10. Olson, A. 2017. Characterization of Plant-Produced Proteins from Immature Seed of EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201601-008]
- 1165 11. Carringer, R. D. 2017. Agronomic and Phenotypic Characteristics of EPA+DHA Canola Field-grown in the United States during 2015 and Nutrient Composition of the Harvested Seed [201503-002]
- 1170 12. Wenderoth, I., Lipscomb, E. 2017. History of Safe Use for the Fatty Acids in EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201608-007R]
- 1175 13. Wyatt, D. R. 2017. Magnitude of the residues of imazamox in or on canola raw agricultural commodities following one application of BAS 720 01 H. [781059]
- 1180 14. Fu, H. 2018. Validation of the Event-specific Real-time PCR System for Quantitative Detection of EPA+DHA Canola Event LBFLFK [201710-001R]
15. Motyka, S. 2020. Detection of O3D(*Pi*) and D6E(*Pp*) in Immature Seed of Canola Event LBFLFK
16. Andre, C., 2020. Regarding E-values for Regulatory Research Report No. 201703-010R - Alignment of Elongases and Desaturases Contained in LBFLFK with Proteins in Food or Feed