

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ
(DP-073496-4)**

**平成 26 年 8 月 27 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	4
(3)	有害生理活性物質の生産に関する事項	4
(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	5
(9)	飼料の安全な利用に関する事項	5
(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	6
(5)	宿主依存性に関する事項	6
(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	7
（４）性質に関する事項	8
（５）純度に関する事項	8
（６）コピー数に関する事項	9
（７）安定性に関する事項	9
（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	10
（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	10
6 組換え体に関する事項	10
（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	10
（２）遺伝子産物の毒性に関する事項	10
（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	11
（４）遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項	11
（５）宿主との差異に関する事項	12
（６）外界における生存及び増殖能力に関する事項	14
（７）生存及び増殖能力の制限に関する事項	14
（８）不活化法に関する事項	14
（９）外国における認可等に関する事項	14
（10）作出、育種及び栽培方法に関する事項	15
（11）種子の製法及び管理方法に関する事項	15
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	15
IV 審議結果	15
V 参考文献及び参考資料	15

「除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ（DP-073496-4）」に係る安全性確認

I はじめに

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ（DP-073496-4）（以下「DP-073496-4 セイヨウナタネ」という。）について、平成 25 年 10 月 3 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料の概要

飼料名：除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ（DP-073496-4）

性 質：除草剤グリホサート耐性

申請者：デュポン株式会社

開発者：パイオニア・ハイブレッッド・インターナショナル社

DP-073496-4セイヨウナタネは、除草剤グリホサートに対する耐性を付与するため、*Bacillus licheniformis* の 3 つの株（ST401 株、B6 株及びDS3 株）由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を基に構築された *gat4621* 遺伝子が導入されている。

gat4621 遺伝子から産生されるGAT4621たん白質が、除草剤グリホサートを除草活性のない化合物に変換することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

DP-073496-4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、DP-073496-4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、DP-073496-4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ナタネ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

DP-073496-4 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 1822 系統である。

DP-073496-4 セイヨウナタネに導入された *gat4621* 遺伝子は *Bacillus licheniformis* の 3 つの株（ST401 株、B6 株及びDS3 株）由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子を基に構築されている。

gat4621 遺伝子から産生される GAT4621 たん白質は、除草剤グリホサートを除草活性のない化合物（*N*-アセチルグリホサート）に変換することにより、除草剤グリホサートに対する耐性を付与する。

(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

DP-073496-4 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

DP-073496-4 セイヨウナタネは、GAT4621 たん白質の発現により、除草剤グリホサート耐性が付与されている。この点を除けば、DP-073496-4 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、DP-073496-4 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

DP-073496-4 セイヨウナタネは、GAT4621 たん白質を発現することにより、除草剤グリホサートに対する耐性が付与されており、除草剤グリホサ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、除草剤グリホサ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。

なお、DP-073496-4 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

DP-073496-4 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 1822 系統である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus* L.) は、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

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）。タンニンの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）。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

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

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

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）。

（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）。

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

DP-073496-4 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、飼料として安全に利用されている。

125

(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。

130

(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）。

135

4 ベクターに関する事項

140

(1) 名称及び由来に関する事項

DP-073496-4 セイヨウナタネの作出に用いられた *gat4621* 遺伝子を含む直鎖状 DNA 断片 PHP28181A は、プラスミド PHP28181 から切り出した断片である。プラスミド PHP28181 は大腸菌（*Escherichia coli*）由来のプラスミド pUC19（Yanisch-Perron *et al.*, 1985）を基本骨格として作製されている。なお、プラスミド pUC19 の構成要素とその由来及び機能は明らかとなっている。

145

(2) 性質に関する事項

プラスミド pUC19 の塩基数は 2,686 bp である。また、プラスミド pUC19 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。

150

(3) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pUC19 には抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与する *bla* 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 PHP28181A には含まれていない。なお、*bla* 遺伝子が DP-073496-4 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）。

155

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 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。

160

(5) 宿主依存性に関する事項

165 プラスミド pUC19 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

170 プラスミド pUC19 に *gat4621* 遺伝子カセットを挿入することによりプラスミド PHP28181 を作製し、これを制限酵素で処理することにより、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A を得ている。

(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

175 宿主への遺伝子の導入には、パーティクルガン法 (Klein *et al.*, 1987) により、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の全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

180 DP-073496-4 セイヨウナタネに導入された *gat4621* 遺伝子は、*B. licheniformis* の 3 つの株 (ST401 株、B6 株及び DS3 株) 由来の *N*-アセチルトランスフェラーゼ (参考資料 2) の塩基配列を基に、DNA シャッフリング法¹⁾で構築したグリホサート *N*-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子である。

② 安全性に関する事項

185 *B. licheniformis* は、土壤中に広範に存在するグラム陽性菌の一種あり、デンプン液化用 α -アミラーゼ等、食品製造用酵素の生産に世界各国で広く安全に利用されている (Federal Register, 1997、Codex, 2011、日本食品化学研究振興財団, 2012)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

190 宿主であるカノーラ品種 1822 系統に対し、*gat4621* 遺伝子を含む直鎖状 DNA 断片 PHP28181A を用いて、パーティクルガン法により形質転換を行った。形質転換体を除草剤グリホサート耐性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 DP-073496-4 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

200 *gat4621* 遺伝子のプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来のポリユビキチン遺伝子 *UBQ10* のプロモーター領域が用いられている (Norris *et al.*, 1993)。

¹⁾ クローニングした遺伝子を DNA 消化酵素で断片化し、DNA 合成酵素により断片同士を結合させ、再構築された遺伝子を得る技術 (Stemmer, 1994、Cramer *et al.*, 1998)。

② ターミネーターに関する事項

gat4621 遺伝子のターミネーターは、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子 *pinII* のターミネーター領域が用いられている (Keil *et al.*, 1986、An *et al.*, 1989)。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 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。

(4) 性質に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 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。*gat4621* 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
<i>gat4621</i> 遺伝子発現カセット	
<i>UBQ10</i> プロモーター	シロイヌナズナ (<i>A. thaliana</i>) 由来のポリユビキチン遺伝子 <i>UBQ10</i> の転写を誘導するプロモーター領域で、植物体内全体での発現を誘導する (Norris <i>et al.</i> , 1993)。
<i>gat4621</i> 遺伝子	<i>B. licheniformis</i> の 3 つの株 (ST401 株、B6 株及び DS3 株) に由来する。
<i>pinII</i> ターミネーター	ジャガイモ (<i>S. tuberosum</i>) 由来のプロテアーゼインヒビターII 遺伝子 <i>pinII</i> のターミネーター領域で (Keil <i>et al.</i> , 1986; An <i>et al.</i> , 1989)、転写を停止する。

【 *gat4621* 遺伝子の機能 】

gat4621 遺伝子から産生される GAT4621 たん白質は、147 個のアミノ酸からなる約 17 kDa の *N*-アセチルトランスフェラーゼであり、除草剤グリホサートに対し高い *N*-アセチル化反応を触媒する活性を有する。

除草剤グリホサートは、植物における芳香族アミノ酸合成に関与するシキミ酸経路の 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素 (EPSPS) 活性を阻害する。その結果、グリホサートを散布された植物は、EPSPS が阻害され、たん白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯死する。

GAT4621 たん白質は、除草剤グリホサートをアセチル化し、EPSPS 活性を阻害しない *N*-アセチルグリホサートに変える。その結果、植物は除草剤グリホサートに対する耐性が付与される。

(5) 純度に関する事項

直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の塩基数は 2,112 bp であり、その塩基配列 (参考資料 3)、構成及び由来は明らかとなっており、目的以外の遺伝子は含まれないことが確認されている。

235 (6) コピー数に関する事項

DP-073496-4 セイヨウナタネに導入された直鎖状 DNA 断片 PHP28181A の
コピー数、完全性及び直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 以外の配列の有無を確認す
るため、サザンブロット分析を行った。その結果、DP-073496-4 セイヨウナタ
ネのゲノム中に、完全長の直鎖状 DNA 断片 PHP28181A が 1 コピー挿入され
240 ていること、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 以外の配列が存在しないことが確認
された。(参考資料 4、6)

DP-073496-4 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、
挿入遺伝子の 5' 末端領域に 3 bp の欠損が認められたことを除き、DP-073496-
245 4 セイヨウナタネ中の挿入遺伝子と、直鎖状 DNA 断片 PHP28181A 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。また、近傍配列
は宿主ゲノム由来であることが確認された(参考資料 5)。

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
250 近傍配列において、トリオースリン酸／リン酸輸送体(以下「TPT」という。)
たん白質をコードする *tpt* 遺伝子との相同性が認められる配列が検出された(参
考資料 5、7)。

挿入 DNA の導入により、宿主の内在性 *tpt* 遺伝子が破壊されても同遺伝子が
複数存在する場合、機能が補完される可能性があることから、非組換えセイヨ
ウナタネにおける *tpt* 遺伝子のコピー数を確認するため、サザンブロット分析を
255 行った。その結果、*tpt* 遺伝子が複数存在することが確認された(参考資料 5)。

DP-073496-4 セイヨウナタネの未熟種子及び葉における *tpt* 遺伝子の発現を
確認するため、ノーザンブロット分析を行った。その結果、DP-073496-4 セイ
ヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの葉において、*tpt* 遺伝子の発現が確認
260 され、未熟種子ではいずれも発現は認められなかった。さらに、葉における *tpt*
遺伝子の総発現量を定量 PCR 分析により測定した結果、*tpt* 遺伝子の発現量は
非組換えセイヨウナタネに比べて低下していた(参考資料 5)。

TPT たん白質は、光合成で固定されたトリオースリン酸を葉緑体から細胞質
に輸送することでショ糖合成に供する機能を有することから(Cho *et al.*,
2011)、*tpt* 遺伝子の総発現量の低下により、ショ糖及びショ糖を基に合成され
る炭素関連代謝物の含量に影響を及ぼす可能性が考えられたため、種子中の脂
質、粗繊維及び炭水化物の含量を測定した。その結果、DP-073496-4 セイヨウ
ナタネ及び非組換えセイヨウナタネの間で統計学的有意差は認められなかった
(参考資料 1、8、9)。したがって、挿入 DNA の導入による内在性の遺伝子へ
270 の影響は認められなかった。

(7) 安定性に関する事項

DP-073496-4 セイヨウナタネ中の導入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認
するため、4 世代の DP-073496-4 セイヨウナタネから得られたゲノム DNA を用

275 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た（参考資料 4）。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

280 DP-073496-4 セイヨウナタネにおける GAT4621 たん白質の発現量を ELISA 法により測定した（参考資料 10）。種子のサンプルは米国及びカナダの 5 か所のほ場から、地上部及び根のサンプルは米国及びカナダの 6 か所のほ場から異なる生育時期に採取した。測定の結果、供試したすべての組織サンプル（地上部、種子及び根）から GAT4621 たん白質の発現が確認された。

285 (9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

プラスミド pUC19 には、アンピシリン耐性を付与する *bla* 遺伝子が存在するが、形質転換にはプラスミド pUC19 から切断された *gat4621* 遺伝子発現カセットのみを含む断片が用いられているため、DP-073496-4 セイヨウナタネ中に *bla* 遺伝子は挿入されていない。なお、DP-073496-4 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）。

(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

295 DP-073496-4 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（TGA、TAG 及び TAA）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、3 個の ORF が検出された。これら 3 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 5）。

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

305 DP-073496-4 セイヨウナタネに導入された *gat4621* 遺伝子は、GAT4621 たん白質をコードしており、DP-073496-4 セイヨウナタネに除草剤グリホサートに対する耐性を付与している。この点を除けば、DP-073496-4 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。

310 (2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

315 GAT4621 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、BLASTP アルゴリズムにより相同性検索を行った。その結果、GAT4621 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

E. coli で発現させた GAT4621 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 GAT4621 たん白質と DP-073496-4 セイヨウナタネ中で発現する GAT4621 たん白質の同等性に関しては、分子量 (SDS-PAGE 分析)、免疫反応性 (ウェスタンブロット分析)、アミノ酸配列 (N 末端分析及び MALDI-MS) 及びグリコシル化の有無により確認している (参考資料 12)。

① 人工胃液による酸処理及び酵素 (ペプシン) 処理

SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により、GAT4621 たん白質の人工胃液中での消化性を評価した。その結果、SDS-PAGE 分析では、試験開始の 30 秒後には GAT4621 たん白質のバンドは検出されなくなったが、60 分後までの GAT4621 たん白質の分解産物のバンドが認められた。一方、ウェスタンブロット分析では、試験開始の 30 秒後には GAT4621 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、GAT4621 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た (参考資料 13)。

② 人工腸液によるアルカリ処理及び酵素 (パンクレアチン) 処理

SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析により、GAT4621 たん白質の人工腸液中での消化性を評価した。その結果、SDS-PAGE 分析では試験開始の 2 分後、ウェスタンブロット分析では試験開始の 5 分後には、GAT4621 たん白質のバンドが検出されなかった。このことから、GAT4621 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た (参考資料 14)。

③ 加熱処理

GAT4621 たん白質の加熱処理に対する感受性を、ウェスタンブロット分析によって評価した。その結果、100℃で 30 分間加熱処理した場合、GAT4621 たん白質のバンドのシグナル強度が減少した (参考資料 15)。

また、GAT4621 たん白質の加熱時の酵素活性を測定した結果、GAT4621 たん白質の酵素活性は、46～50℃の間で約 50%に低下し、53℃、15 分の加熱で 10%程度に低下することが確認された (参考資料 16)。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

GAT4621 たん白質は、*N*-アセチルトランスフェラーゼの一種である。一般に *N*-アセチルトランスフェラーゼは、たん白質の N 末端アミノ酸、生体アミン化合物である遊離アミノ酸及びヒストン中のアミノ酸並びに抗生物質等をアセチル化することが知られている (井上ら, 1998、Dyda *et al.*, 2000、Polevoda and Sherman, 2003)。

GAT4621 たん白質と相同性の高い GAT4602 たん白質の評価結果 (Siehl *et al.*, 2005) を参考に、GAT4621 たん白質の基質となりうる化合物を推定した。

GAT4602 たん白質は、GAT4621 たん白質と 91%のアミノ酸配列相同性を有し（参考資料 2）、たん白質の内部奥に位置する 4 つのアミノ酸残基が活性中心であることも一致している（Siehl *et al.*, 2007）。

360 GAT4621 たん白質の基質となる可能性のある低分子化合物（農薬 20 種、抗生物質 10 種及びアミノ酸 21 種）に対する触媒活性を測定した。その結果、L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-トレオニン、L-セリン及び L-グリシンの 5 種のアミノ酸に対し触媒活性が認められた。これらのアミノ酸のうち、高い触媒活性が認められた L-アスパラギン酸及び L-グルタミン酸においても、除草剤グリホサートに対する触媒活性の 3%程度であった（参考資料 17）。

365 次に、活性が認められた 5 種のアミノ酸に加え、除草剤グリホサートと構造が極めて類似する 4 種類の化合物を供試し、これらを基質とした場合の GAT4621 たん白質の触媒効率（ k_{cat}/K_m 値）を測定した（参考資料 17）。その結果、L-グリシン及び除草剤グリホサートの類似化合物については活性が認められず、GAT4621 370 たん白質の L-アスパラギン酸、L-グルタミン酸、L-トレオニン及び L-セリンに対する k_{cat}/K_m 値は、除草剤グリホサートに対する値に対して極めて低い値であった。

375 以上のことから、GAT4621 たん白質は除草剤グリホサートに対し基質特異性を有すると考えられた。なお、上の文献（Siehl *et al.*, 2007）は、GAT たん白質の基質について、リン酸基を持つアミンの場合、主鎖の原子数が 5 個以下であることを報告しており、除草剤グリホサートと構造が似ている除草剤グルホシネートは、これを満たさないため、基質となる可能性は低いと考えられた。

さらに、上の 5 種のアミノ酸に対して触媒活性が認められたことから、これらのアミノ酸が *N*-アセチル化される可能性が考えられたため、DP-073496-4 セイヨウナタネ種子中の *N*-アセチルアミノ酸量を分析した。その結果、DP-073496-4 セイヨウナタネ中では、非組換えセイヨウナタネと比較して、*N*-アセチルアスパラギン酸（以下「NAA」という。）、*N*-アセチルグルタミン酸（以下「NAG」という。）、*N*-アセチルセリン（以下「NAS」という。）及び *N*-アセチルトレオニン（以下「NAT」という。）の計 4 種が統計学的有意に増加していた。なお、NAT 及び NAS の含量は自社商業品種から得られた分析値の範囲内²⁾であった（参考資料 18、19）。DP-073496-4 セイヨウナタネ種子中のアミノ酸及び遊離アミノ酸の分析を行った結果、非組換えセイヨウナタネと同程度であった（参考資料 20）。以上のことから、DP-073496-4 セイヨウナタネ中の NAA 及び NAG について、商業非組換えセイヨウナタネと比べて差異が認められたが、GAT4621 たん白質はその他のアミノ酸及び遊離アミノ酸組成には影響を及ぼさないと考えられた。なお、DP-073496-4 セイヨウナタネにおいて、NAA 及び NAG が増加することによる飼料としての安全性については、6 の（5）③のとおりである。

（5）宿主との差異に関する事項

DP-073496-4 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

²⁾ 2008 年に北米の 5 か所で栽培した商業非組換えセイヨウナタネ 3 品種及び 2009 年に北米の 5 か所で栽培した商業非組換えセイヨウナタネ 4 品種の分析結果に基づき、分析値の 99%を含むよう設定した上限値と下限値の範囲。

- 395 性を確認するため、2009年に米国の2か所及びカナダの3か所のほ場において栽培した DP-073496-4 セイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネの種子について、①主要構成成分、②脂肪酸、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た（参考資料1、18、19、20）。
- 400 ① 主要構成成分
種子中のたん白質、脂質、粗繊維、灰分、炭水化物、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、いずれの成分も対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に差異は認められなかった。
- 405 ② 脂肪酸
種子中の各脂肪酸について分析した結果、いずれの脂肪酸も対照の非組換えセイヨウナタネと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。
- ③ アミノ酸
410 種子中の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組換えセイヨウナタネの分析値との間に差異は認められなかった。
また、GAT4621 たん白質が触媒活性を示したアミノ酸について、種子中の *N*-アセチルアミノ酸量を分析した。その結果、非組換えセイヨウナタネと比較して NAA 及び NAG が統計学的有意に増加し、自社商業品種から得られた分析値
415 の範囲を超えたことから、NAA 及び NAG の安全性について検証したところ、
ア NAA 及び NAG は、非組換えセイヨウナタネにも含まれ、DP-073496-4 セイヨウナタネ中に新たに産生された成分ではなく、家畜が摂取するトウモロコシ及びダイズの他、牛肉、豚肉、鶏肉、卵、牛乳等に含まれることが報告されている（Hession *et al.*, 2008）こと
420 イ ラット又はブタによる *N*-アセチルアミノ酸の代謝試験の結果、NAA 及び NAG は動物体内で脱アセチル化されて代謝し、排泄又は栄養として利用されることにより、畜産物中に蓄積するものではないと考えられこと（Amos *et al.*, 1975; Arnaud *et al.*, 2004; Boggs, 1978; Neuhäuser and Bässler, 1986）
ウ 毒性試験（マウスを用いた小核試験及びラットを用いた急性経口毒性試験
425 及び28日間反復経口投与毒性試験、NAAのみ90日間反復経口投与毒性試験及び二世代繁殖毒性試験）の結果、NAA 及び NAG によると考えられる毒性影響は認められなかったこと（Delaney *et al.*, 2008、Harper *et al.*, 2009、Karaman *et al.*, 2009、Delaney, 2010、Karaman *et al.*, 2011a、Karaman *et al.*, 2011b）
430 エ ウの反復経口投与毒性試験において毒性変化が認められなかった NAA 及び NAG の最高用量（NAA：1,000 mg/kg/日、NAG：500 mg/kg/日）は、家畜等が摂取する NAA 及び NAG の一日最大予想摂取量（NAA：3.97～62.96 mg/kg/日、NAG：0.09～1.37 mg/kg/日）よりはるかに大きいことから、DP-073496-4 セイヨウナタネ中の NAA 及び NAG の増加が、それを飼料

435 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。

④ ミネラル

440 種子中の各ミネラルについて分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組
換えセイヨウナタネと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であ
った。

⑤ ビタミン

445 種子中の各ビタミンについて分析した結果、いずれのビタミンも対照の非組
換えセイヨウナタネと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であ
った。

⑥ 有害生理活性物質

450 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、シナピン及びステロール類について分析した結果、いずれの有害生理活
性物質も対照の非組換えセイヨウナタネと同等又は自社商業品種変動の範囲内
であった。

(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項

455 2008 年から 2010 年に、米国及びカナダの延べ 154 か所で行われたほ場試験に
おいて、DP-073496-4 セイヨウナタネの生存及び増殖能力は対照の非組換えセイ
ヨウナタネと同等であることが確認されている。

(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項

460 DP-073496-4 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

465 DP-073496-4 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

470 2012 年 5 月に米国食品医薬局（FDA）において食品・飼料としての安全性審査
が終了した。

2012 年 5 月にカナダ保健省（Health Canada）において食品としての、また、
カナダ食品検査庁（CFIA）において環境・飼料としての安全性審査が終了した。

2012 年 5 月に欧州食品安全機関（EFSA）へ食品、飼料及び輸入のための安全
性審査の申請が行われた。

2013 年 6 月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）へ食
品の輸入のための安全性審査の申請が行われた。

475

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

DP-073496-4 セイヨウナタネの栽培方法は、生育期に雑草防除のために除草剤グリホサートを使用できることを除いて、非組換えセイヨウナタネと同様である。

480

DP-073496-4 セイヨウナタネへの使用が想定される除草剤グリホサート及びその代謝物について、DP-073496-4 セイヨウナタネへの残留を検証した結果（参考資料 21）、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

485

DP-073496-4 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。また、宿主の非組換えセイヨウナタネ 1822 系統の種子及び試験に使用した DP-073496-4 セイヨウナタネの各世代の種子は保管されている。

7 2 から 6 までは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

490

該当しない。

IV 審議結果

495

除草剤グリホサート耐性セイヨウナタネ DP-073496-4 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」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. Amos, H.E., Schelling, G.T., Digenis, G.A., Swintosky, J.V., Little, C.O. and Mitchell, G.E.Jr. (1975). Methionine replacement value of N-acetylmethionine and homocysteinethiolactone hydrochloride for growing rats. The Journal of Nutrition. 105: 577-580.
2. An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W. and Ryan, C.A. 1989. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. The Plant Cell. 1: 115-122.
3. 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.
4. Arnaud, A., Ramírez, M., Baxter, J.H. and Angulo, A.J. (2004). Absorption of enterally administered N-acetyl-L-glutamine versus glutamine in pigs. Clinical Nutrition. 23:1303-1312.
5. Boggs, R.W. (1978). Bioavailability of acetylated derivatives of methionine, threonine, and lysine. Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins. 105:571-586.
6. 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.
7. 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.
8. Cho, M.-H., Lim, H., Shin, D.H., Jeon, J.S., Bhoo, S.H., Park, Y.I., and Hahn, T.R. 2011. Role of The plastidic glucose translocator in the export of starch degradation products from the chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist. 190:101-112.
 9. Codex. 2011. CODEX GENERAL STANDARD FOR FOOD ADDITIVES. CODEX STAN 192-1995. p5, 263. (http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf)
Accessed on July 12, 2012.
 10. Cramer, A., Raillard, S-A., Bermudez, E. and Stemmer, W.P.C. 1998. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution. Nature. 391: 288-291.
 11. 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.
 12. Delaney, B., Shen, A., Z., Powley, C.R., Gannon, S., Munley S.A., Maxwell C. and Barnett, J.F.Jr. 2008. Acute and repeated dose oral toxicity of N-acetyl-L-aspartic acid in Sprague-Dawley rats. Food and Chemical Toxicology. 46: 2023-2034.
 13. Delaney, B. 2010. Acute oral toxicity of N-acetyl-L-aspartic acid (NAA) in rats. Food and Chemical Toxicology. 48: 1761.
 14. Dyda, F., Klein, D.C. and Hickman, A.B. 2000. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure. 29: 81-103.
 15. Federal Register. 1997. Environmental Protection Agency. 40 CFR Parts 700, 720, 721, 723, and 725, Microbial Products of Biotechnology, Final Regulations under the Toxic Substances Control Act. Federal Register 62: 17910-17958.
(<http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-1997-04-11/pdf/97-8669.pdf>) Accessed on July 12, 2012.
 16. 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.
 17. Harper, M.S., Shen Z.A., Barnett, J.F.Jr., Krsmanovic, L., Myhre, A. and Delaney, B. 2009. N-acetyl-glutamic acid: Evaluation of acute and 28-Day repeated dose oral toxicity and genotoxicity. Food and Chemical Toxicology. 47: 2723-2729.
 18. Hession, O.A., Esrey, G.E., Croes, R.A. and Maxwell, A.C. 2008. N-acetylglutamate and N-acetylaspartate in soybeans (*Glycine max* L.), maize (*Zea mays* L.), and other foodstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56: 9121-9126.
 19. Karaman, S., Myhre, A., Donner, E.M., Munley, S.M. and Delaney, B. 2009. Mutagenicity studies with N-acetyl-L-aspartic acid. Food and Chemical Toxicology. 47: 1936-1940.
 20. Karaman, S., Barnett, J.J., Sykes, G.P. and Delaney, B. 2011a. Subchronic oral toxicity assessment of N-acetyl-L-aspartic acid in rats. Food and Chemical Toxicology. 49: 155-165.
 21. Karaman, S., Barnett, J.J., Sykes G.P., Hong, B. and Delaney B. 2011b. Two-generation

- reproductive and developmental toxicity assessment of dietary N-acetyl-L-aspartic acid in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 49:3192-3205.
22. Keil, M., Sanchez-Serrano, J., Schell, J. and Willmitzer, L. 1986. Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato (*Solanum tuberosum*). *Nucleic Acids Research*. 14: 5641-5650.
 23. Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R. and Sanford, J.C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. 327: 70-73.
 24. 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.
 25. Neuhäuser, M. and Bässler, K.H.(1986). Biological availability of glutamine from N-acetyl-L-glutamine in intravenous administration. *Studies in the rat. Infusionstherapie*. 13: 292-296.
 26. Norris, S.R., Meyer, S.E. and Callis, J. 1993. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Molecular Biology*. 21: 895-906.
 27. 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>)
 28. 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>).
 29. 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.
 30. Polevoda, B. and Sherman, F. 2003 N-terminal acetyltransferases and sequence requirements for N-terminal acetylation of eukaryotic proteins. *Journal of Molecular Biology*. 325: 595-622.
 31. Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R., Chen, Y.H. Bertain, S., Cho, H.-J., Keenan, R., Liu, D. and Lassner, M.W. 2005. Evolution of a microbial acetyltransferase for modification of glyphosate: a novel tolerance strategy. *Pest Management Science*. 61: 235-240.
 32. Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R. and Keenan, R.J. 2007. The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 282: 11446-11455.
 33. Stemmer, W.P.C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 10747-10751.
 34. 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.
 35. Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors

- and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*. 33: 103-119.
36. 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.
 37. 井上圭三ほか. 1998. “アセチルトランスフェラーゼ”. 生化学辞典 第3版. 東京化学同人. p.33.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 日本食品化学研究振興財団. 2012. 既存添加物名簿収載品目リスト.
(<http://www.ffcr.or.jp/zaidan/MHWinfo.nsf/a11c0985ea3cb14b492567ec002041df/c3f4c591005986d949256fa900252700?OpenDocument>) Accessed on July 12, 2012.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 由比進. 2004. “園芸作物”. 新編 農学大事典 第1版. 養賢堂. pp.544-546.

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. Nutrient Composition of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.
2. *Bacillus licheniformis* ST401 株、B6 株及び DS3 株の *N*-アセチルトランスフェラーゼ並びに GAT4602 たん白質と GAT4621 たん白質とのアミノ酸配列の比較
3. Description and Sequence of Fragment PHP28181A from Plasmid PHP28181.
4. Characterization of DP-Ø73496-4 Canola: Insertion Integrity, Stability, Copy Number, and Backbone Analysis.
5. Summary Report: Molecular Characterization of PHP28181A Insertion in Canola Event DP-Ø73496-4.
6. Characterization of DP-Ø73496-4 Canola: Insertion Integrity and Copy Number.
7. Characterization of the Genomic Border Regions and Junction Reading Frame Analysis at the Insertion Site of the Canola Event DP-Ø73496-4.
8. Agronomic Characteristics and Yield Evaluation of a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.
9. Concentration Determination of Sucrose in Seed of a Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4 Using HPLC/RI.
10. Quantification of GAT4621 Protein in Tissues of Herbicide-Treated Canola Lines

Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.

11. Evaluation of the Amino Acid Sequence Similarity of the GAT4621 Protein to the NCBI Protein Sequence Datasets.
12. Characterization of GAT4621 Protein Derived from Canola Containing Event DP-Ø73496-4 and Equivalency Assessment with the GAT4621 Protein Derived from a Microbial Expression System.
13. Characterization of the *In Vitro* Pepsin Resistance of Glyphosate *N*-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621) using Western Blot Analysis.
14. Characterization of the *In Vitro* Pancreatin Resistance of Glyphosate *N*-acetyltransferase 4621 Protein (GAT4621).
15. Characterization of the Effect of Heat Treatment on the Immunoreactivity of the Glyphosate *N*-acetyltransferase 4621 (GAT4621) Protein using Western Blot Analysis.
16. Characterization of the Thermal Stability of Glyphosate Acetyltransferase Enzyme Activity: GAT4621.
17. Characterization of Substrate Specificity of a Microbial Acetyltransferase Optimized for Activity with Glyphosate: GAT4621.
18. *N*-Acetylaspartate and *N*-Acetylglutamate Concentrations in Seed of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.
19. *N*-Acetylglycine, *N*-Acetylserine, and *N*-Acetylthreonine Concentrations in Seed of an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.
20. Analysis of Free Amino Acid Composition in Seed from an Herbicide-Treated Canola Line Containing Event DP-Ø73496-4: U.S. and Canada Test Sites.
21. Magnitude and Decline of Glyphosate Related Residues in Forage and Seed of Genetically Modified Canola Event DP-Ø73496-4 and Magnitude of Glyphosate Related Residues in Canola Event DP-Ø73496-4 Seed Process Fractions Following Applications of Touchdown Total® Herbicide – Locations in the United States and Canada, Season 2009.