

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

**DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性
キャノーラ（NS-B50027-4）**

**令和 2 年 9 月 30 日
（令和 6 年 8 月 8 日改訂）
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.....	2
II	確認対象飼料の概要.....	2
III	審議内容.....	2
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項.....	2
5	(1) 遺伝的素材に関する事項.....	2
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項.....	3
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項.....	3
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項.....	3
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	3
10	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.....	4
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.....	4
	(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.....	4
	(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
20	(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項.....	5
	(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項.....	5
	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
25	(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.....	6
	(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
30	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.....	10
	(3) 構造に関する事項.....	10
	(4) 性質に関する事項.....	10
35	(5) 純度に関する事項.....	10
	(6) 安定性に関する事項.....	10
	(7) コピー数に関する事項.....	10
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	11
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	11
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.....	11
	6 組換え体に関する事項.....	11
	(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項.....	11
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	12
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.....	12
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	12
	(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.....	13
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	13
50	(8) 不活化法に関する事項.....	13
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	13
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	14
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	14
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.....	14
	IV 審議結果.....	14
	V 参考文献及び参考資料.....	14

「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）」
に係る安全性確認

I はじめに

60 DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）（以下「NS-B50027-4」という。）について、令和 2 年 2 月 14 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：DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）

性 質：DHA を産生する。除草剤グルホシネートに耐性を持つ。

申請者：NUSEED Nutritional US Inc.（米国）

70 開発者：Nuseed Pty Ltd.（豪州）

NS-B50027-4 は、セイヨウナタネのキャノーラ品種 AV Jade に、ドコサヘキサエン酸（DHA）を最終生成物とする長鎖多価不飽和脂肪酸合成に関わる 7 種類の遺伝子が導入されており、DHA を産生することが出来る。また、放線菌由来の除草剤耐性遺伝子（*pat*）が導入されており、除草剤グルホシネートに対する耐性を持つ。

75

NS-B50027-4 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ナタネ油、魚油、アマニ油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。したがって、NS-B50027-4 は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。

80

NS-B50027-4 の油は、DHA を含有するため、魚油の代替として飼料に利用される。また、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、NS-B50027-4 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。

85

なお、NS-B50027-4 は、契約した特定の圃場で栽培され、契約業者によって搾油される。

III 審議内容

90 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

NS-B50027-4 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 AV Jade である。

95

NS-B50027-4 には、DHA の合成に関わる微細藻類由来の遺伝子及び酵母由来の遺伝子が合計 7 種類導入されている。さらに、除草剤グルホシネート耐性を持つ放線菌由来の遺伝子が導入されている。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

100

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

105

NS-B50027-4 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

110

NS-B50027-4 は、最終製品である DHA 含有油の品質劣化（脂肪酸の変性）を防ぐために、種子の状態で保管し需要に応じた搾油が行われる。また、加工の際には過熱や酸化を避けること等に留意する。これらの点が従来キャノーラとの相違点である。

また、*pat* 遺伝子の導入により、除草剤グルホシネート耐性を獲得しているため、除草剤グルホシネートを散布しても影響を受けずに生育することができる。

115

(1) ～ (4) により、NS-B50027-4 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長鎖多価不飽和脂肪酸含有量の高い植物油（アマニ油）及び魚油（イワシ油、サケ油）との比較が可能であると判断された。

120

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

NS-B50027-4 は、導入された 7 個の遺伝子により DHA を産生することができる。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、NS-B50027-4 油は魚油の代替として利用される。また、従来のキャノーラ品種と同様に、NS-B50027-4 は油糧用に栽培され、その搾油かすが飼料原料として用いられる。

125

さらに導入された PAT たん白質により、除草剤グルホシネートに抵抗性を持つため、栽培の過程で効率的な雑草防除が可能になる。

3 宿主に関する事項

130 (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

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 AV Jade である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

135 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)。

140

(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。

145

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 1 g 当たり 30 μmol 未満である (OECD, 2011) ことが規定されている。

150

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

155

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

セイヨウナタネには、菌核病、黒斑病、うどんこ病、黒脚病、根こぶ病等の病害があるが、これらの病原体の家畜等に対する病原性は報告されていない。

160

(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

165 セイヨウナタネは、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）。

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基本的には自殖であるが、他家交雑率も5～30%と報告されている（OECD, 1997、畑作全書, 1981）。

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, 2018）。

 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

180 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）。

 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

185 キャノーラ品種の開発により、ナタネ油かす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、ナタネ油と油かす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、10℃以下の土壌温度では徐々に発芽率が低下する。幼苗期や越冬直後は湿害を受けやすく、排水不良の圃場では生育不良や枯死することもある（農学大事典, 2004 ; OECD, 1997 ; 津田ら, 2016）。

195

 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

200 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）。

(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

205 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、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）。

210

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

NS-B50027-4 の作出のために用いたベクターは、バイナリーベクターpORE03（Coutu *et al.*, 2007）由来の pJP3416 である。

215

(2) 性質に関する事項

pJP3416 の塩基数は 9,860 bp であり、pJP3416 の全塩基配列、制限酵素切断部位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側骨格領域に存在する全ての構成要素は、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。

220

(3) 薬剤耐性に関する事項

pJP3416 の外側骨格領域には、カナマイシンやネオマイシンに対する耐性を付与するネオマイシンリン酸基転移酵素 III 遺伝子（*nptIII*）が含まれているが、T-DNA 領域の外側にあり、NS-B50027-4 に外側骨格領域が挿入されていないことはベクター標的シーケンス（VTS）解析により確認している。

225

(4) 伝達性に関する事項

pJP3416 の外側骨格領域には、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

pJP3416 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

NS-B50027-4 の作出に用いられた形質転換用バイナリーベクター pJP3416_GA7-ModB は、pJP3416 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 pJP3416_GA7-ModB は、*Agrobacterium tumefaciens* AGL1 株を用いたアグロバクテリウム法によりキャノーラ品種 AV Jade 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

遺伝子名	由来及び機能
T-DNA right border	<i>A. tumefaciens</i> の Ti プラスミド由来。遺伝子導入に必要な配列。
Lack1-Δ12D 発現カセット	
PRO_Linus-Cnl1	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin1 由来のプロモーター。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
Lack1-Δ12d 遺伝子	<i>Lachancea kluyveri</i> 由来の Δ12-不飽和化酵素遺伝子のコード配列。長鎖 ω3 脂肪酸合成の第一段階である、オレイン酸の Δ12 の位置に二重結合を導入し、リノール酸を生成する反応を触媒する Lack1-Δ12D を産生する
TER_Linus-Cnl1	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin1 由来のターミネーター。
Picpa-ω3D 発現カセット	
TER_Linus-Cnl1	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin1 由来のターミネーター。
Picpa-ω3d 遺伝子	<i>Pichia pastoris</i> 由来の Δ15-ω3-不飽和化酵素遺伝子のコード配列。リノール酸の Δ15 の位置に二重結合を導入し、α-リノレン酸を生成する反応を触媒する Picpa-ω3D を産生する。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
PRO_Linus-Cnl1	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin1 由来のプロモーター。
Micpu-Δ6D 発現カセット	
TER_Linus-Cnl2	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin2 由来のターミネーター。
Micpu-Δ6d 遺伝子	<i>Micromonas pusilla</i> 由来の Δ6-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列。α-リノレン酸の Δ6 の位置に二重結合を導入し、ステア

	リドン酸を生成する反応を触媒する Micpu- $\Delta 6D$ を産生する。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
PRO_Linus-Cnl2	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin2 由来のプロモーター。
Pyrco- $\Delta 6E$ 発現カセット	
PRO_Arath-FAE1	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のプロモーター。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
<i>Pyrco-$\Delta 6e$</i> 遺伝子	<i>Pyramimonas cordata</i> 由来の $\Delta 6$ -脂肪酸伸長酵素遺伝子のコード配列。ステアリドン酸の炭素鎖に炭素原子 2 個を加え、エイコサテトラエン酸を生成する反応を触媒する Pyrco- $\Delta 6E$ を産生する。
TER_Glyma-Lectin	<i>Glycine max</i> lectin 由来のターミネーター。
Pavsa- $\Delta 5D$ 発現カセット	
PRO_Brana-FP1	<i>Brassica napus</i> napin 由来のプロモーター。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
<i>Pavsa-$\Delta 5d$</i> 遺伝子	<i>Pavlova salina</i> 由来の $\Delta 5$ -不飽和化酵素遺伝子のコード配列。エイコサテトラエン酸の $\Delta 5$ の位置に二重結合を導入し、エイコサペンタエン酸を生成する反応を触媒する Pavsa- $\Delta 5D$ を産生する。
TER_Agrtu-NOS	<i>Agrobacterium tumerfaciens</i> nopaline synthase 由来のターミネーター。
Pyrco- $\Delta 5E$ 発現カセット	
PRO_Arath-FAE1	<i>Arabidopsis thaliana</i> fatty acid elongase1 由来のプロモーター。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。
<i>Pyrco-$\Delta 5e$</i> 遺伝子	<i>Pyramimonas cordata</i> 由来の $\Delta 5$ -脂肪酸伸長酵素遺伝子のコード配列。エイコサペンタエン酸の炭素鎖に炭素原子 2 個を加えて、ドコサペンタエン酸を生成する反応を触媒する Pyrco- $\Delta 5E$ を産生する。
TER_Glyma-Lectin	<i>Glycine max</i> lectin 由来のターミネーター。
Pavsa- $\Delta 4D$ 発現カセット	
PRO_Linus-Cnl2	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin2 由来のプロモーター。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	Tobacco mosaic virus 59 由来のエンハンサー。

<i>Pavsa-Δ4d</i> 遺伝子	<i>Pavlova salina</i> 由来の Δ4-不飽和化酵素遺伝子のコード配列。ドコサペンタエン酸の Δ4 の位置に二重結合を導入し、ドコサヘキサエン酸を生成する反応を触媒する <i>Pavsa-Δ4D</i> を産生する。
TER_Linus-Cnl2	<i>Linum usitatissimum</i> conlinin2 由来のターミネーター。
PAT 発現カセット	
PRO_35S×2	cauliflower mosaic virus gene encoding the 35S RNA 由来のプロモーター。
<i>pat</i> 遺伝子	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> 由来のホスフィノトリシン N-アセチル基転移酵素遺伝子。PATたん白質を産生し、植物体に除草剤耐性を付与する。PAT たん白質は L-グルホシネートが無毒化することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。
TER_Agrtu-NOS	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> nopaline synthase 由来のターミネーター。
T-DNA left border	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> の Ti プラスミド由来。遺伝子導入に必要な配列。

② 安全性に関する事項

- 250 ・ *Lack1-Δ12d* 遺伝子の供与体である *Lachancea kluyveri* は、チーズや発酵乳の生産に使用されている酵母の一種であり、人はこれらの食品を通して食経験を持つ (Spohner *et al.*, 2016) 。
- ・ *Picpa-ω3d* 遺伝子の供与体である *Pichia pastoris* は、既に市場化されているフィターゼ等の遺伝子組換え生産菌の宿主として用いられている実績がある。
- 255 ・ *Micpu-Δ6d* 遺伝子の供与体である *Micromonas pusilla* は、植物プランクトンとして海洋に分布している。
- ・ *Pyrco-Δ6e* と *Pyrco-Δ5e* 遺伝子の供与体である *Pyramimonas cordata* は、植物プランクトンとして海洋に生育している。
- 260 ・ *Pavsa-Δ5d* と *Pavsa-Δ4d* 遺伝子の供与体である *Pavlova salina* は、植物プランクトンとして海洋に生育し、軟体動物や牡蠣の餌料として使用されてきた。また、近縁の *Pavlova lutheri* は、カキやハマグリ の餌料として使用される (Ponis *et al.*, 2006、Brown *et al.*, 1997) 。
- なお、これらの微細藻類は、IOC-UNESCO の有害微細藻類のリストには登録されていない。
- 265 ・ *pat* 遺伝子の供与体である *Streptomyces viridochromogenes* は、放線菌であり、これまで多くの植物で、*S. viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入され、安全に利用されている実績がある。

270 以上全ての供与体に関して、PubMed データベース 14 を使用して、キーワード (Toxin、Toxic) を用いる場合と用いない場合で検索を行った (2011 年及び 2016 年 12 月) 結果、毒性への関与を示すものは確認されなかった。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

275 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。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

8 個の挿入遺伝子には、それぞれ、アマ、シロイヌナズナ、セイヨウナタネ、カリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターが使用されている。

280

② ターミネーターに関する事項

8 つの挿入遺伝子には、それぞれ、アマ、ダイズ、アグロバクテリウム由来のターミネーターが使用されている。

285

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 pJP3416 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。

(4) 性質に関する事項

290 各遺伝子産物について、潜在的リスクがないことを確認した結果、これらの遺伝子産物が毒性たん白質である可能性は確認されなかった。各遺伝子の機能は表 1 に示したとおり。

(5) 純度に関する事項

295 ベクター pJP3416_GA7-ModB 構築過程において、使用された遺伝子 DNA や遺伝要素はすべて純化されている。また、目的以外の遺伝子の混入がないことを、アグロバクテリウム法による形質転換を行う前に、pJP3416_GA7-ModB の配列をシーケンス解析により確認した。

300

(6) 安定性に関する事項

NS-B50027-4 に挿入された遺伝子の安定性を、サザンブロット解析及びゲノム DNA との境界領域を増幅する PCR 増幅系を用いて調べた。その結果、挿入遺伝子が安定して後代に受け継がれていることが確認された。

305 (7) コピー数に関する事項

NGS を用いたシーケンス解析により、NS-B50027-4 のゲノム中には、1 つの染色体に一部欠損をもつ 1 コピーの T-DNA 領域が、別の 1 つの染色体に完全長の T-DNA 領域が 1 コピー及び複数の T-DNA 領域の断片がそれぞれ存在していることが確認された。

310 また、NGS において得られたリードにはベクター pJP3416_GA7-ModB 外側骨格領域と相同性をもつものは認められなかったことから、外側骨格領域が挿入されてい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

315 DHA 合成に関わる 7 種類の導入たん白質の発現は、成熟種子及び未熟種子においてのみ検出され、その他の組織では、収穫時期や試験地にかかわらず検出されなかった。いずれの発現たん白質においても、成熟種子よりも未熟種子における発現量が高い傾向にあった。

320 PAT たん白質の発現は、すべての組織及び栽培期間において検出された。種子では、成熟種子において未熟種子より高い発現量を確認した。全体としては花において最も高い発現量を確認した。

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

325 ベクター pJP3416 は外側骨格領域にカナマイシン耐性マーカー *nptIII* 遺伝子を有しているが、これは挿入を意図する領域に含まれておらず、実際に、NS-B50027-4 のゲノムには外側骨格領域が含まれていないことが NGS 解析によって確認されている。

330 (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

NS-B50027-4 に挿入された DNA 配列及びその境界領域で、6 つの読み枠において 8 アミノ酸残基以上の ORF を検索した。その結果、挿入 T-DNA 内では COMPARE 2023 データベース中の配列と 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す配列は検出されなかった。また、境界領域では 38 個の ORF が確認されたが、
335 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。

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

340 DHA 合成に関わる遺伝子が合計 7 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、除草剤耐性 (*pat*) 遺伝子が導入されているため、除草剤グル
ホシネート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

345 NS-B50027-4 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

350 8 個の挿入遺伝子により発現するたん白質に対し、消化性試験 (ペプシン消化
(人工胃液を模した) 試験及びペプシン・トリプシン二重消化試験の組合せ) 及び
加熱処理に対する感受性試験を実施した。その結果、消化性試験において、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、95℃の熱処理に対しても、
安定性を持たないことが示された。一般に、キャノーラ種子から油を製造する工程
355 では、原材料温度は 80℃~105℃に達するため最終製品に活性を維持した状態のた
ん白質が存在することはないと考えられる。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

360 NS-B50027-4 には 7 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
(OA) は減少、リノール酸 (LA) は約半分に減少、 α -リノレン酸 (ALA) は約 2
倍に増加、DHA においては顕著な増加 (0.239%から 8.38%へ) が確認された。
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、アマニ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
脂肪酸の組成は、従来のキャノーラ油の範囲内であり、新規に導入された脂肪酸の
365 組成においても、魚油、アマニ油の範囲内にあったため、NS-B50027-4 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。また、PAT たん白質は極
めて高い基質特異性を有しており、宿主代謝系への影響は考えにくい。

(5) 宿主との差異に関する事項

370 NS-B50027-4 には DHA 合成に関わる 7 種類の遺伝子が導入されたことにより、
DHA は宿主 (0.239%) や参考品種 (0.130%) と比べて 8.376%と大幅に増加、
前駆体及び中間体脂肪酸に当たるオレイン酸はわずかに減少、リノール酸は約半
分に減少、 α -リノレン酸が約 2 倍に増加、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
375 はわずかであり、家畜の健康に悪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。その他の脂肪酸についても宿主との統計学的有意差が見られたものがあつたが、参考品種や文献値の範囲内であつた。

380

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、参考品種及び文献値の範囲内であつた。また、グルコナポレイフェリン及びネオグルコブラシシンについては、定量下限（LOQ）以下だった。エルシン酸については、分析の結果定量下限（LOQ）以下であつた。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）。

385

その他、灰分、炭水化物、無機物、ビタミン類、アミノ酸、フィトステロール類において、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囲は、参考品種や文献値の範囲内にあり、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。

390

（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、NS-B50027-4 と非組換えキャノーラとの間に、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。

395

（7）生存及び増殖能力の制限に関する事項

NS-B50027-4 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。

（8）不活化法に関する事項

400

NS-B50027-4 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。

（9）外国における認可等に関する事項

405

表 2 諸外国における認可状況

申請国	飼料	食品	環境
オーストラリア	OGTR 承認 (2018 年 2 月)	FSANZ 承認 (2017 年 12 月)	OGTR 承認 (2018 年 2 月)
米国	FDA 申請中	FDA 申請中	USDA 承認 (2018 年 8 月)
カナダ	CFIA 承認	HC 評価済	CFIA 承認

	(2020 年 7 月)	(2020 年 7 月)	(2020 年 7 月)
--	--------------	--------------	--------------

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

NS-B50027-4 には *pat* 遺伝子が導入されているため、除草剤グルホシネートを使用出来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。

410

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

従来のキャノーラ品種と相違はない。

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

415

IV 審議結果

DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ (NS-B50027-4) 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。

420

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Ahmad, M, Hirz, M, Pichler, H, Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *App Microbiol Biotechnol* 98: 5301-5317.

425

2. 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.

430

3. Arondel, V, Lemieux, B, Hwang, I, Gibson, S, Goodman, HM, Somerville, CR. (1992) Mapbased cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* 258: 1353-1355.

435

4. Belide S, Zhou XR, Kennedy Y, Lester G, Shrestha P, Petrie JR, Singh SP. (2013) Rapid expression and validation of seed-specific constructs in transgenic LEC2 induced somatic embryos of *Brassica napus*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 113:543-553.

440

5. Bhalla PL, Singh MB. (2008) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Nature Protocols* 3:181-189.

- 445 6. Brown, MR, Jeffrey, SW, Volkman, JK, Dunstan, GA. (1997) Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture* 151: 315-331
7. Chalhoub B, Denoeud F, Liu S, Parkin IAP, Tang H, Wang X, Chiquet J, Belcram H et al. (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345: 950-953.
- 450 8. Chaudhary S, Van Rooijen G, Moloney M, Singh S. (2001) Flax seed specific promoters. International Patent Application WO 2001/16340.
9. Cho HP, Nakamura MT, Clarke SD. (1999) Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Δ -6 desaturase. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 471-477.
- 455 10. Cho MJ, Widholm JM, Vodkin LO. (1995) Cassettes for seed-specific expression tested in transformed embryogenic cultures of soybean. *Plant Mol Biol Reporter* 13:255-269.
- 460 11. Codex Alimentarius Commission. (2003) Alinorm 03/34. Joint FAO/WHO Food Standard Programme, Codex Alimentarius Commission, Twenty-Fifth Session, Rome Italy 30 June-5 July, 2003. Appendix III, Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant-DNA plants and Appendix IV, Annex on the assessment of possible allergenicity, pp 47-60.
- 465 12. Colgrave, ML, Goswami, H, Blundell, M, Howitt, CA, Tanner, GJ. (2014) Using mass spectrometry to detect hydrolysed gluten in beer that is responsible for false negatives by ELISA. *J Chromat A* 1370:105-114.
- 470 13. Coutu C, Brandle J, Brown D, Brown K, Miki B, Simmonds J, Hegedus D. (2007) pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Res* 16:771-781.
- 475 14. 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.
- 480 15. Domergue, F, Lerchi, J, Zähringer, U, Heinz, E. (2002) Cloning and functional characterization of *Phaeodactylum tricornutum* front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* 269:4105-4113.
16. Domergue, F, Spiekermann, P, Lerchl, J, Beckmann, C, Kilian, O, Kroth, PG, Boland, W, Zähringer, U, Heinz, E. (2003) New insight into *Phaeodactylum tricornutum* fatty acid metabolism. Cloning and functional characterization of plastidial and microsomal Δ 12 fatty acid desaturases.

Plant Physiology 131:1648-1660.

485

17. Domergue, F, Abbadi, A, Zahringer, U, Moreau, H, Heinz, E. (2005) In vivo characterization of the first acyl-CoA Delta6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochem J* 389: 483-490.

490

18. Dröge W, Broer I, Pühler A. (1992) Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide L-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta* 187:142-151.

495

19. EFSA (2008) Glucosinolates as undesirable substances in animal feed. Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 590: 1-76.

500

20. Eiamsa-ard, P, Kanjana-Opas, A, Cahoon, EB, Chodok, P, Kaewsuwan, S. (2013) Two novel *Physcomitrella patens* fatty acid elongases (ELOs) : identification and functional characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 97: 3485-3497.

505

21. Gallie DR, Sleat DE, Watts JW, Turner PC, Wilson TMA. (1987) A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic Acids Res* 15:8693-8711.

510

22. Gillette, MA and Carr, SA. (2013) Quantitative analysis of peptides and proteins in biomedicine by targeted mass spectrometry. *Nature Methods* 10:28-34.

23. Girke, T, Schmidt, H, Zahringer, U, Reski, R, Heinz, E. (1998) Identification of a novel $\Delta 6$ -acylgroup desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens*. *Plant Journal* 15: 3948.

515

24. Hall G, Allen GC, Loer DS, Thompson WF, Spiker S. (1991) Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9320-9324.

25. Halweg C, Thompson WF, Spiker S. (2005) The Rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study. *Plant Cell* 17:418-429.

520

26. Hastings, N, Agaba, M, Tocher, DR, Leaver, MJ, Dick, JR, Sargent, JR, Teale, AJ. (2001) A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14304-14309

525

27. Hérouet, C, Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E, Schulz, A, Currier, T, Hendrickx, K, van der Klis, R-J, Rouan, D. (2005) Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41:134-149.

- 530 28. Huang, YS, Chaudhary, S, Thurmond, JM, Bobik, EG, Jr., Yuan, L, Chan, GM, Kirchner, SJ, Mukerji, P, Knutzon, DS. (1999) Cloning of delta12- and delta6-desaturases from *Mortierella alpina* and recombinant production of gamma-linolenic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Lipids* 34: 649-659.
- 535 29. Ishida, M., Hara, M., Fukino, N., Kakizaki, T., Morimitsu, Y. (2014) Glucosinolate metabolism, functionality and breeding for the improvement of Brassicaceae vegetables. *Breeding Science* 48-59.
- 540 30. Kaewsuwan, S, Cahoon, EB, Perroud, PF, Wiwat, C, Panvisavas, N, Quatrano, RS, Cove, DJ, Bunyaphrathasara, N. (2006) Identification and functional characterization of the moss *Physcomitrella patens* Δ -desaturase gene involved in arachidonic and eicosapentaenoic acid biosynthesis. *J Biol Chem* 281: 21988-21997
- 545 31. Kajikawa M, Yamato KT, Kohzu Y, Nojiri M, Sakuradani E, Shimizu S, Sakai Y, Fukuzawa H, Ohyama K. (2004) Isolation and characterization of D6-desaturase, an ELO-like enzyme and D5-desaturase from the liverwort *Marchantia polymorpha* and production of arachidonic and eicosapentaenoic acids in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant Molecular Biology* 54: 335-352,
- 550 32. Kajikawa, M, Yamato, KT, Sakai, Y, Fukuzawa, H, Ohyama, K, Kohchi, T. (2006) Isolation and functional characterization of fatty acid Δ 5-elongase gene from the liverwort *Marchantia polymorpha* L. *FEBS Lett* 580: 149-154.
- 555 33. Kay R, Chan A, Daly M, McPherson J. (1987) Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236:1299-1302.
34. Lazo GR, Stein PA, Ludwig RA. (1991) A DNA transformation competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* 9:963-967.
- 560 35. Leonard, AE, Bobik, EG, Dorado, J, Kroeger, PE, Chuang, L-T, Thurmond, JM, Parker-Barnes, JM, Das, T, Huang, Y-S, Mukerji, P. (2000a) Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Biochem J* 350: 765-770.
- 565 36. Leonard, AE, Kelder, B, Bobik, EG, Chuang, L-T, Parker-Barnes, JM, Thurmond, JM, Kroger, PE, Kopchick, JJ, Huang, Y-S, Mukerji, P. (2000b) cDNA cloning and characterization of human Δ 5-desaturase involved in the biosynthesis of arachidonic acid. *Biochem J* 347: 719-724.
37. Leonard, AE, Pereira, SL, Sprecher, H, Huang, YS. (2004) Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43: 36-54.

- 570 38. Liu, H, Guo, Z, Zheng, H, Wang, S, Wang, Y, Liu, W, Zhang, G. (2014) Functional characterization of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase and its expression during early embryogenesis in the noble scallop *Chlamys nobilis* Reeve. *Mol Biol Rep* 41: 7437-7445.
- 575 39. Liu S, Liu Y, Yang X, Tong C, Edwards D, Parkin IAP, Zhao M, Ma J et al. (2014) The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Comm* 5:3930.
40. Livore, VI, Tripodi, KEJ, Uttaro, AD. (2007) Elongation of polyunsaturated fatty acids in trypanosomatids. *FEBS J* 274: 264-274.
- 580 41. 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.
- 585 42. Matsuda, T, Sakaguchi, K, Hamaguchi, R, Kobayashi, T, Abe, E, Hama, Y, Hayashi, M, Honda, D, Okita, Y, Sugimoto, S, Okino, N, Ito, M. (2012) Analysis of $\Delta 12$ -fatty acid desaturase function revealed that two distinct pathways are active for the synthesis of PUFAs in *T. aureum* ATCC 34304. *The Journal of Lipid Research* 53:1210-1222.
- 590 43. Matsui, H, Fujiwara, M, Hamada, S, Shimamoto, K, Nomura, Y, Nakagami, H, Takahashi, A, Hirochika, H. (2014) Plasma membrane localization is essential for *Oryza sativa* Pto-interacting protein 1a-mediated negative regulation of immune signaling in rice. *Plant Physiol* 166: 327-336.
- 595 44. Meesapyodsuk, D, Qiu, X. (2016) Biosynthetic mechanism of very long chain polyunsaturated fatty acids in *Thraustochytrium* sp. 26185. *The Journal of Lipid Research* DOI:10.1194/jlr.M070136.
- 600 45. Meyer, A, Kirsch, H, Domergue, F, Abbadi, A, Sperling, P, Bauer, J, Cirpus, P, Zank, TK, Moreau, H, Roscoe, TJ, Zahringer, U, Heinz, E. (2004) Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* 45: 1899-1909.
- 605 46. Michaelson, LV, Lazarus, CM, Griffiths, G, Napier, JA, Stobart, AK. (1998) Isolation of a $\Delta 5$ -fatty acid desaturase gene from *Mortierella alpina*. *J Biol Chem* 273: 19055-19059.
47. Monroig, Ó, Navarro, JC, Dick, JR, Alemany, F, Tocher, DR. (2012) Identification of a $\Delta 5$ -like fatty acyl desaturase from the cephalopod *Octopus vulgaris* (Cuvier 1797) involved in the biosynthesis of essential fatty acids. *Mar Biotechnol* 14: 411-422.
48. Napier, JA, Hey, SJ, Lacey, DJ, Shewry, PR. (1998) Identification of a *Caenorhabditis elegans* $\Delta 6$ -fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*

- 610 Journal 330 (Pt 2) : 611-614.
49. Nichols PD, Petrie J, Singh S. (2010) Long-chain omega-3 oils - An update on sustainable sources. *Nutrients*, 2, 572-585
- 615 50. OECD (1997) Consensus Document on the biology of *Brassica napus* L.(oilseed rape). Series on Harmonization of Regulatory Oversight in Biotechnology No.7. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- 620 51. OECD (1999) 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.
- 625 52. OECD (2011) Revised consensus document on compositional considerations for new varieties 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
- 630 53. OECD (2012) Consensus document on the biology of the Brassica crops (*Brassica* spp.). Series on harmonisation of regulatory oversight in biotechnology No.54. OECD Environment, Health and Safety Publications.
54. OGTR (2008) The biology and ecology of canola (*Brassica napus*). Australian Government, Office of the Gene Technology Regulator, Canberra, ACT, Australia.
- 635 55. OGTR (2017) The biology of *Brassica napus* L. (Canola) and *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard). Version 2.1. Office of the Gene Technology Regulator. Department of Health, Australian Government.
- 640 56. Okuley, J, Lightner, J, Feldmann, K, Yadav, N, Lark, E, Browse, J. (1994) Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6:147-158.
- 645 57. Parker-Barnes, JM, Das, T, Bobik, E, Leonard, AE, Thurmond, JM, Chaung, LT, Huang, YS, Mukerji, P. (2000) Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8284-8289
58. Pereira, SL, Huang, Y-S, Bobik, EG, Kinney, AJ, Stecca, KL, Packer, JCL, Mukerji, P. (2004) A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid. *Biochemistry Journal* 378: 665-671.
- 650 59. Petrie, JR, Liu, Q, Mackenzie, AM, Shrestha, P, Mansour, MP, Robert, SS, Frampton, DF, Blackburn, SI, Nichols, PD, Singh, SP. (2010a) Isolation and characterisation of a high-efficiency

desaturase and elongases from microalgae for transgenic LC-PUFA production. *Mar Biotechnol* 12:430-438.

- 655 60. Petrie JR, Shrestha P, Mansour MP, Nichols PD, Liu Q, Singh SP. (2010b) Metabolic engineering of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in plants using an acyl-CoA $\Delta 6$ -desaturase with $\omega 3$ -preference from the marine microalga *Micromonas pusilla*. *Metabolic Engineering* 12:233-240.
- 660 61. Petrie JR, Shrestha P, Zhou X, Mansour MP, Liu Q, Belide S, Nichols PD, Singh SP. (2012) Metabolic Engineering Plant Seeds with Fish Oil-Like Levels of DHA. *PLOS ONE* 7(11): e49165.
- 665 62. Peyou-Ndi, M.M., Watts, J.L., Browse, J. (2000) Identification and characterization of an animal $\Delta 12$ fatty acid desaturase gene by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 376:399-408.
63. Ponis E, Probert I, Véron B, Le Coz J-R, Mathieu M, Robert R (2006) Nutritional value of six Pavlovophyceae for *Crassostrea gigas* and *Pecten maximus* larvae. *Aquaculture* 254:544–553
- 670 64. Rauh, M. (2012) LC–MS/MS for protein and peptide quantification in clinical chemistry. *J Chromat B* 883–884:59-67
- 675 65. Reddy, AS, Nuccio, ML, Gross, LM, Thomas, TL. 1993. Isolation of a $\Delta 6$ -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *Plant Mol Biol* 22: 293-300.
- 680 66. Robert, SS, Singh, SP, Zhou, X-R, Blackburn, SI, Mansour, PM, Nichols, PD, Liu, Q, Green, AG. (2005) Metabolic engineering of *Arabidopsis* to produce nutritionally important DHA in seed oil. *Func Plant Biol* 32:473-479.
- 685 67. Rossak M, Smith M, Kunst L. (2001) Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 46:717-25.
- 68 68. Saito, T, Morio, T, Ochiai, H. (2000) A second functional delta5 fatty acid desaturase in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem* 267: 1813-1818.
- 690 69. Sakamoto, T, Los, DA, Higashi, S, Wada, H, Nishida, I, Ohmori, M, Murata, N. (1994) Cloning of omega 3 desaturase from cyanobacteria and its use in altering the degree of membranelipid unsaturation. *Plant Molecular Biology* 26: 249-263.
70. Sakuradani, E, Kobayashi, M, Ashikari, T, Shimizu, S. (1999) Identification of delta12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *European Journal of*

695

71. Sanders PR, Winter JA, Bamason AR, Rogers SG, Fraley RT. (1987) Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res* 15:1543-1558.

700

72. Sayanova, O, Smith, MA, Lapinskas, P, Stobart, AK, Dobson, G, Christie, WW, Shewry, PR, Napier, JA. (1997) Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta-6 desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 94: 4211-4216

705

73. Sayanova, O, Haslam, R, Guschina, I, Lloyd, D, Christie, W.W., Harwood, J.L., Napier, J.A. (2006) A bifunctional $\Delta 12$, $\Delta 15$ -desaturase from *Acanthamoeba castellanii* directs the synthesis of highly unusual n-1 series unsaturated fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 281:36533-36541.

710

74. Smith CA and Thomas CM (1984) Nucleotide sequence of the trfA gene of broad host-range plasmid RK2. *J Mol Biol.* 175:251-62.

75. Spohner, SC, Schaum, V, Quitmann, H, Czermak, P. (2016) *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol* 222:104-116.

715

76. Sychalla, JP, Kinney, AJ, Browse, J. (1997) Identification of an animal ω -3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 1142-1147.

720

77. Stalberg K, Ellerström M, Josefsson L, Rask L. (1993) Deletion analysis of a 2S seed storage protein promoter of *Brassica napus* in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol* 23:671-683.

725

78. Tanomman, S, Ketudat-Cairns, M, Jangprai, A, Boonanuntanasarn, S. (2013) Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* 166: 148-156.

730

79. Thompson, C.J., Movva, N.R., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M. and Botterman, J. (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6:2519-2523.

80. Umezawa Y, Yagisawa M, Sawa T, Takeuchi T, Umezawa H. (1975) Aminoglycoside 3'-phosphotransferase III, a new phosphotransferase. *Resistance mechanism. J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Nov;28(11):845-53.

735

81. Vagner, M, Santigosa, E. (2011) Characterization and modulation of gene expression and

enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review. *Aquaculture* 315: 131-143.

740

82. 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.

745

83. Venegas-Calcrón, M, Beaudoin, F, Sayanova, O, Napier, JA. (2007) Co-transcribed genes for long chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in the protozoon *Perkinsus marinus* include a plant-like FAE1 3-ketoacyl coenzyme A synthase. *J Biol Chem* 282: 2996-3003

750

84. Vodkin LO, Rhodes PR, Goldberg RB. (1983) cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell* 34 (3):1023-1031.

85. Wang X, Wang H, Wang J, Sun F, Wu J, Liu S, Bai Y, Mun JH et al. (2011) The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nature Genetics* 43:1035-1039.

755

86. Wehrmann, A., Van Vliet, A., Opsomer, C., Botterman, J., Schulz, A., (1996) The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotech* 14, 1274-1278.

760

87. Wisniewski, JR, Zougman, A, Nagaraj, N, Mann, M. (2009) Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nature Meth* 6: 359-363.

88. 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.

765

89. Zank, TK, Zahringer, U, Beckmann, C, Pohnert, G, Boland, W, Holtorf, H, Reski, R, Lerchl, J, Heinz, E. (2002) Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of Delta6-polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 31: 255-268.

770

90. Zhang X, Li M, Wei D, Zing L. (2008) Identification and characterization of a novel yeast ω 3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. *Yeast* 25:21-27.

775

91. Zhou, J, Loh, Y-T, Bressan, RA, Martin, GB. (1995) The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83: 925-935.

92. Zhou XR, Robert SS, Petrie JR, Frampton DMF, Mansour PM, Blackburn SI, Nichols PD, Green AG, Singh SP. (2007) Isolation and characterization of genes from *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 68:785-796. DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.12.016.

- 780 93. Zhou, XR, Horne, I, Damcevski, K, Haritos, V, Green, A, Singh, S. (2008) Isolation and functional characterization of two independently-evolved fatty acid Delta 12-desaturase genes from insects. *Insect Mol Biol* 17:667-676.
- 785 94. 青木康浩、大下友子、根本英子、上田靖子、青木真理 (2014) 国産ダブルロー ナタネ (*Brassica napus* L.) 品種由来搾油かすの飼料特性および泌乳牛に対する給与効果 日草誌 60 (3) : 178-185.
95. 佐藤幹、石黒瑛、石橋晃 (2013) 飼料学 (102) -VII 飼料用油脂-14. 油脂の使用制限に伴う安全性管理畜産の研究 第 67 巻 第 9 号 p.917-922
- 790 96. 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
97. 植物育種学辞典 (2005) 日本育種学会編 培風館 pp.163
- 795 98. 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*) の生物情報収集 農環研報 36 : 1-45.
- 800 99. 中井秀樹 (2003) アブラナ科, 日本の帰化植物, 清水健美 (編) . 平凡社, p.80-96.
100. 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.
- 805 101. 農学大事典 (2004) 山崎耕宇、久保祐雄、西尾敏彦、石原邦 監修; 養賢堂
102. 農業技術大系 (1996) ナタネ作物編 7 トウモロコシ、オカボ、ナタネ、ソバ・アワ、ヒエ・キビ 農山漁村文化協会
- 810 103. 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.affrc.maff.go.jp/docs/press/pdf/090304_1-01.pdf) (2019 年 7 月アクセス)
104. 農林水産省 (2018) 「平成 28 年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果 (<http://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-134.pdf>) (2019 年 7 月アクセス)
- 815 105. 畑作全書 (1981) 雑穀編—基礎生理と応用技術— 農山漁村文化協会
106. 宮道慎二 (2012) 「不思議な微生物、放線菌」 生物学 第 90 巻 pp32-36.

1. DHA History and Utilization (No. 2016-023) & Intended Markets for Omega 3 DHA Canola, Event NS-B50027-4 Version 2 (No.2016-024)
2. Bioinformatics Analysis of the Potential Allergenicity, Toxicity and Anti-nutritional Properties of Proteins Encoded by Genes Inserted in Canola (*Brassica napus*) for Production of Omega 3 Fatty Acids (No.BNDHA-2018-011Rev.1)
3. SEQUENCE CHARACTERIZATION OF DHA CANOLA EVENT NS-B50027-4 (BNDHA-2022-013) (社外秘)
4. Bioinformatics Analysis of Putative Open Reading Frames (ORF) in DHA canola event, (OECD Unique Identifier NS-B50027-4): Sequence homology search with known allergens and toxins (BNDHA-2023-008)
5. Protein expression of DHA biosynthesis pathway enzymes in DHA canola (No.BNDHA-2018-005 Rev.1)
6. Protein Stability of *Lachancea kluyveri* $\Delta 12$ -Desaturase (No.BNDHA-2018-001)
7. Protein Stability of *Pichia pastoris* $\omega 3$ -/ $\Delta 15$ -Desaturase (No.2016-012)
8. Protein Stability of *Micromonas pusilla* $\Delta 6$ -Desaturase (No.BNDHA-2018-002)
9. Protein Stability of *Pyramimonas cordata* $\Delta 6$ -Elongase (BNDHA-2018-003)
10. Protein Stability of *Pavlova salina* $\Delta 5$ -Desaturase (No.BNDHA-2018-004)
11. Protein stability of *Pyramimonas cordata* $\Delta 5$ -Elongase (No.2016-013)
12. Protein stability of *Pavlova salina* $\Delta 4$ -Desaturase (No.2016-014)
13. Thermal Stability of Enzymes Involved in DHA Biosynthesis Pathway in NS-B50027-4 (No.BNDHA-2018-007)
14. Source organisms of the genes isolated for DHA biosynthesis in canola (No. BNDHA-2018-006)
15. Characterisation of *Lachancea kluyveri* $\Delta 12$ -Desaturase (No.2016-005)
16. Characterisation of *Pichia pastoris* $\omega 3$ -Desaturase (No.2016-006)

17. Characterisation of *Micromonas pusilla* $\Delta 6$ -Desaturase (No.2016-007)
- 865 18. Characterisation of *Pyramimonas cordata* $\Delta 6$ -Elongase (No.2016-008)
19. Characterisation of *Pavlova salina* $\Delta 5$ -Desaturase (No.2016-009)
20. Characterisation of *Pyramimonas cordata* $\Delta 5$ -Elongase (No.2016-010)
- 870 21. Characterisation of *Pavlova salina* $\Delta 4$ -Desaturase (2016-011)
22. Nutrient Composition of Harvested Canola expressing Long-Chain Omega-3 Field-grown in Australia during 2015, Revised 3 (BNDHA-2016-021 Rev.2)
- 875 23. Detection method for DHA Canola, Elite Event NS-B50027-4 (OECD ID) (No.2016-003)