

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  
(D6E(Pp), D5D(Tc), D6D(Ot), D6E(Tp), D12D(Ps), O3D(Pir), O3D(Pi), D4D(Tc),  
D4D(Pl), D5E(Ot), AHAS(At), Brassica napus L.) (LBFLFK, OECD UI: BPS-BFLFK-2)  
申請書等の概要

第一種使用規程承認申請書

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

1.	宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	1
(1)	分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	1
①	和名、英名及び学名.....	1
②	宿主の品種又は系統名.....	1
③	国内及び国外の自然環境における自生地域.....	1
(2)	使用等の歴史及び現状.....	2
①	国内及び国外における第一種使用等の歴史.....	2
②	主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途.....	2
(3)	生理学的及び生態学的特性.....	3
イ	基本的特性.....	3
ロ	生息又は生育可能な環境の条件.....	3
ハ	捕食性又は寄生性.....	3
ニ	繁殖又は増殖の様式.....	3
①	種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命.....	3
②	栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性.....	4
③	自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度.....	4
④	花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命.....	6
ホ	病原性.....	6
へ	有害物質の産生性.....	6
ト	その他の情報.....	7
2.	遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報.....	8
(1)	供与核酸に関する情報.....	8
イ	構成及び構成要素の由来.....	8
ロ	構成要素の機能.....	15
①	目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能.....	15
②	目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨.....	15
③	宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容.....	23
(2)	ベクターに関する情報.....	32

イ 名称及び由来 .....	32
ロ 特性 .....	33
① ベクターの塩基数及び塩基配列 .....	33
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能 .....	33
③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合は、その宿主域に関する 情報 .....	33
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	34
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成 .....	34
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法 .....	34
ハ 遺伝子組換え生物等の育成経過 .....	34
① 核酸が移入された細胞の選抜手法 .....	34
② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌 体の残存の有無 .....	34
③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認し た系統、隔離ほ場試験に供した系統その他生物多様性影響評価に必要な情 報を収集するために用いられた系統までの育成の経過 .....	35
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性.....	37
① 移入された核酸の複製物が存在する場所 .....	37
② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数代 における伝達の安定性 .....	37
③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離 れているかの別 .....	40
④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間 及び世代間での発現の安定性 .....	40
⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に 伝達される恐れのある場合は、当該伝達性の有無及び程度 .....	44
(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性....	44
(6) 宿主又は宿主が属する分類学上の種との相違.....	44
① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特 性の具体的内容 .....	44
② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え作物と宿 主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程 度 .....	45
3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 .....	48
(1) 使用等の内容.....	48
(2) 使用等の方法.....	48
(3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集する方 法 .....	48
(4) 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止する ための措置.....	48
(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似した環境で の使用等の結果.....	49

(6) 国外での使用等に関する情報.....	49
第二 項目ごとの生物学的多様性影響の評価.....	50
1. 競合における優位性 .....	50
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定.....	50
(2) 影響の具体的内容の評価.....	51
(3) 影響の生じやすさの評価.....	51
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	51
2. 有害物質の産生性 .....	52
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定.....	52
(2) 影響の具体的内容の評価.....	55
(3) 影響の生じやすさの評価.....	56
(4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無等の判断.....	56
3. 交雑性.....	56
(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定.....	56
(2) 影響の具体的内容の評価.....	56
(3) 影響の生じやすさの評価.....	56
(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	56
4. その他の特性.....	57
第三 生物多様性影響の総合的評価.....	59
参考文献.....	61
別添資料の内容.....	72

緊急措置計画書

モニタリング報告書 社外秘情報につき非開示

# 第一種使用規程承認申請書

令和4年6月21日

農林水産大臣 金子 原二郎 殿  
環境大臣 山口 壯 殿

氏 名 BASF ジャパン株式会社  
申請者 代表取締役社長 石田博基 印  
住所 東京都中央区日本橋室町三丁目4番4号

第一種使用規程について承認を受けたいので、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律第4条第2項の規定により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダズリノン系除 草剤耐性セイヨウナタネ ( <i>D6E(Pp)</i> , <i>D5D(Tc)</i> , <i>D6D(Ot)</i> , <i>D6E(Tp)</i> , <i>D12D(Ps)</i> , <i>O3D(Pir)</i> , <i>O3D(Pi)</i> , <i>D4D(Tc)</i> , <i>D4D(Pl)</i> , <i>D5E(Ot)</i> , <i>AHAS(At)</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (LBFLFK, OECD UI: BPS-BFLFK-2)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、 保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	—

## 第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

### 1. 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

#### 5 (1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

##### ① 和名、英名及び学名

和名：セイヨウナタネ

10 英名：Oilseed rape

学名：*Brassica napus* L.

##### ② 宿主の品種又は系統名

15 遺伝子導入に用いた宿主は、セイヨウナタネのカノーラ品種 Kumily である(以下、「非組換えセイヨウナタネ」とする)。

##### ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

20 セイヨウナタネ (*B. napus*) の原産地は交雑親の*B. rapa*と*B. oleracea*の分布が重なる北ヨーロッパ又は地中海沿岸と考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる(OECD, 1997; OGTR, 2017)。セイヨウナタネは、肥培管理が行われなくても、道路沿いや空き地等で生育が可能であることが知られており、我が国でも北海道や本州で河原や線路沿いに群生が確認されている(清水ら, 2001)。また、ナタネの輸入港周辺で運搬時  
25 のこぼれ落ちが原因と考えられる生育が報告されている(独立行政法人 国立環境研究所, 2021; 農林水産省, 2021a)。しかし、セイヨウナタネは、自然環境下で優占する多年生草本と競合し自生化することは困難であることが知られている(OECD, 2012)。

我が国にはセイヨウナタネの近縁野生種は存在しない。しかしながら、我が国に分布する近縁種として、*B. rapa* (アブラナ)、*B. juncea* (カラシナ、タカナ、ザーツァイ等)、  
30 *B. nigra* (クロガラシ)、*Raphanus raphanistrum* (セイヨウノダイコン)、*Hirschfeldia incana* (ダイコンモドキ)、*Sinapis arvensis* (ノハラガラシ)、*B. tournefortii* (ハリゲナタネ)、*Eruca*

*vesicaria* (キバナスズシロ)、*Erucastrum gallicum* (オハツキガラシ) 及び *Sinapis alba* (シロガラシ) が挙げられる (OECD, 2012; OGTR, 2017; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2021a)。このうち *B. rapa* と *B. juncea* は、弥生時代に海外から導入された栽培種に由来すると考えられる (Nishizawa *et al.*, 2010)。これとは別に、戦後各地に広まった *B. juncea* は、  
5 雑草としてヨーロッパや北アメリカから入ったものと推測されている (中井, 2003)。他方、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana*、*S. arvensis*、*B. tournefortii*、*E. vesicaria*、*E. gallicum* 及び *S. alba* は、いずれも明治以降に帰化した外来種である (中井, 2003)。

## (2) 使用等の歴史及び現状

10

### ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

セイヨウナタネは、13世紀にヨーロッパにおいて栽培化が始まったとされている (OECD, 2011)。我が国においては、古くから *B. rapa* が栽培され、江戸時代には燈油や食  
15 用油の原料として大規模に栽培されていた。一方、セイヨウナタネは明治時代に米国やヨーロッパから輸入されて栽培されるようになり、*B. rapa* よりも耐病性に優れ、多収で油分含量も多いことから全国に広まり、*B. rapa* の栽培は少なくなっていく (杉山, 2001)。しかし、その後の我が国におけるセイヨウナタネの栽培は、イネ栽培の早期化による作期の重なりや農民の他業種への就労のため急速に衰退し、現在は搾油のために  
20 商業的に栽培されることはほとんどない (稲永, 2000)。

### ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

国連食糧農業機関 (FAO) によると、2020年における *Brassica* 属由来の油糧用種子の栽培面積の上位国は、カナダ約832万ha、インド約750万ha、中国約680万haである (FAO, 2022)。現在、我が国で栽培されているセイヨウナタネの作付面積は約1,640haであり、  
25 収穫量は約3,230tである (農林水産省, 2022b)。

セイヨウナタネには、休眠の打破、抽苔の開始及び花芽の分化に低温を必要とする秋播き品種と、それを必要としない春播き品種があり、カナダ等寒冷な地域では主に春播  
30 き品種が栽培され、ヨーロッパ等では主に秋播き品種が栽培されている (OECD, 2012)。

2019年における *Brassica* 属由来の油糧用種子の主な生産国は、カナダ (約1,948万t)、中国 (約1,400万t)、インド (約912万t) であった (FAO, 2022)。我が国には、2021年に油脂原料として約244万tのナタネ種子が輸入され、主な輸入先はカナダ (約232万t)、次いでオーストラリア (約12万t) であった (農林水産省, 2022c)。

セイヨウナタネ種子から搾油・精製された油は、食用、食品加工油脂及び工業用原料として利用されている。搾油後の油粕は飼肥料として用いられる (OECD, 2011)。

### (3) 生理学的及び生態学的特性

5

#### イ 基本的特性

セイヨウナタネは種子繁殖する一年生植物である。

#### 10 ロ 生息又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは一般的に冷涼な気候で栽培される。水分と土壌養分の量が適切であれば、広範な土壌条件に適応し、生育が可能である。最適温度は 20°C よりわずかに高く、12°C から 30°C の間でよく成長する。発芽後の植物は、開花までは比較的低温を好み、開花期の高温は成熟を早め、開花から種子成熟までの期間が短くなる (CFIA, 2012)。

#### ハ 捕食性又は寄生性

—

20

#### ニ 繁殖又は増殖の様式

##### ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

25 セイヨウナタネは成熟した1莢あたり平均15~25粒の種子ができ、成熟した種子は乾燥した莢の裂開により放出される (OGTR, 2017)。乾燥した莢は、わずかな物理的的刺激により裂開するため (OECD, 2012)、脱粒性は比較的高いと考えられる。

セイヨウナタネの種子は、一次休眠性を持たないが、生育上好ましくない条件下では二次休眠に入ることがある。その主要な要因は、暗条件、酸素欠乏及び乾燥によるスト



レスとされ、二次休眠は、連続光、低温 (2~4°C) あるいは高温と低温の繰り返しなどにより打破される (OGTR, 2017)。

セイヨウナタネの種子の寿命は、採種条件や保存条件によって異なる。完熟後に乾燥状態で冷蔵保存した場合には 25 年を経過しても発芽する (OECD, 2012)。しかしながら、  
5 収穫時に飛散し、地表に落ちた種子の多くは初めの 1 年を越えて生存することができない (OECD, 2012)。

② 栄養繁殖の様式並びに自然条件において植物体を再生しうる組織又は器官からの出芽特性

10

セイヨウナタネは種子繁殖を行い、自然条件下において他の器官からの繁殖はこれまでのところ報告がない。

③ 自殖性、他殖性の程度、自家不和合性の有無、近縁野生種との交雑性及びアポミクシスを生ずる特性を有する場合はその程度

15

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, 2012)。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, 2012)。また、花粉親と種子親の  
20 距離が 1m 以内の場合において、他殖率は0.0121%~14.5% (Beckie *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2003; Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007; Cai *et al.*, 2008) の範囲内であった。我が国の試験ほ場において *B. napus* を用いて他殖率を調査したところ、花粉親と種子親の距離が 0.25、1、5m と遠くなるにつれて、他殖率は4.09、1.35、0.43%と減少した (Yamamori, 2011)。

25

我が国に分布するセイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* が挙げられる (OECD, 2012; OGTR, 2017; 環境省, 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2021a)。

30 セイヨウナタネと *B. rapa* との交雑性について、セイヨウナタネのほ場の外側に *B. rapa* の一群を植えた場合のセイヨウナタネとの交雑率は0.4~1.5%であり、形成された雑種実生の生存率は2%未満であった (OGTR, 2017)。しかし、セイヨウナタネを種子親として、同一ほ場内に *B. rapa* と共に1:1で植えた場合の交雑率は9%であった (Jørgensen *et*

al., 1996)。また、F<sub>1</sub>個体の花粉稔性は平均で35%に低下し (Jørgensen *et al.*, 1996)、更に、F<sub>2</sub>及びBC世代での適応度についても、品種・集団間に差異があるものの、全体的に低くなるとの報告がある (Hauser *et al.*, 1998)。東北農業研究センターの試験ほ場において、セイヨウナタネの畝間にポット栽培の*B. rapa*の栽培品種55系統を配置し、得られた種子  
5 の倍数性をフローサイトメトリーにより調査した結果、*B. rapa*系統毎のセイヨウナタネとの自然交雑率は2~50%、平均で22.8%であった (Yamamori, 2011)。

セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性について、自然交雑率は3~4.7%であり、セイヨウナタネを種子親とする場合は更に低くなり、混植条件で1.1~1.3%となる (津田ら、  
10 2016; OGTR, 2017)。農業生物資源研究所の試験ほ場において、花粉源となる除草剤耐性セイヨウナタネを中央に配置し、周囲に *B. juncea* を栽植して自然交雑率を調査した結果、交雑率は混植地点では1.62%、隣接地点では0.306%、花粉源からの距離が1.0 m、5.0 m、10.0 m、20.0 m、27.5 mの地点では、それぞれ0.0499%、0.0369%、0.0396%、0.0000%、0.0000%であった (Tsuda *et al.*, 2012)。一方、交配による雑種生産性の平均は、  
15 セイヨウナタネが種子親の場合0.07個 (雑種数/交配花)、花粉親の場合4.05個という報告がある (津田ら, 2016)。雑種後代に関して、F<sub>1</sub>個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある (津田ら, 2016)。しかしながら、自然条件下では種々の生殖的隔離障壁が存在することを考慮すると雑種後代が優占化する可能性は低いと考えられる。

20

セイヨウナタネと*B. nigra*との交雑性について、自然交雑試験において雑種形成は確認されておらず (Bing *et al.*, 1996)、自然交雑の可能性は低いと判断される (OECD, 2012)。また、F<sub>1</sub>個体の稔性は低く、F<sub>2</sub>及びBC世代を得るのは難しいと報告されている (OECD, 2012)。

25

セイヨウナタネと*R. raphanistrum*との交雑性について、ほ場での調査においてセイヨウナタネを種子親とした場合の交雑率は $3.8 \times 10^{-8}$ ~ $5.1 \times 10^{-4}$ %、花粉親とした場合は $1 \times 10^{-7}$ ~ $3.1 \times 10^{-5}$ %という報告がある (Chèvre *et al.*, 2000; Rieger *et al.*, 2001; Warwick *et al.*, 2003)。また、F<sub>1</sub>個体では幼苗の発芽率や生存率、ロゼット葉の直径、乾物重などに顕著な低下  
30 が認められ、野外で発芽し生育して生殖にまで至る可能性は低いと考えられる (Guéritaine *et al.*, 2003)。

セイヨウナタネと*H. incana*との交雑性について、人工交配によって100花当たり3.1粒のF<sub>1</sub>種子が得られたものの、発芽率が1%未満であり、ほとんどのF<sub>1</sub>個体において低い  
35 適応度を示したと報告されている (OECD, 2012)。

セイヨウナタネと*S. arvensis*との交雑性について、自然交雑で雄性不稔セイヨウナタネ100花当たり0.18粒のF<sub>1</sub>種子が得られたが、多くは稔性が低い又は完全に不稔であったと報告されている (OECD, 2012)。

5

また、セイヨウナタネにはアポミクスの特性を有するという報告はない。

#### ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

10 セイヨウナタネは1花当たり約7~9万粒の花粉を生じる (Takahata *et al.*, 2008)。 *Brassica* 属の花粉は、重く粘性があるが小型 (約30~40 μm) であり、風によって運ばれる他、ミツバチなどの昆虫によっても媒介される (OECD, 2012)。セイヨウナタネの他殖率については、東北農業研究センターの試験ほ場において、エルシン酸含量を異にする2品種を用いて調査した結果、花粉源から風下方向に0.25 m、1 m、5 m、10 m、30 m、60 m離  
15 れた地点での他殖率は、それぞれ4.09%、1.35%、0.43%、0.15%、0.09%、0.01%と、花粉源から離れるに伴い急激に減少した (Yamamori, 2011)。また、OECD (2012) は従来の知見を総括し、他殖率は最大でも花粉源から50~100 mの地点で0.5%以下、200 mの地点で0.1%以下としている。

20 セイヨウナタネの花粉は、比較的長期間発芽力を有することが知られている。自然条件下では、花粉の寿命は 4~5 日間にわたり徐々に減少するとされる (Rantio-Lehtimäki, 1995)。

#### ホ 病原性

25

—

#### へ 有害物質の産生性

30 セイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸とグルコシノレートが含まれている。エルシン酸はラットの給餌実験において摂食と心臓病の発生数及び重篤度に相関する可能性があると報告されており、グルコシノレートは、甲状腺

肥大効果、肝臓及び腎臓障害を引き起こすことが報告されている (OGTR, 2017)。しかし、品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートの品種が育成された結果、種子は食用油として、また、搾油粕は飼料用として用いられるようになった (OECD, 2011)。なお、精油中のエルシン酸含量が 2%未満で、グルコシノレート含量が油粕 1 g 当たり 30  $\mu\text{mol}$  未満の品種は一般にカノーラ品種と呼ばれており (OECD, 2011)、宿主である Kumily もカノーラ品種の一つである。

ト その他の情報

## 2. 遺伝子組換え生物等の調整等に関する情報

### (1) 供与核酸に関する情報

- 5 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 (*D6E* (*Pp*), *D5D* (*Tc*), *D6D* (*Ot*), *D6E* (*Tp*), *D12D* (*Ps*), *O3D* (*Pir*), *O3D* (*Pi*), *D4D* (*Tc*), *D4D* (*Pl*), *D5E* (*Ot*), *AHAS* (*At*), *Brassica napus* L.) (LBFLFK, OECD UI: BPS-BFLFK-2) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」とする。) の作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来を表 1 に示した (別添資料 1)。

10

### イ 構成及び構成要素の由来

表 1 構成要素のサイズ、ベクター上の位置、由来及び機能

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA		
c- <i>D6E</i> ( <i>Pp</i> ) 発現カセット		
P- <i>USP</i> ( <i>Vf</i> )	509-1192 (684)	<i>Vicia faba</i> 由来の種子蛋白質遺伝子 <i>USP</i> (unkown seed protein) のプロモーター領域 (Bäumlein <i>et al.</i> , 1991)。
i- <i>At1g01170</i>	1,193-1,444 (252)	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の <i>At1g01170</i> 座の 5'UTR を含むイントロン (Nakabayashi <i>et al.</i> , 2005)。
Intervening sequence	1,445-1,446 (2)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>D6E</i> ( <i>Pp</i> )	1,447-2,319 (873)	<i>Physcomitrella patens</i> 由来の $\Delta$ -6 エロンガーゼ (GenBank Accession No: AF428243) (Zank <i>et al.</i> , 2000) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、 $\gamma$ -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- $\gamma$ -リノレン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
t- <i>CaMV35S</i>	2,320-2,535 (216)	カリフラワーモザイクウイルス由来の <i>CaMV35S</i> ターミネーター (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
c- <i>D5D</i> ( <i>Tc</i> )1 発現カセット		
p- <i>CNL</i> ( <i>Lu</i> )	2,628-3,691 (1064)	<i>Linum usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター (Truksa <i>et al.</i> , 2003)。
i- <i>At5g63190</i>	3,692-4,068 (377)	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At5g63190</i> 座の 5'UTR を含むイントロン (Sharma <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008)。
Intervening sequence	4,069-4,071 (3)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。

15

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
c-D5D(Tc)1	4,072-5,391 (1320)	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の $\Delta$ -5 デサチュラーゼ(GenBank Accession No: AF489588) (Qiu <i>et al.</i> , 2001) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、ジホモ- $\gamma$ -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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
t-OCS	5,392-5,583 (192)	<i>Rhizobium radiobacter</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のオクトピン合成遺伝子のターミネーター (MacDonald <i>et al.</i> , 1991)。
c-D6D(Ot) 発現カセット		
p-SBP(Vf)	5,719-7,517 (1799)	<i>V. faba</i> 由来のスクロース結合蛋白質関連遺伝子のプロモーター (Grimes <i>et al.</i> , 1992; Heim <i>et al.</i> , 2001)、種子成熟段階の後期に遺伝子を活性化させる。
i-At1g65090	7,518-7,972 (455)	<i>A. thaliana</i> 由来の At1g65090 座の 5'UTR を含むイントロン (Braybrook <i>et al.</i> , 2006)。
Intervening sequence	7,973-7,981 (9)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c-D6D(Ot)	7,982-9,352 (1371)	<i>Ostreococcus tauri</i> 由来の $\Delta$ -6 デサチュラーゼ(GenBank Accession No: AY746357) (Domergue <i>et al.</i> , 2005) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。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 $\gamma$ -リノレン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	9,353-9,379 (27)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t-CATHD(St)	9,380-9,614 (235)	<i>Solanum tuberosum</i> 由来のカテプシン D 阻害遺伝子のターミネーター (Hannapel, 1993)。
c-D6E(Tp) 発現カセット		
p-PXR(Lu)	9,693-11,419 (1727)	<i>L. usitatissimum</i> 由来のペルオキシレドキシシ様蛋白質の遺伝子である PXR の種子特異的プロモーター (Duwenig and Loyall, 2006)。
i-At1g62290	11,420-12,265 (846)	<i>A. thaliana</i> 由来の At1g62290 座の 5'UTR を含むイントロン (Chen <i>et al.</i> , 2002)。
Intervening sequence	12,266-12,278 (13)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c-D6E(Tp)	12,279-13,097 (819)	<i>Thalassiosira pseudonana</i> 由来の $\Delta$ -6 エロンガーゼ (GenBank Accession No: XM_002288445) (Armbrust <i>et al.</i> , 2004) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、 $\gamma$ -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- $\gamma$ -リノレン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	13,098-13,152 (55)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t-PXR(At)	13,153-13,552 (400)	<i>A. thaliana</i> 由来のペルオキシレドキシシ (PXR) 様蛋白質の遺伝子 PER1 のターミネーター (Haslekås <i>et al.</i> , 1998)。

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
<b>c-D12D(Ps) 発現カセット</b>		
p- <i>napA</i> (Bn)	13,722-14,385 (664)	<i>B. napus</i> 由来の種子貯蔵蛋白質ナピン A/B 遺伝子の種子特異的プロモーター (Ellerström <i>et al.</i> , 1996; Rask <i>et al.</i> , 1998)。
i- <i>At5g63190</i>	14,386-14,762 (377)	<i>A. thaliana</i> 由来の At5g63190 座の 5'UTR を含むイントロン (Sharma <i>et al.</i> , 2007; Wang <i>et al.</i> , 2008)。
Intervening sequence	14,763-14,768 (6)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>D12D</i> (Ps)	14,769-15,965 (1197)	<i>Phytophthora sojae</i> 由来の $\Delta$ -12 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: GY508423) (Cirpus and Bauer, 2006) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	15,966-15,983 (18)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t- <i>rbcS</i> (Ps)	15,984-16,541 (558)	<i>Pisum sativum</i> 由来の RuBisCO 小サブユニット遺伝子 ( <i>rbcS</i> ) E9 のターミネーター (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984; Smigocki, 1991)。
<b>c-O3D(Pir)1 発現カセット</b>		
p- <i>SETL</i> (Bn)	16,634-17,867 (1234)	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター (Bauer and Senger, 2010)。
Intervening sequence	17,868-17,869 (2)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>O3D</i> (Pir)1	17,870-18,961 (1092)	<i>Pythium irregulare</i> 由来の $\omega$ -3 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: FB753541) (Cheng <i>et al.</i> , 2010) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、アラキドン酸の $\omega$ (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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	18,962-18,982 (21)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t- <i>SETL</i> (Bn)	18,983-19,596 (614)	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子のターミネーター (Bauer and Senger, 2010)。
<b>c-O3D(Pi) 発現カセット</b>		
p- <i>USP</i> (Vf)	19,675-20,358 (684)	<i>V. faba</i> 由来の種子蛋白質遺伝子 <i>USP</i> のプロモーター (Bäumlein <i>et al.</i> , 1991)。
i- <i>At1g01170</i>	20,359-20,610 (252)	<i>A. thaliana</i> 由来の At1g01170 座の 5'UTR を含むイントロン (Nakabayashi <i>et al.</i> , 2005)。
Intervening sequence	20,611-20,620 (10)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>O3D</i> (Pi)	20,621-21,706 (1086)	<i>Phytophthora infestans</i> 由来の $\omega$ -3 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: XM_002902553) (Wu <i>et al.</i> , 2005) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、アラキドン酸の $\omega$ (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てエイコサペンタエン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	21,707-21,714 (8)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
t- <i>CaMV35S</i>	21,715-21,930 (216)	カリフラワーモザイクウイルス由来の <i>CaMV35S</i> ターミネーター (Hajdukiewicz <i>et al.</i> , 1994)。
c- <i>D5D(Tc)</i> 2 発現カセット		
p- <i>SETL(Bn)</i>	22,066-23,299 (1234)	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター (Bauer and Senger, 2010)。
Intervening sequence	23,300-23,301 (2)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>D5D(Tc)</i> 2	23,302-24,621 (1320)	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の $\Delta$ -5 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: AF489588) (Qiu <i>et al.</i> , 2001) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、ジホモ- $\gamma$ -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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	24,622-24,642 (21)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t- <i>SETL(Bn)</i>	24,643-25,256 (614)	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子のターミネーター (Bauer and Senger, 2010)。
c- <i>D4D(Tc)</i> 発現カセット		
p- <i>ARC5(Pv)</i>	25,403-26,553 (1151)	<i>Phaseolus vulgaris</i> 由来の種子特異的 <i>Arcelin-5</i> 遺伝子プロモーター (Goossens <i>et al.</i> , 1994; Goossens <i>et al.</i> , 1999)。
Intervening sequence	26,554-26,563 (10)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>D4D(Tc)</i>	26,564-28,123 (1560)	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の $\Delta$ -4 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: GN042654) (Qiu <i>et al.</i> , 2001) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、ドコサペンタエ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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	28,124-28,136 (13)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t- <i>ARC(Pv)</i>	28,137-28,736 (600)	<i>P. vulgaris</i> 由来の <i>Arc5</i> 遺伝子のターミネーター (Goossens <i>et al.</i> , 1994; Goossens <i>et al.</i> , 1999)。
c- <i>O3D(Pir)</i> 2 発現カセット		
p- <i>PXR(Lu)</i>	28,829-30,555 (1727)	<i>L. usitatissimum</i> 由来のペルオキシレドキシシン様蛋白質の遺伝子 <i>PXR</i> の種子特異的プロモーター (Duwenig and Loyall, 2006)。
i- <i>AGO4(At)</i>	30,556-31,313 (758)	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>AGO4(At)</i> 遺伝子の 5' UTR を含むイントロン (Zilberman <i>et al.</i> , 2003)。
Intervening sequence	31,314-31,328 (15)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c- <i>O3D(Pir)</i> 2	31,329-32,420 (1092)	<i>P. irregulare</i> 由来の $\omega$ -3 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: FB753541) (Cheng <i>et al.</i> , 2010) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、アラキドン酸の $\omega$ (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てエイコサペンタエン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。



構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
Intervening sequence	32,421-32,476 (56)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t-PXR( <i>At</i> )	32,477-32,876 (400)	<i>A. thaliana</i> 、ペルオキシレドキシシン (PXR) 様蛋白質の遺伝子 <i>PER1</i> の終結因子 (Haslekås <i>et al.</i> , 1998)。
c-D4D( <i>Pl</i> ) 発現カセット		
p-CNL( <i>Lu</i> )	33,012-34,075 (1064)	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター (Truksa <i>et al.</i> , 2003)。
i- <i>At1g65090</i>	34,076-34,530 (455)	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g65090</i> 座の 5'UTR を含むイントロン (Braybrook <i>et al.</i> , 2006)。
Intervening sequence	34,531-34,539 (9)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c-D4D( <i>Pl</i> )	34,540-35,877 (1338)	<i>Pavlova lutheri</i> 由来の $\Delta$ -4 デサチュラーゼ (GenBank Accession No: AY332747) (Tonon <i>et al.</i> , 2003) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。本酵素は、ドコサペンタエ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 (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	35,878-35,898 (21)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t-OCS	35,899-36,090 (192)	<i>R. radiobacter</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のオクトピン合成遺伝子のターミネーター (MacDonald <i>et al.</i> , 1991)。
c-D5E( <i>Ot</i> ) 発現カセット		
p- <i>FAE1</i> ( <i>Bn</i> )	36,284-37,713 (1430)	<i>B. napus</i> 由来のエロンガーゼ ( <i>FAE1.1</i> ) 遺伝子のプロモーター (Han <i>et al.</i> , 2001)。
i- <i>At1g62290</i>	37,714-38,560 (847)	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g62290</i> 座の 5'UTR を含むイントロン (アスパラチルプロテアーゼ蛋白質) (Chen <i>et al.</i> , 2002)。
Intervening sequence	38,561-38,567 (7)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c-D5E( <i>Ot</i> )	38,568-39,470 (903)	<i>O. tauri</i> 由来の $\Delta$ -5 エロンガーゼ (GenBank Accession No: CS020159) (Zank <i>et al.</i> , 2005) をコードする遺伝子。セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドン最適化しているが、この改変によりアミノ酸配列は変化していない。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、ドコサペンタエン酸への変換を触媒する (Yilmaz <i>et al.</i> , 2017)。
Intervening sequence	39,471-39,486 (16)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
t- <i>FAE1</i> ( <i>At</i> )	39,487-39,886 (400)	<i>A. thaliana</i> 由来のエロンガーゼ遺伝子 ( <i>FAE1</i> ) のターミネーター (Rossak <i>et al.</i> , 2001)。
c-AHAS( <i>At</i> ) 発現カセット		
p- <i>Ubi4</i> ( <i>Pc</i> )	40,005-40,398 (394)	<i>Petroselinum crispum</i> 由来のユビキチン ( <i>Pcubi4-2</i> ) プロモーター (Kawalleck <i>et al.</i> , 1993)。
i- <i>Ubi4</i> ( <i>Pc</i> )	40,399-40,986 (588)	<i>P. crispum</i> 由来の 5'UTR のユビキチン遺伝子イントロン (Kawalleck <i>et al.</i> , 1993)。
Intervening sequence	40,987-40,993 (7)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
c-AHAS( <i>At</i> )	40,994-43,006 (2013)	<i>A. thaliana</i> 由来のアセトヒドロキシ酸合成酵素の S653N 及び A122T 置換を伴う AHAS の大サブユニットをコードする遺伝子 (Mazur <i>et al.</i> , 1987)。本酵素はイミダゾリノン系除草剤への耐性を与える (Tan <i>et al.</i> , 2005)。
t-AHAS( <i>At</i> )	43,007-43,786 (780)	<i>A. thaliana</i> 由来の AHAS( <i>At</i> ) 遺伝子のターミネーター (Mazur <i>et al.</i> , 1987)。
その他		
RB	1-328 (328)	<i>R. radiobacter</i> 由来のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 の T-DNA 右側境界領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
Intervening sequence	329-508 (180)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	2,536-2,627 (92)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	5,584-5,718 (135)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	9,615-9,692 (78)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	13,553-13,721 (169)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	16,542-16,633 (92)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	19,597-19,674 (78)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	21,931-22,065 (135)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	25,257-25,402 (146)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	28,737-28,828 (92)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	32,877-33,011 (135)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	36,091-36,283 (193)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	39,887-40,004 (118)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Intervening sequence	43,787-43,874 (88)	Gateway BiBAC vector の断片。
LB	43,875-44,010 (136)	<i>R. radiobacter</i> 由来のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 の T-DNA 左側境界領域 (Barker <i>et al.</i> , 1983)。
ベクター・外骨格領域 (本組換えセイヨウナタネには存在しない)		
Intervening sequence	44,011-45,141 (1131)	44170 から 44835bp の位置にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターと一部の翻訳領域を含む。44,011-44,169bp 及び 44,836-45,141bp は遺伝要素のクローニングに必要な領域。
c-KanR	45,142-45,957 (816)	<i>Escherichia coli</i> 由来のカナマイシン抵抗性トランスポゾン Tn903 のアミノグリコシド 3'-ホストトランスフェラーゼ (Oka <i>et al.</i> , 1981; Naumovski and Friedberg, 1983)。
p-KanR	45,958-46,078 (121)	<i>E. coli</i> 由来のカナマイシン抵抗性トランスポゾン Tn903 のアミノグリコシド 3'-ホストトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーター (Naumovski and Friedberg, 1983)。

構成要素 <sup>1</sup>	ベクター上の位置(bp)	由来及び機能
Intervening sequence	46,079-47,230 (1152)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
<i>o-Ori2</i>	47,231-47,447 (217)	<i>E. coli</i> 由来の F プラスミドの複製開始点 ( <i>ori-2</i> ) (Murotsu <i>et al.</i> , 1984)。
Intervening sequence	47,448-47,540 (93)	<i>E. coli</i> 由来の F プラスミドの遺伝子間配列。
<i>c-repE</i>	47,541-48,296 (756)	<i>E. coli</i> 由来の F プラスミドの <i>repE</i> 遺伝子。
Intervening sequence	48,297-48,874 (578)	<i>c-repE</i> 及び <i>c-sopA</i> の間の遺伝子間配列。
<i>c-sopA</i>	48,875-50,050 (1176)	<i>E. coli</i> 由来の F プラスミドの <i>sopA</i> 遺伝子 (Mori <i>et al.</i> , 1986)。
<i>c-sopB</i>	50,051-51,021 (972)	<i>E. coli</i> 由来の F プラスミドの <i>sopB</i> 遺伝子。
Intervening sequence	51,022-51,093 (72)	<i>sopB</i> 及び <i>sopC</i> の間の遺伝子間配列。
<i>sopC</i>	51,094-51,567 (474)	<i>E. coli</i> 由来の plasmid partition システム (細菌の細胞分裂の際にプラスミドの安定的な伝達に参与する) に必要な F プラスミドの部分的 <i>sopC</i> 領域 (Helsberg and Eichenlaub, 1986; Mori <i>et al.</i> , 1986)。
Intervening sequence	51,568-52,480 (913)	pTiC58 からの <i>repABC</i> オペロンに隣接する配列でオペロン <i>repABC</i> のプロモーターを含む (Li and Farrand, 2000)。
<i>c-repA</i>	52,481-53,698 (1218)	<i>R. radiobacter</i> 由来の pTiC58 レプリコンからの <i>repA</i> 遺伝子 (Li and Farrand, 2000)。
Intervening sequence	53,699-53,927 (229)	<i>repABC</i> オペロンからの遺伝子間配列
<i>c-repB</i>	53,928-54,938 (1011)	<i>R. radiobacter</i> 由来の pTiC58 レプリコンからの <i>repB</i> 遺伝子 (Li and Farrand, 2000)。
Intervening sequence	54,939-55,152 (214)	<i>repABC</i> オペロンからの遺伝子間配列
<i>c-repC</i>	55,153-56,472 (1320)	<i>R. radiobacter</i> 由来の pTiC58 レプリコンからの <i>repC</i> 遺伝子 (Li and Farrand, 2000)。
Intervening sequence	56,473-57,429 (957)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
Tn5	57,430-58,991 (1562)	<i>E. coli</i> 由来のトランスポゾン Tn5 (Beck <i>et al.</i> , 1982)。プラスミド LTM593 の機能には必要ない。
Intervening sequence	58,992-59,286 (295)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。
<i>oriT</i>	59,287-59,455 (169)	<i>R. radiobacter</i> 由来の pRK310 からの接合伝達の起点 (Marx and Lidstrom, 2001)。
Intervening sequence	59,456-60,074 (619)	遺伝要素のクローニングに必要な領域。

<sup>1</sup> 使用されている接頭辞：p-, プロモーター；i-, 5'非翻訳領域 (UTR) を含むイントロン；c-, 翻訳領域；t-, ターミネーター；o-, 複製基点。同じ翻訳領域が 2 回使用されている場合 (*c-D5D(Tc)*) 及び *c-O3D(Pir)*、翻訳領域の名称に接尾番号が加えられている。

現在 *Agrobacterium tumefaciens* は *Rhizobium radiobacter* と呼ばれている。

Intervening sequence は、社内でランダムに作成した配列を使用しており、既存の配列は含まれていない。

## ロ 構成要素の機能

- ① 目的遺伝子、発現調節領域、局在化シグナル、選抜マーカーその他の供与核酸の構成要素それぞれの機能

5

本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の構成要素は表 1 (p.8-14) に示した。

- ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっている蛋白質と相同性を有する場合はその旨

10

本組換えセイヨウナタネでは 11 種類の蛋白質が新たに産生され、そのうち膜蛋白質である 7 種のデサチュラーゼ (D5D (*Tc*), D6D (*Ot*), D12D (*Ps*), O3D (*Pir*), O3D (*Pi*), D4D (*Tc*), D4D (*Pl*)蛋白質) 及び 3 種のエロンガーゼ (D6E (*Pp*), D6E (*Tp*), D5E (*Ot*) 蛋白質) (以下、「デサチュラーゼ及びエロンガーゼ」とする。)、及びアセトヒドロキシ酸合成酵素 (AHAS(*At*))が含まれる (表 2, p.16)。デサチュラーゼ及びエロンガーゼは、種子中にエイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA)を産生させる (図 1, p.17)。シグナル配列を有している AHAS(*At*) 蛋白質は、葉緑体に局在し、イミダゾリノン系除草剤への耐性を付与する。

20

植物において脂肪酸の生合成は色素体で始まり、オレイン酸の生合成までが行われるが、脂肪酸の不飽和化はデサチュラーゼにより触媒され、色素体及び小胞体の膜で起きる (Shanklin and Cahoon, 1998; Zauner *et al.*, 2012)。色素体を標的としたデサチュラーゼ活性は葉緑体に特異的な電子伝達系に依存することが知られているが (Shanklin and Cahoon, 1998)、本組換えセイヨウナタネに導入されたデサチュラーゼは葉緑体輸送ペプチドを有しておらず、また、酵母で発現させた際にも酵素活性があることから葉緑体の電子伝達系を必要としておらず (Yilmaz *et al.*, 2017)、小胞体の膜に局在していると考えられる。エロンガーゼは小胞体に局在している複合体としてのみ働くことが知られており (Haslam and Kunst, 2013)、また、本組換えセイヨウナタネに導入されたエロンガーゼは膜貫通ドメインを有しているため、小胞体の膜に局在していると考えられる。

30

植物の脂肪酸は、共有結合している親水性部位によってその局在が 3 つに分類される：①アシルキャリア蛋白質プールは色素体に、②アシル補酵素 A プールは細胞質に、③アシルリン脂質 (アシル-ホスファチジル・コリン等) プールは小胞体の膜に局在する。

- 脂肪酸は、これら3つの脂肪酸プール間を特定の内在性酵素によって移動することができる (Bates *et al.*, 2013)。本組換えセイヨウナタネに導入されたデサチュラーゼはデサチュラーゼの種類に応じてアシル補酵素A又はアシルリン脂質のいずれかを利用するが、導入されたエロンガーゼはアシル補酵素Aのみを利用する。よって、本組換えセイヨウ
- 5 ナタネに導入された新たな脂肪酸合成経路は、DHAを合成するまでのそれぞれの合成段階におけるデサチュラーゼ又はエロンガーゼによって、細胞質におけるアシル補酵素Aプールと小胞体におけるアシルリン脂質プールとの間を、アシル基質の転移のための内在性酵素に依存して移動しながらDHAまでの脂肪酸合成が進む。
- 10 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた導入用プラスミドLTM593には、13遺伝子カセット組み込まれているが、発現量を増やすため、D5D(*Tc*)及びO3D(*Pir*)遺伝子をそれぞれ含む遺伝子カセットが2つずつ組み込まれているため、新規の導入遺伝子数は11である (図3, p.32)。また、D6E(*Tp*)及びD6E(*Pp*)、O3D(*Pir*)及びO3D(*Pi*)並びにD4D(*Tc*)及びD4D(*Pl*)は、それぞれ供与体は異なるが、脂肪酸合成経路における同じステップを触
- 15 媒し、導入された脂肪酸合成に関連する10遺伝子が、オレイン酸からDHAを産生する7ステップを触媒する。また、AHAS(*At*)遺伝子1つがイミダゾリノン系除草剤への耐性を付与する。

表2 本組換えセイヨウナタネに導入した酵素名、酵素の略称及び供与体

	酵素名*	酵素の略称	供与体
1	$\Delta$ -12 デサチュラーゼ ( <i>Ps</i> )	D12D( <i>Ps</i> )	<i>P. sojae</i>
2	$\Delta$ -6 デサチュラーゼ ( <i>Ot</i> )	D6D( <i>Ot</i> )	<i>O. tauri</i>
3	$\Delta$ -6 エロンガーゼ ( <i>Tp</i> )	D6E( <i>Tp</i> )	<i>T. pseudonana</i>
4	$\Delta$ -6 エロンガーゼ ( <i>Pp</i> )	D6E( <i>Pp</i> )	<i>P. patens</i>
5	$\Delta$ -5 デサチュラーゼ ( <i>Tc</i> ) <sup>1</sup>	D5D( <i>Tc</i> )	<i>Thraustochytrium</i> sp.
6	$\omega$ -3 デサチュラーゼ ( <i>Pir</i> ) <sup>1</sup>	O3D( <i>Pir</i> )	<i>P. irregulare</i>
7	$\omega$ -3 デサチュラーゼ ( <i>Pi</i> )	O3D( <i>Pi</i> )	<i>P. infestans</i>
8	$\Delta$ -5 エロンガーゼ ( <i>Ot</i> )	D5E( <i>Ot</i> )	<i>O. tauri</i>
9	$\Delta$ -4 デサチュラーゼ ( <i>Tc</i> )	D4D( <i>Tc</i> )	<i>Thraustochytrium</i> sp.
10	$\Delta$ -4 デサチュラーゼ ( <i>Pl</i> )	D4D( <i>Pl</i> )	<i>P. lutheri</i>
11	アセトヒドロキシ酸シンターゼ( <i>At</i> )	AHAS( <i>At</i> )	<i>A. thaliana</i>

\*各酵素の後にある略号は、対応する酵素の供与体を示している。

1 : D5D(*Tc*)及びO3D(*Pir*)遺伝子は、それぞれの遺伝子を含む遺伝子カセットが導入用プラスミドLTM593に2つずつ組み込まれている (図3, p.32)。

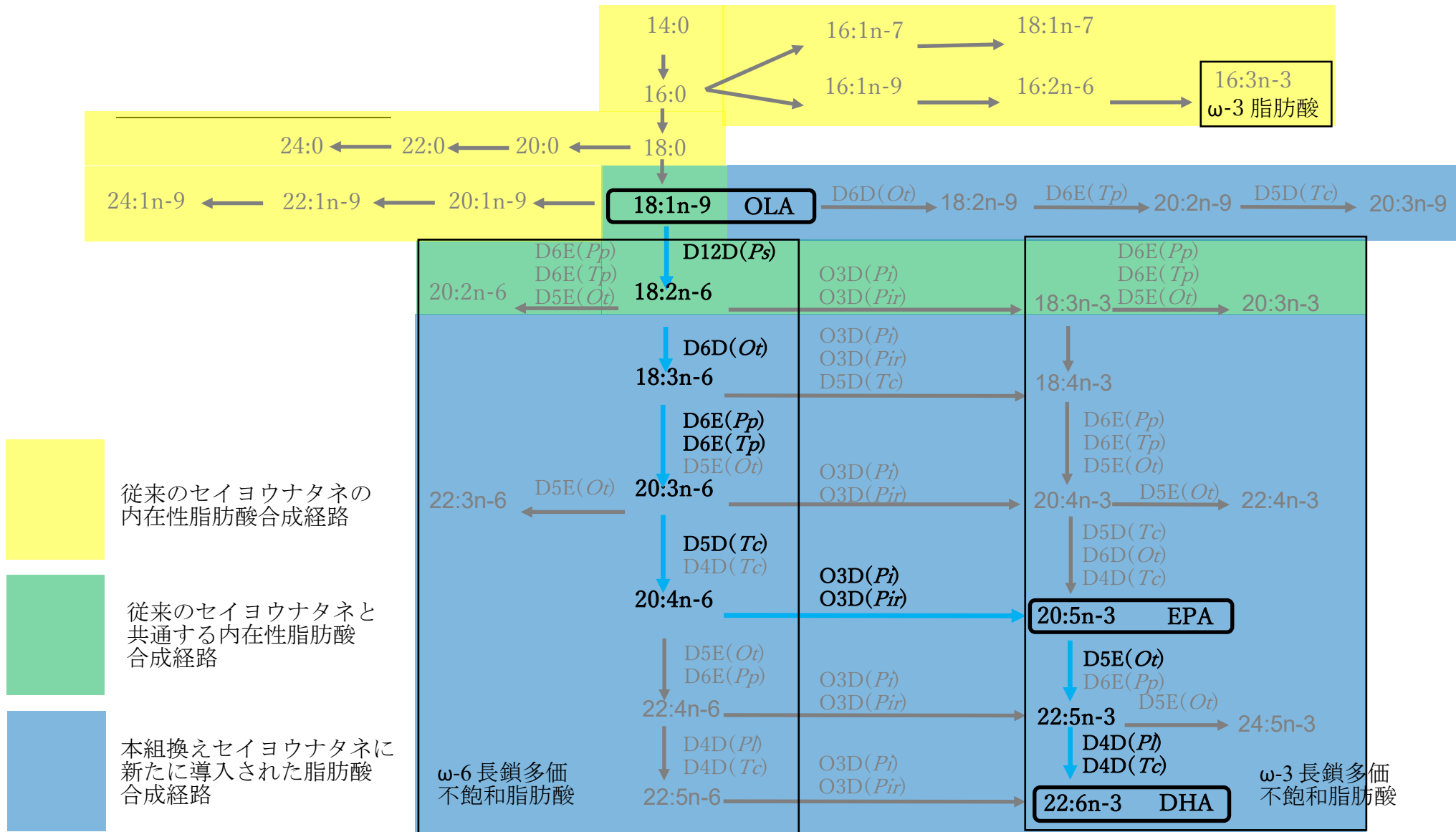


図1 本組換えセイヨウナタネに導入された脂肪酸合成経路

オレイン酸までの脂肪酸合成経路は従来のセイヨウナタネの内在性脂肪酸合成経路で(黄: Baker *et al.*, 2007)、オレイン酸からリノール酸は、従来のセイヨウナタネの内在性脂肪酸合成経路と本組換え体に新たに導入した脂肪酸合成経路と共通する脂肪酸合成経路で(緑: Yilmaz *et al.*, 2017)、 $\gamma$ -リノレン酸から EPA 及び DHA の合成は本組換え体に新たに導入した脂肪酸合成経路を示している(青: Sakuradani *et al.*, 2002; Yilmaz *et al.*, 2017)。脂肪酸は Ca:b の記法で示している。ここで a は脂肪酸内の炭素原子数、b は二重結合の数である。bn-x の記法は、二重結合が末端の  $\omega$  (メチル) 炭素から数えて x 番目に位置していることを示している。 $\omega$  炭素から 6 番目に二重結合が位置している脂肪酸を  $\omega$ -6 長鎖多価不飽和脂肪酸、3 番目に位置している脂肪酸を  $\omega$ -3 長鎖多価不飽和脂肪酸という。各酵素の略称は表 2 (p.16)を参照。黒色で示した脂肪酸及び脂肪酸合成酵素並びに青い矢印は、本組換えセイヨウナタネに導入した主要な脂肪酸合成経路を示し、灰色で示した脂肪酸及び脂肪酸合成酵素並びに灰色の矢印は、本組換えセイヨウナタネに導入した脂肪酸合成酵素及びそれによって触媒される反応経路及び産生された脂肪酸を示す(Yilmaz *et al.*, 2017)。

なお、図中で使用している各脂肪酸の慣用名があるものは、下記にまとめた。

ミリスチン酸 (C14:0)	パルミチン酸 (C16:0)	パルミトレイン酸 (C16:1 n-7)	<i>cis</i> -7-ヘキサデセン酸 (C16:1 n-9)
ステアリン酸 (C18:0)	<i>cis</i> -バクセン酸 (C18:1 n-7)	オレイン酸 (C18:1 n-9)	リノール酸 (C18:2 n-6)
$\alpha$ -リノレン酸 (C18:3 n-3)	$\gamma$ -リノレン酸 (C18:3n-6)	ステアリドン酸 (C18:4 n-3)	アラキジン酸 (C20:0)
ゴンド酸 (C20:1 n-9)	エイコサジエン酸 (C20:2 n-6)	エイコサトリエン酸 (C20:3 n-3)	ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸 (C20:3 n-6)
ミード酸 (C20:3 n-9)	ビスホモステアリン酸 (C20:4 n-3)	アラキドン酸 (C20:4 n-6)	エイコサペンタエン酸 (EPA) (C20:5 n-3)
ベヘン酸 (C22:0)	アドレン酸 (C22:4 n-6)	クルパノドン酸 (C22:5 n-3)	オスボンド酸 (C22:5 n-6)
ドコサヘキサエン酸 (DHA) (C22:6 n-3)	リグノセリン酸 (C24:0)	ネルボン酸 (C24:1 n-9)	テトラコサペンタエン酸 (24: 5n-3)



## ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸

ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸は長鎖多価不飽和脂肪酸の一種で、ヒトが摂取する代表的なものは、食用調理油由来の α-リノレン酸<sup>1</sup>、エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA) がある。一般に使用されている食用調理油のうち、ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸を含有しているものには魚油 (EPA 及び DHA 含) や亜麻仁油 (α-リノレン酸含) がある。

ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸は、筋活動、血液凝固、消化、生殖能力、細胞の分裂及び成長など多くの身体機能にとって重要である。DHA は脳の発達及び機能にとって重要であり、α-リノレン酸はヒトの体内では産生できない必須脂肪酸であるため、食品又はサプリメントから摂取する必要がある (NIH, 2018)。厚生労働省が策定する日本人の食事摂取基準 (2020 年版) では、健康の保持・増進のために、ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸を成人 1 人あたり 1 日約 2 グラム摂取することを勧めている (厚生労働省, 2019)。

### 15 エイコサペンタエン酸 (EPA) 及びドコサヘキサエン酸 (DHA)

ω-3 長鎖多価不飽和脂肪酸である EPA 及び DHA は、魚類 (サケ、マグロ及びマス) や甲殻類及び貝類 (カニ、ムール貝及びカキ) を含む海産物を通して主に摂取されている。多数の保健機関により、EPA 及び DHA は成人 1 日あたり合計で 250~500 mg の摂取が推奨されている (Yi *et al.*, 2014; Salem and Eggersdorfer, 2015)。しかしながら、一部の国では推奨摂取量を上回っているものの、米国を含む多くの国では推奨摂取量を下回っている (Gebauer *et al.*, 2006; Kris-Etherton *et al.*, 2009; Flock *et al.*, 2013; Salem and Eggersdorfer, 2015)。この主な理由は、供給源である海産物や魚油等からのこれらの脂肪酸の供給が限られているからであり、EPA 及び DHA を含む製品を適切な量で消費者に供給することは大きな課題となっている。また、特にサケやマスのような脂肪の多い養殖魚に給餌するための需要も高い。

### デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

30 デサチュラーゼは、アシル鎖 (R-CO-) の規定された位置で基質である脂肪酸中に二重結合の形成を触媒する酵素で、カルボニル基から一定の位置に二重結合を導入する Δ-デサチュラーゼと、メチル基から一定の位置に二重結合を導入する ω-デサチュラーゼがある。例えば、Δ-12 デサチュラーゼはカルボキシル基から 12 番目及び 13 番目の炭素間に、ω-3 デサチュラーゼはメチル基から 3 番目及び 4 番目の炭素間に二重結合を挿入する。本組換えセイヨウナタネに導入された全てのデサチュラーゼは、小胞体に膜結合して局在する。

<sup>1</sup> α-リノレン酸 (18:3(n-3)) 及び γ-リノレン酸 (18:3(n-6)) は、炭素数 18 で、3 つの *cis* 二重結合を持つ。α-リノレン酸は、最初の二重結合は ω 末端から数えて 3 番目に位置し、構造異性体である γ-リノレン酸の場合には、ω 末端から数えて 6 番目に位置する。



エロンガーゼは、既存の C18 又はそれ以上の脂肪酸を 2 炭素単位で伸長させる酵素で、脂肪酸伸長プロセスの 4 段階の反応サイクルのうち、律速段階である縮合過程を触媒する。本組換えセイヨウナタネに導入された全てのエロンガーゼは、小胞体の膜に結合して局在している。

- 5 本組換えセイヨウナタネは、デサチュラーゼ及びエロンガーゼの発現により、オレイン酸から EPA 及び DHA を産生させ、従来のセイヨウナタネとは異なる脂肪酸を産生させる意図で作出された。EPA 及び DHA を産生するために導入した酵素及び従来のセイヨウナタネが持っている脂肪酸合成経路により、従来のセイヨウナタネには見られない脂肪酸が産生された。本組換えセイヨウナタネに導入された脂肪酸合成経路を図 1  
10 (p.17) に示す。

なお、導入された全てのデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、2021 年に COMPARE (version; COMPARE 2021、検索日：2021 年 2 月 15 日)<sup>2</sup> を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

15

### AHAS(*At*)蛋白質

- 本組換えセイヨウナタネに導入されたイミダゾリノン系除草剤耐性遺伝子 (シロイヌナズナ由来改変 *AHAS(At)* 遺伝子) は、アセトヒドロキシ酸合成酵素 (以下、「AHAS 蛋白質」とする) をコードしており、その遺伝子産物である *AHAS(At)* 蛋白質のアミノ酸配列 122 番目のアラニンはトレオニンに、653 番目のセリンはアスパラギンに置換されている。AHAS 蛋白質は、多くの植物が生存するために必要な酵素で、あらゆる植物、微生物に含まれ、分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) 生合成の第一段階を触媒する (Stidham and Singh, 1991)。従来の植物においては、イミダゾリノン系除草剤が AHAS 蛋白質を阻害することで分岐鎖アミノ酸が欠乏し、生育が阻害される (図 2,  
25 p.22)。一方、*AHAS(At)* 蛋白質を発現させた植物は、この *AHAS(At)* 蛋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、通常が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ことが知られている (Newhouse *et al.*, 1992)。

<sup>2</sup> COMprehensive Protein Allergen Resource (COMPARE) : 本データベースは、十分な裏付けのあるアレルギー性のタンパク質をデータベース化することを目的とし、International Life Sciences Institute's Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI)によって管理され、一般に公開されているアレルゲンデータベースである。初めのバージョンは、2015 年 5 月から 2016 年 5 月に National Center for Biotechnology (NCBI) に登録され、注釈がついている配列を元にデータベースに入れる候補を洗い出し、それらをアレルギーの専門家が論文等のタンパク質のアレルギー性試験の結果 (IgE による免疫学的検定) 等を元にデータベースに追加する配列を決定した。今後は、NCBI に追加された配列に基づき 1 年に 1 回データベースを更新し、また、それとは独立して新たな論文等を元に候補のタンパク質を追加する。なお、2016 年の AllergenOnline データベースに含まれていた全配列を含んでいる。

なお、AHAS(*At*) 蛋白質のアミノ酸配列に基づき、2021 年に COMPARE (version; COMPARE 2021、検索日：2021 年 2 月 15 日)を用いて既知のアレルゲンとの包括的な相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンとの相同性は認められなかった。

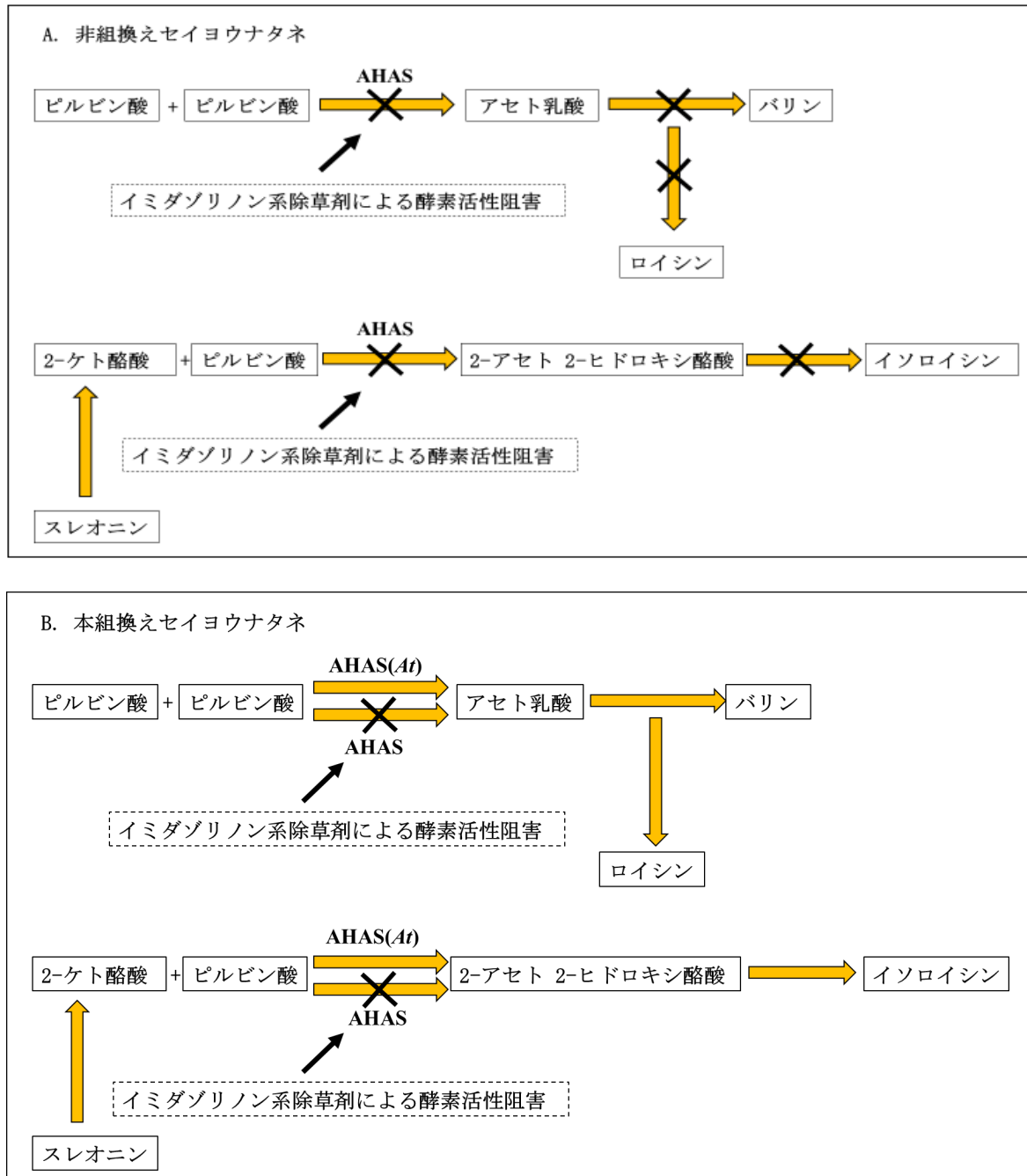


図2 AHAS 蛋白質及び AHAS(*At*) 蛋白質の作用機作

AHAS 蛋白質は分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) 生合成の第 1 段階に作用する。ピルビン酸 2 分子を縮合してアセト乳酸を生成する反応及びピルビン酸 1 分子と 2-ケト酪酸 1 分子を縮合して、2-アセト 2-ヒドロキシ酪酸を生成する反応を触媒する (Singh and Shaner, 1995; Duggleby and Pang, 2000)。セイヨウナタネ内在性の AHAS 蛋白質活性はイミダゾリノン系除草剤によって阻害されるため、非組換えセイヨウナタネは枯死する (A)。一方、AHAS(*At*) 蛋白質を発現する本組換えセイヨウナタネでは、イミダゾリノン系除草剤の存在下でも分岐鎖アミノ酸 (バリン、ロイシン、イソロイシン) の生合成は阻害されず、イミダゾリノン系除草剤耐性を示す (B)。

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

5 本組換えセイヨウナタネは、導入されたデサチュラーゼ7種及びエロンガーゼ3種の働きによる新たな脂肪酸合成経路を通して、従来のセイヨウナタネが産生するオレイン酸を基に EPA 及び DHA を産生する (図 1, p.17)。

10 デサチュラーゼ及びエロンガーゼは脂肪酸合成経路においてのみ働くことが知られている (Shanklin and Cahoon, 1998, Leonard *et al.*, 2004)。EPA 及び DHA の合成経路は単一ではなく、脂肪酸合成経路のネットワークを通して包括的に産生されると考えられる (図 1, p.17)。

【種子における脂肪酸量】

15 2015 年に米国 7 試験地 (アイオワ州、ミネソタ州 2 地点、モンタナ州、ノースダコダ州、サウスダコダ州、ワシントン州) において収穫された本組換えセイヨウナタネ (T<sub>4</sub> 世代: 図 4, p.36)、非組換えセイヨウナタネ及び商業品種の成熟種子において産生される脂肪酸を測定した (表 3, 別添資料 2)。

表 3 測定を行った全脂肪酸

数値表現	慣用名	数値表現	慣用名	数値表現	慣用名
C14:0	ミリスチン酸	C18:4n-3	ステアリドン酸	C22:4n-3	—
C16:0	パルミチン酸	C20:0	アラキジン酸	C22:4n-6	アドレン酸
C16:1n-7	パルミトレイン酸	C20:1n-9	ゴンド酸	C22:5n-3	クルパノドン酸
C16:1n-9	<i>cis</i> -7-ヘキサデセン酸	C20:2n-6	エイコサジエン酸	C22:5n-6	オスボンド酸
C16:3n-3	—	C20:2n-9	—	C22:6n-3	ドコサヘキサエン酸 (DHA)
C17:0	マルガリン酸	C20:3n-3	エイコサトリエン酸	C24:0	リグノセリン酸
C17:1	マルガロレイン酸	C20:3n-6	ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸	C24:1n-9	ネルボン酸
C18:0	ステアリン酸	C20:3n-9	ミード酸	C16:1 trans	<i>trans</i> -パルミチン酸
C18:1n-7	<i>cis</i> -バクセン酸	C20:4n-3	ビスホモステアリン酸	C18:1 trans	<i>trans</i> -ステアリン酸
C18:1n-9	オレイン酸	C20:4n-6	アラキドン酸	C18:2 trans	—
C18:2n-6	リノール酸	C20:5n-3	エイコサペンタエン酸 (EPA)	C18:3 trans	—
C18:2n-9	—	C22:0	ベヘン酸	総トランス脂肪酸	—
C18:3n-3	$\alpha$ -リノレン酸	C22:1n-9	—		
C18:3n-6	$\gamma$ -リノレン酸	C22:2n-6	—		

表 4 (p.27-28) に、本組換えセイヨウナタネにおいて EPA 及び DHA の合成過程で新たに産生される脂肪酸及び非組換えセイヨウナタネにおいても産生される脂肪酸含有量 (%総脂肪酸中の含有量) を示した。本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネにおける脂肪酸を比較したところ、ステアリン酸、リノール酸、及び総トランス脂肪酸  
5 において、本組換えセイヨウナタネにおける値が統計学的に有意に高く、一方、パルミトレイン酸、*cis*-バクセン酸、オレイン酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキジン酸、ゴンド酸、ベヘン酸、リグノセリン酸及びネルボン酸においては統計学的に有意に低かった (表 4, p.27-28)。

本組換えセイヨウナタネにおけるパルミトレイン酸、ステアリン酸、*cis*-バクセン酸、  
10  $\alpha$ -リノレン酸、ネルボン酸、アラキジン酸、ゴンド酸、ベヘン酸、リグノセリン酸及び総トランス脂肪酸の変化は、EPA 及び DHA を産生するために導入されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼに影響を受けたものであるが (図 1, p.17)、これらの脂肪酸の平均値は、商業品種又は ILSI 構成成分データベース (ILSI, 2016) の変動の範囲内であった。

15 また、ミリスチン酸、*cis*-7-ヘキサデセン酸、マルガリン酸、マルガロレイン酸及びエイコサジエン酸の値は、統計学的解析の条件を満たさなかったが、それぞれの脂肪酸の平均値は、全て商業品種の範囲内であった。また、エルシン酸の値は、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの全サンプルにおいて定量限界値未満であり、脂肪酸組成に対し 2%未満とするカノーラ品質の基準 (OECD, 2011) を満たしていた。

20 なお、脂肪酸とは別に種子の粗脂質を測定しており、対照の非組換えセイヨウナタネにおいては  $38.95 \pm 0.96$  (%乾燥重)、本組換えセイヨウナタネの除草剤処理区においては  $38.45 \pm 0.96$  (%乾燥重) であり、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの粗脂質含量には統計学的有意差がなく、本組換えセイヨウナタネの全脂質量は対照の非組換えセイヨウナタネと同程度と考えられた。

25

#### 本組換えセイヨウナタネのオレイン酸及びリノール酸が昆虫及び野生動物へ与える影響について

本組換えセイヨウナタネにおいて、長鎖多価不飽和脂肪酸の生産における主要な前駆体であるオレイン酸含量は非組換えセイヨウナタネと比較して統計学的に有意に低く、  
30 リノール酸含量は非組換えセイヨウナタネと比較して統計学的に有意に高かった。これらは商業品種の範囲及び ILSI 構成成分データベースの変動の範囲を超えていたものの、一般の植物由来の食用油 (オレイン酸：大豆油、リノール酸：食用ひまわり油) の範囲内であり (公益財団法人 日本油脂検査協会、2017)、これまでにヒトが食経験がある量であると考えられた。また、これらの植物油の元となる植物において、これまでに動物  
35 や昆虫が摂食したことがあるオレイン酸及びリノール酸量であると考えられた。

## 本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸が昆虫及び野生動物へ与える影響について

本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸の含有量は、非組換えセイヨウナタネと比べ統計学的に有意に高く、商業品種の変動範囲を超えていた。本組換えセイヨウナタネにおいては、非組換えセイヨウナタネと比較して二重結合をもつ脂肪酸が多く存在するため、それらがトランス型になる可能性がある。本組換えセイヨウナタネ種子が産生するトランス脂肪酸は少量であるが、本組換えセイヨウナタネがナタネの種子を食害する動物及び昆虫に摂食された場合、本組換えセイヨウナタネの種子で非組換えセイヨウナタネより増加したトランス脂肪酸が、野生動物及び昆虫に与える影響を以下に考察した。

10 本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が動物に与える影響については、ラットへの投与試験を用いて考察した。本組換えセイヨウナタネの精製油を 3 ml (2.76 g)/kg/day の用量で 28 日間反復経口投与した結果、いずれの検査項目においても毒性徴候は示さず、本組換えセイヨウナタネの油をラットが摂食しても安全であることを示した (Andre *et al.*, 2019)。よって、野生動物においても、本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸が影響を及ぼすことはないと考えられた。

本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が昆虫に与える影響については、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネを野外において栽培し、訪れる昆虫を含む節足動物及びミミズを同定し、数えた。具体的には、2015 年に米国の 3 つのほ場 (ミネソタ州、サウスダコダ州、アイダホ州) において、本組換えセイヨウナタネ、対照の非組換えセイヨウナタネ (Kumily) 及び商業品種を栽培し、それぞれの植物体及びその周辺に訪れる節足動物及びミミズを捕獲して調査した (別添資料 11)。その結果、合計で 65,251 個体の節足動物 (13 目 (コウチュウ目、鱗翅目、双翅目、半翅目、トビムシ目、膜翅目、アミメカゲロウ目、アザミウマ目、ハサミムシ目、カゲロウ目、直翅目、トンボ目、クモ目)、16 科) が同定され (別添資料 11 の p.18 及び Table 21, p.38)、非組換えセイヨウナタネの栽培と比較して、本組換えセイヨウナタネの栽培は節足動物及びミミズの多様性に影響はなかった。ただし、ノミハムシの数が、非組換えセイヨウナタネ栽培区より本組換えセイヨウナタネ栽培区において多い時期が見られたほ場があったが、セイヨウナタネの生育時期や複数のほ場にわたっての一貫性はなかった。よって、本試験において観察及び調査した項目において、非組換えセイヨウナタネと本組換えセイヨウナタネ栽培区に見られる生物学的に有意な一貫した傾向はなかったため、本組換えセイヨウナタネの栽培が昆虫に影響を及ぼさないと結論した。

更に、本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が昆虫に与える影響については、モデル昆虫であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) にトランス脂肪酸量を増減させた餌を与えた給餌試験 (Meichtry *et al.*, 2020) を元に考察した。本実験に使用した

コントロール餌 (regular diet)<sup>3</sup> は、9.1%の脂肪酸 (餌の総重量に対しての含有量) の内 0.16%がトランス脂肪酸であった。本実験に使用した最もトランス脂肪酸量が高い餌<sup>4</sup> には、38.97%の脂肪酸 (餌の総重量に対しての含有量) の内 4.91%のトランス脂肪酸が含まれていた。この高濃度のトランス脂肪酸を含む餌を与えたショウジョウバエは高い死亡率 (給餌開始後 7 日目に約 75%) を示したが、コントロール餌 (regular diet) を与えたショウジョウバエの死亡率 (給餌開始 7 日後に約 12%) が最も低かった。本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸量は総脂肪酸中の 0.27%であり、本実験で使用したコントロール餌 (regular diet) における総トランス脂肪酸は総脂肪酸中の 1.75%であるため、本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸量より低い。したがって、昆虫が本組換えセイヨウナタネを摂餌した際にトランス脂肪酸が昆虫に与える影響は更に低いと考えられた。

### 【葉における脂肪酸量】

2020年に米国4試験地 (アイダホ州、ミネソタ州、ノースダコダ州、サウスダコダ州) において収穫された本組換えセイヨウナタネ (T<sub>6</sub>世代：図 4, p.36)、非組換えセイヨウナタネの葉において産生される表 3 (p.23) の全脂肪酸を測定した (表 5, p.29; 別添資料 7)。

一般に葉の脂肪酸含量は低く、本測定においても多くの脂肪酸は定量限界値未満であったが、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、 $\alpha$ -リノレン酸、アラキジン酸及び総トランス脂肪酸は測定された (表 5, p.29)。そのうち、統計解析が可能であった本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネのパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸及び $\alpha$ -リノレン酸含量を比較した結果、統計学的有意差は認められなかった。なお、測定が可能だった脂肪酸は全て従来のセイヨウナタネに含まれる脂肪酸である。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネの脂肪酸組成は、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、リノール酸、並びにトランス脂肪酸の割合の変化を除いて、従来のセイヨウナタネと同程度である。また、本組換えセイヨウナタネにおいて、新たに産生される脂肪酸は、内在性脂肪酸と同様に、ベータ酸化により代謝されると考えられる。

よって、デサチュラーゼ及びエロンガーゼは、脂肪酸組成に意図した変化及び関連して予想される変化以外に、宿主の代謝系に影響していないと考えられた。

<sup>3</sup> コントロール餌 (regular diet) : トランス脂肪酸の総脂肪酸中の含有量は 1.75%

<sup>4</sup> 最もトランス脂肪酸量が高い餌 : トランス脂肪酸の総脂肪酸中の含有量は 12.5%

表4 非組換えセイヨウナタネ及び本組換えセイヨウナタネ種子における脂肪酸組成 (%総脂肪酸中の含有量)

項目	非組換え セイヨウナタネ	本組換え セイヨウナタネ <sup>1</sup>	<i>p</i> -値	商業品種の 許容区間	ILSI の範囲
	平均±標準誤差	平均±標準誤差	<i>t</i> -検定 <sup>2</sup>		
ミリスチン酸 (C14:0)	0.061 ± 0.0069	0.064 ± 0.0038	NA <sup>3</sup>	0.04 - 0.07	< LOQ (0.04)– 0.09
パルミチン酸 (C16:0)	4.54 ± 0.11	4.57 ± 0.11	0.114 NS	2.91 - 4.46	3.55–5.7
<i>trans</i> -パルミチン酸 (C16:1)	—	0.057 ± 0.0043	NA <sup>3</sup>	—	—
パルミトレイン酸 (C16:1 n-7)	0.29 ± 0.011	0.19 ± 0.011	< 0.001 S	0.18 - 0.28	0.16–0.4
<i>cis</i> -7-ヘキサデセン酸 (C16:1 n-9)	0.040 ± 0.0057	0.048 ± 0.0049	NA <sup>3</sup>	0.03 - 0.062	—
マルガリン酸 (C17:0)	0.048 ± 0.0028	0.048 ± 0.0037	NA <sup>3</sup>	0.032 - 0.048	< LOQ (0.03)– 0.14
マルガロレイン酸 (C17:1)	0.053 ± 0.0035	< LOQ	NA <sup>3</sup>	0.04 - 0.06	< LOQ (0.04)– 0.16
ステアリン酸 (C18:0)	2.18 ± 0.061	2.77 ± 0.061	< 0.001 S	1.73 - 2.23	1.5–2.77
<i>trans</i> -ステアリン酸 (C18:1)	—	0.12 ± 0.019	NA <sup>3</sup>	—	—
<i>cis</i> -バクセン酸 (C18:1 n-7)	3.50 ± 0.10	3.46 ± 0.10	0.047 S	2.57 - 3.47	—
オレイン酸 (C18:1 n-9)	54.83 ± 0.74	26.41 ± 0.74	< 0.001 S	55.21 - 76.44	53.19–69.45
リノール酸 (C18:2 n-6)	19.29 ± 0.47	27.89 ± 0.47	< 0.001 S	5.81 - 23.23	14.13–25.68
C18:2 n-9	—	1.12 ± 0.15	NA <sup>3</sup>	—	—
α-リノレン酸 (C18:3 n-3)	8.01 ± 0.21	5.37 ± 0.21	< 0.001 S	1.97 - 8.52	—
γ-リノレン酸 (C18:3 n-6)	—	1.60 ± 0.16	NA <sup>3</sup>	—	—
ステアリドン酸 (C18:4 n-3)	—	0.26 ± 0.038	NA <sup>3</sup>	—	—
アラキジン酸 (C20:0)	0.70 ± 0.017	0.66 ± 0.017	< 0.001 S	0.57 - 0.8	< LOQ (0.49)– 0.86
ゴンド酸 <sup>5</sup> (C20:1 n-9)	1.03	0.7	< 0.001 S	1 - 1.45	1.00–1.82 <sup>4</sup>
エイコサジエン酸 (C20:2 n-6)	0.071 ± 0.019	0.10 ± 0.00	NA <sup>3</sup>	0.045 - 0.12	< LOQ (0.04)– 0.86 <sup>4</sup>
C20:2 n-9	—	0.33 ± 0.060	NA <sup>3</sup>	—	—
エイコサトリエン酸 (C20:3 n-3)	—	0.067 ± 0.0093	NA <sup>3</sup>	—	—
ジホモ-γ-リノレン酸 (C20:3 n-6)	—	4.06 ± 0.38	NA <sup>3</sup>	—	—
ミード酸 (C20:3 n-9)	—	0.079 ± 0.016	NA <sup>3</sup>	—	—
ビスホモステアリン酸 (C20:4 n-3)	—	1.92 ± 0.27	NA <sup>3</sup>	—	—



アラキドン酸 (C20:4 n-6)	—	1.87 ± 0.25	NA <sup>3</sup>	—	—
エイコサペンタエン酸 (EPA) (C20:5 n-3)	—	6.27 ± 0.46	NA <sup>3</sup>	—	—
ベヘン酸 (C22:0)	0.34 ± 0.011	0.26 ± 0.011	< 0.001 S	0.20 - 0.45	0.19-0.46
C22:4 n-3	—	0.68 ± 0.12	NA <sup>3</sup>	—	—
アドレン酸 (C22:4 n-6)	—	0.45 ± 0.042	NA <sup>3</sup>	—	—
クルパノドン酸 (C22:5 n-3)	—	2.75 ± 0.15	NA <sup>3</sup>	—	—
オスボンド酸 (C22:5 n-6)	—	0.072 ± 0.017	NA <sup>3</sup>	—	—
ドコサヘキサエン酸 (DHA) (C22:6 n-3)	—	0.77 ± 0.12	NA <sup>3</sup>	—	—
リグノセリン酸 (C24:0)	0.19 ± 0.0078	0.13 ± 0.0078	< 0.001 S	0.15 - 0.31	< LOQ (0.09)– 0.26
ネルボン酸 (C24:1 n-9)	0.13 ± 0.0079	0.082 ± 0.0079	< 0.001 S	0.084 - 0.18	< LOQ (0.08)– 0.4 <sup>4</sup>
総トランス 脂肪酸 <sup>6</sup>	0.062 ± 0.0065	0.27 ± 0.0065	< 0.001 S	<LOQ - 0.1	NR

7カ所のほ場(各4反復)で、100gの種子を供試。分析した値を次の式、(脂肪酸含有量/全脂肪酸含有量) x 100で全脂肪酸当たりの各脂肪酸の平均値(%)を示している。本組換えセイヨウナタネにおいてのみ検出され、非組換えセイヨウナタネにおいて検出されなかったものは、—と示した。<LOQ:定量限界未満

C16:3 n-3, エルシン酸(C22:1 n-9)及びC22:2 n-6は、測定を行ったが、いずれのサンプルにおいてもLOQ以下だった。

<sup>1</sup> 本組換えセイヨウナタネは、標準的な除草剤及び葉が3~4枚の段階でのイミダズリノン系除草剤の散布(35 g a.i./ha)による雑草防除管理を実施した。

<sup>2</sup> 本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネにおいてt検定(有意水準5%)を行った。

NS:有意差なし。S:有意差あり。

<sup>3</sup> 測定結果が統計学的評価の条件を満たさなかったため、t検定は行えなかった。NA(非適用)

<sup>4</sup> C20:1n-9は20:1エイコセン酸、C20:2n-6は20:2エイコサジエン酸、C24:1n-9は24:1ネルボン酸として報告されている。

<sup>5</sup> 統計解析をする際に対数変換を行った。平均値は逆変換したが、標準誤差は逆変換しなかった。

<sup>6</sup> トランス型の脂肪酸の総和

表5 本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの葉における脂肪酸組成 (総脂肪酸に対する割合%)

項目	非組換え セイヨウナタネ			本組換え セイヨウナタネ			<i>p</i> -値
	平均±標準誤差			平均±標準誤差			<i>t</i> -検定 <sup>1</sup>
ミリスチン酸 (C14:0)	<LOQ	—	6.04	<LOQ	—	4.12	NA <sup>2</sup>
パルミチン酸 (C16:0)	21.0	±	1.9	20.3	±	1.8	0.430 NS
パルミトレイン酸 (C16:1 n-7)	<LOQ			<LOQ	—	1.16	NA <sup>2</sup>
ステアリン酸 (C18:0)	4.10	±	0.55	4.15	±	0.46	0.959 NS
オレイン酸 (C18:1 n-9)	3.17	±	1.05	4.99	±	3.64	0.204 NS
C18:1 trans	<LOQ	—	1.47	<LOQ	—	1.29	NA
C18: 1 total	3.33	±	1.04	5.05	±	3.70	0.246 NS
リノール酸 (C18:2 n-6)	13.0	±	1.7	11.8	±	1.7	0.177 NS
C18:2 trans	<LOQ	—	1.55	<LOQ			NA
C18: 2 total	13.1	±	1.8	11.8	±	1.7	0.190 NS
α-リノレン酸 (C18:3 n-3)	56.0	±	4.6	56.2	±	7.1	0.787 NS
C18: 3 total	56.0	±	4.6	56.2	±	7.1	0.787 NS
アラキジン酸 (C20:0)	<LOQ	—	0.682	<LOQ	—	1.33	NA <sup>2</sup>
総トランス脂肪酸 <sup>3</sup>	<LOQ	—	0.945	<LOQ	—	6.04	NA <sup>2</sup>

4ヵ所のほ場(各5反復)で、葉を供試。分析した値を次の式、(脂肪酸含有量/全脂肪酸含有量) x 100で全脂肪酸当たりの各脂肪酸の平均値(%)をもとめ、示している。測定値が定量限界未満(LOQ)だった脂肪酸は表から除いた。

<sup>1</sup>本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネにおいて*t*-検定(有意水準5%)を行った。

NS:有意差なし

<sup>2</sup>測定結果が統計学的評価の条件を満たさなかったため、*t*-検定を行えなかった。NA(非適用)

<sup>3</sup>トランス型の脂肪酸の総和

## AHAS(*At*)蛋白質

AHAS 蛋白質は全ての植物と細菌に普遍的に存在するものであり、多数の生物から単離されてきた (Mazur *et al.*, 1987)。AHAS 蛋白質は植物及び微生物のバリン、ロイシン及びイソロイシンのアミノ酸生合成経路で特異的に働いている代謝酵素である (Delfourne *et al.*, 1994)。AHAS 蛋白質は生合成経路の主要な制御酵素であり、最終生成物であるそれぞれのアミノ酸によってフィードバック抑制を受ける。AHAS 蛋白質は、導入されたアミノ酸置換によりイミダゾリノン系除草剤への結合親和力が弱められることが知られており、この変異により、負のフィードバック制御を含む通常のアミノ酸の生合成を維持しながら、イミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する (Tan *et al.*, 2005)。

本組換えセイヨウナタネに AHAS (*At*) 蛋白質を発現させたことによるバリン、ロイシン及びイソロイシン含量の変化を確認するために、アミノ酸の測定を行った。アミノ酸組成分析には、2015 年に米国の 7 箇所 (アイオワ州、ミネソタ州 2 地点、モンタナ州、ノースダコダ州、サウスダコダ州、ワシントン州) で収穫された本組換えセイヨウナタネ (T<sub>4</sub> 世代: 図 4, p.36) 及びその宿主品種である非組換えセイヨウナタネの成熟種子が用いられた。イソロイシン及びバリン含有量は、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの間に統計学的有意差は見られなかった。また、本組換えセイヨウナタネのロイシン含量は非組換えセイヨウナタネよりも統計学的に有意に低かったが、セイヨウナタネ商業品種の範囲内であった (別添資料 2)。以上より、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネのアミノ酸組成分析を行った結果、新たに発現させた AHAS(*At*) 蛋白質は本組換えセイヨウナタネの分岐鎖アミノ酸のレベルに影響を及ぼしておらず、宿主の代謝系に影響してないと考えられた (表 6)。

表 6 非組換えセイヨウナタネ、本組換えセイヨウナタネにおける分岐鎖アミノ酸含有量(%乾燥重)

構成要素	非組換え セイヨウナタネ	本組換え セイヨウナタネ <sup>1</sup>	<i>p</i> -値	商業品種の許容区間 最小-最大
	平均 ± 標準誤差	平均 ± 標準誤差	<i>t</i> -検定 <sup>2</sup>	
イソロイシン	1.04 ± 0.025	1.03 ± 0.025	0.268 NS	0.89 - 1.26
ロイシン	1.79 ± 0.042	1.75 ± 0.042	0.007 S	1.53 - 2.18
バリン	1.34 ± 0.030	1.34 ± 0.030	0.586 NS	1.14 - 1.62

257 ヲ所のほ場 (各 4 反復) で、100g の種子を供試し、分析した値の平均値 ± 標準誤差。

<sup>1</sup> 本組換えセイヨウナタネは、標準的な除草剤及び葉が 3~4 枚の段階でのイミダゾリノン系除草剤の散布 (35 g a.i./ha) による雑草防除管理を実施した。

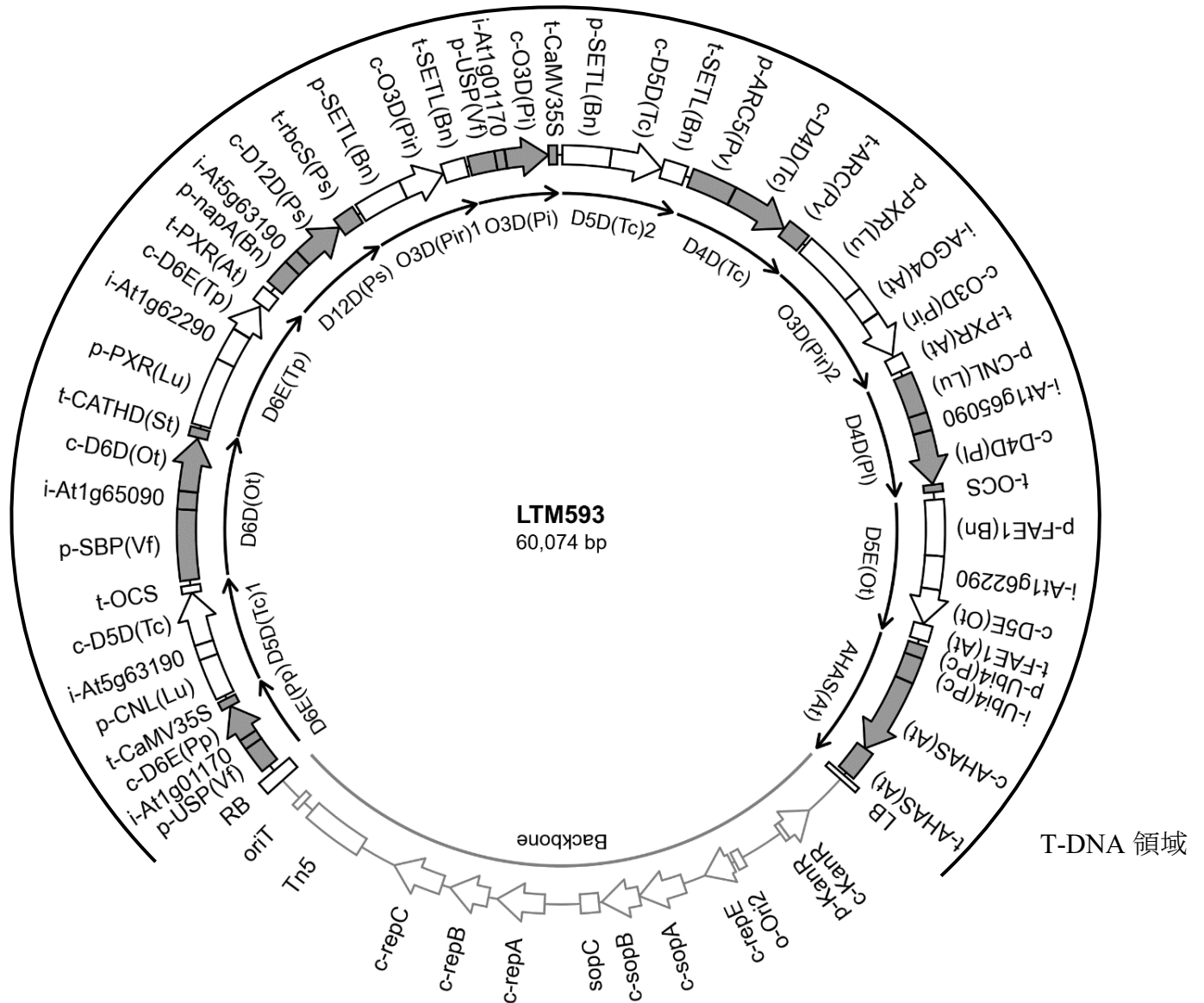
<sup>2</sup> 有意水準 5%において *t*-検定による有意差検定を行った。NS: 有意差なし。S: 有意差あり。

なお、本組換えセイヨウナタネで発現する AHAS(*At*) 蛋白質は、既に第一種使用規程の承認 (平成 25 年 3 月 27 日) を得ているイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズ CV127 が有する改変 *csr1-2* 遺伝子が産生する改変 AHAS 蛋白質の 122 番目のアラニンをトレオニン 5 に置換したものである。改変 AHAS 蛋白質は、これまでにイミダゾリノン系除草剤耐性を付与する以外に、宿主の生理学的又は生態学的特性に影響を及ぼしたとする報告はない。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

- 5 本組換えセイヨウナタネの作出に用いたベクターは、ベクターpCH20 を基に構築されたプラスミドLTM593である(図3, 別添資料1)。



10 図3 プラスミドLTM593地図

各蛋白質の遺伝子カセットは、内側の円に、カセット毎に細い矢印で示している。*D5D(Tc)* 及び *O3D(Pir)* 遺伝子は、同じ遺伝子が別々の遺伝子カセットに導入されており、これら 2 つの遺伝子発現カセットの名称に接尾番号が示されている。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

5

本組換えセイヨウナタネの作出に用いられたプラスミド LTM593 の全塩基数は 60,074 bp である。プラスミド LTM593 の構成要素は表 1 (p.8-14) に示した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

10

プラスミド LTM593 は、T-DNA 領域配列の外側に下記に示す機能を持つ配列を有する。なお、本組換えセイヨウナタネにはこれらの配列が導入されていないことが次世代シーケンス技術 (Next Generation Sequencing: NGS<sup>5</sup>) により確認されている。

15 ● *E. coli* 由来の F プラスミドの複製開始点 (*o-Ori2*)、複製開始遺伝子 (*c-repE*) 及びプラスミド分配遺伝子 (*c-sopA*、*c-sopB* 及び *sopC*)。 *c-repE*、*c-sopA*、*c-sopB* 及びシスエレメントである *sopC* にコードされている蛋白質は、*o-Ori2* 複製起点との組み合わせにより、*E. coli* 内で 300 kb までのプラスミドを安定に維持する (Murotsu *et al.*, 1984; Masson and Ray, 1986; Mori *et al.*, 1986; Shizuya *et al.*, 1992)。

20 ● *R. radiobacter* のプラスミド pTiC58 に由来するオペロン *repABC* (*c-repA*、*c-repB*、*c-repC*) (Li and Farrand, 2000)。 *repABC* 蛋白質は、プラスミドの分離と *R. radiobacter* の複製に寄与している (Oka *et al.*, 1981; Tabata *et al.*, 1989; Gerdes *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2012)。 接合伝達の起点 (*oriT*) は、プラスミドの転写が開始する位置にある (Marx and Lidstrom, 2001)。

25 ● プラスミド 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 及びそのプロモーターを有している。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合は、その宿主域に関する情報

30 プラスミド LTM593 の感染性は知られていない。

<sup>5</sup> 次世代シーケンス技術は、数千から数百万の DNA 分子を同時に配列決定可能な技術である。本解析は、Illumina HiSeq 機器を使用し、ゲノムをランダムに切断して多くの断片を作成し、それぞれの断片を増幅し、塩基配列を解析することで、全ゲノム領域の塩基配列が解読できる。これまでのサザンブロット法で得られる情報 (挿入箇所数、コピー数、ベクターの外骨格領域の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性) が NGS 解析及び相同性検索によって得られる。

### (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

#### イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

- 5 宿主内に移入されたプラスミド LTM593 の T-DNA 構成要素は、表 1 (p.8-14) に示した。

#### ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

- 10 プラスミド LTM593 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、非組換えセイヨウナタネの胚軸部分に導入した (De Block *et al.*, 1989)。

#### ハ 遺伝子組換え生物等の育成経過

- 15 ① 核酸が移入された細胞の選抜手法

形質転換を行った胚軸は、イミダゾリノン系除草剤の 1 つであるイマゼタピルを含む培地で選抜した。

- 20 ② 核酸の移入方法がアグロバクテリウム法の場合はアグロバクテリウムの菌体の残存の有無

- 本組換えセイヨウナタネの T<sub>3</sub> 世代 (図 4, p.36) のバルク種子において、無作為に抽出したサンプルから DNA を抽出した。T-DNA とプラスミド LTM593 の外骨格領域にまたがる位置を標的とする PCR 分析を行った。その結果、全てのサンプルにおいて標的とする増幅産物は検出されず、本組換えセイヨウナタネに形質転換に用いた *R. radiobacter* 菌体は存在しないことが確認された (別添資料 8)。

③ 核酸が移入された細胞から、移入された核酸の複製物の存在状態を確認した系統、隔離ほ場試験に供した系統その他生物多様性影響評価に必要な情報を収集するために用いられた系統までの育成の経過

5 形質転換後の胚軸において、イマゼタピルに耐性のある不定芽を選抜し、その後の培養を経て T<sub>0</sub> 世代の植物体を得た。T<sub>0</sub> 世代を自家受粉し、ホモ接合体の T<sub>1</sub> 世代を選抜した。育成の経過を図 4 (p.36) に示した。なお、本申請の対象の範囲は、T<sub>3</sub> 世代及びその後代である。

10 本組換えセイヨウナタネの我が国における承認の状況を表7に示す。

表 7 我が国における申請及び承認状況 (2022 年 6 月現在)

申請先	目的	申請及び承認状況
農林水産省・環境省	環境 <sup>1</sup> (隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為)	2020年6月承認
厚生労働省	食品 <sup>2</sup>	2020年6月申請
農林水産省	飼料 <sup>3</sup>	2020年6月申請

<sup>1</sup> 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律に基づく。

<sup>2</sup> 食品衛生法に基づく。

15 <sup>3</sup> 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律に基づく。



5

10

【社外秘情報につき非開示】

15

20

図4 本組換えセイヨウナタネの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5 次項のNGS解析により、本組換えセイヨウナタネにおいて、異なる染色体のそれぞれ1カ所(Locus 1及びLocus 2)に挿入された2つのT-DNA領域(Insert 1及びInsert 2)(図5, p.39)が組み込まれていることが確認された。

② 移入された核酸の複製物のコピー数及び移入された核酸の複製物の複数世代に  
10 おける伝達の安定性

本組換えセイヨウナタネに導入された導入遺伝子の挿入箇所数、コピー数、ベクターの外骨格領域の有無及び導入遺伝子の複数世代における伝達の安定性を調べるために、NGS、相同性検索並びに導入遺伝子領域のPCR及び塩基配列解析を行った  
15 (表8, p.38; 別添資料3及び4)。

本組換えセイヨウナタネ(T<sub>3</sub>世代: 図4, p.36)及び対照の非組換えセイヨウナタネから抽出したゲノムを断片化し、約125 bpの塩基配列を次世代シーケンサー(Illumina<sup>®</sup> HiSeq<sup>™</sup>)を用いて解析した。なお、本解析において、シーケンス深度<sup>6</sup>は  
20 平均で160以上だったため、十分なシーケンス深度が確保されていることが確認されている。

本組換えセイヨウナタネから得られたDNA断片のうち、導入用プラスミドと相同性があるDNA断片を選び、外骨格領域と相同性がある配列の有無を確認した結果、外骨格領域とは相同性が認められず、本組換えセイヨウナタネに外骨格領域は検出  
25 されなかった。更に、DNA断片の塩基配列の一部が導入用プラスミド及び宿主のゲノムと一致するものを、導入遺伝子と宿主のゲノムとの接合配列として選抜し、接合領域を特定した(split read解析)。本組換えセイヨウナタネでは4つの接合領域が特定され、特定された4つの接合領域の内2つはプラスミドLTM593のRBと、特定された4つの接合領域の残りの2つはプラスミドLTM593のLBと部分的に配列の一致  
30 が認められた。一方、対照の非組換えセイヨウナタネでは、接合領域は特定されなかった。よって、本組換えセイヨウナタネのゲノム中の2カ所にそれぞれ1コピーずつ、合計2コピーのT-DNA領域が組込まれており、外骨格領域は検出されなかった。

<sup>6</sup>シーケンス深度：同じ箇所を何回シーケンスしたかを表す尺度。シーケンス深度が75以上において、十分な検出が行えることが報告されている(Kovalic *et al.*, 2012)。

### Insert 1

Insert 1 は導入したプラスミド LTM593 が含む 13 の遺伝子発現カセット (図 3, p. 32; 表 1, p.8-14) を含んでいたが、2 塩基の置換が認められた (図 5 A, p.39)。ひとつは *c-D12D(Ps)* の翻訳領域において、シトシンがアデニンに塩基置換されており、その結果、*D12D(Ps)* 蛋白質においてはフェニルアラニンがロイシンにアミノ酸置換されていた。また、Insert 1 の *O3D(Pir)* のプロモーター *p-PXR(Lu)* において、別のシトシンからアデニンへの塩基置換が認められたが、この塩基置換によるアミノ酸の変化はなかった。

5  
10  
なお、Insert 1 は、RB の 5'側 184 bp と LB の 3'側 72 bp が欠失しており、RB の 5'側 64 bp において再配列が確認された。

### Insert 2

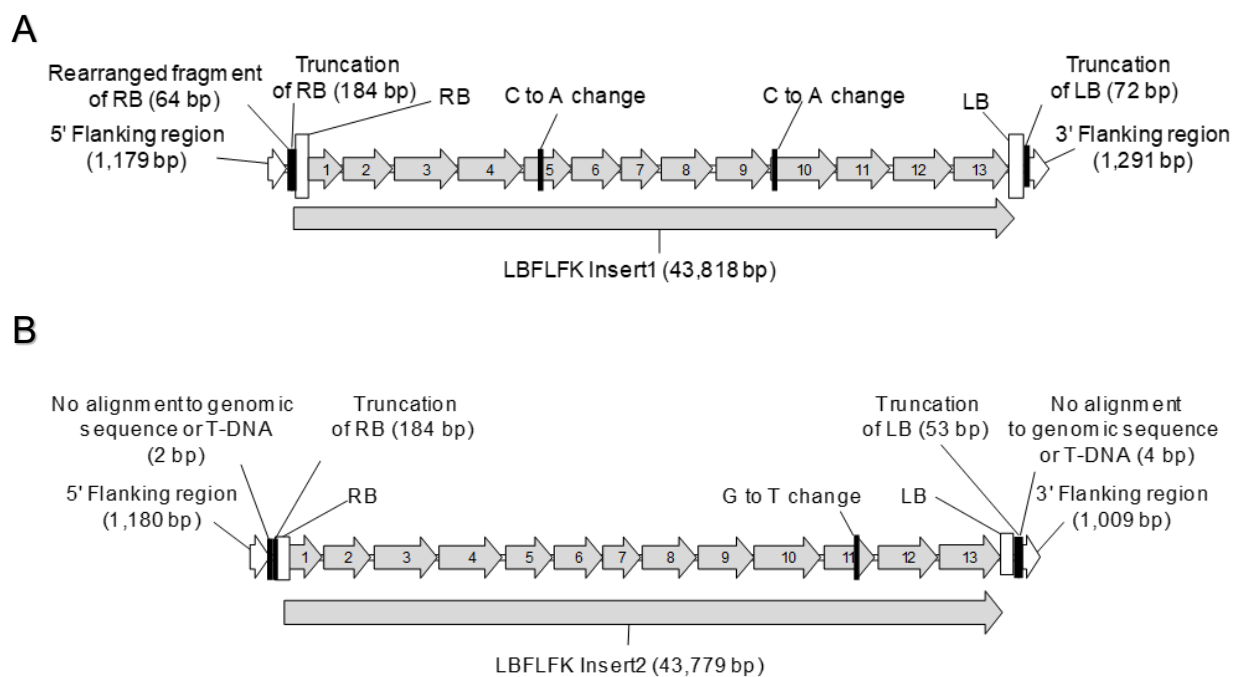
Insert 2 は導入したプラスミド LTM593 が含む 13 の遺伝子発現カセット (図 3, p. 32; 表 1, p.8-14) を含んでいたが、*c-D4D(Pl)* の翻訳領域内においてグアニンがチミンに塩基置換されており、その結果、*D4D(Pl)* 蛋白質においてアラニンがセリンにアミノ酸置換されていた (図 5 B, p.39)。また、Insert 2 は、RB の 5'側 184 bp と LB の 3'側 53 bp が欠失しており、Insert 2 の 5'末端側の最初の 2bp 及び 3'末端側の最後の 4 bp は、T-DNA 領域及び宿主ゲノム配列とは一致しなかった。

15  
20  
また、本組換えセイヨウナタネにおいて検出された接合領域及び T-DNA 領域を含む配列を PCR により増幅し、その配列を解析した結果、挿入 DNA の 5'側 (1179 bp) 及び 3'側 (1291 bp) の近傍配列は、宿主品種の挿入位置に隣接する配列と一致したが、Insert 1 において 8 bp が、Insert 2 において 31 bp の欠失が確認された。

25  
本組換えセイヨウナタネ内に挿入された T-DNA 領域の複数世代 (T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub> 及び T<sub>5</sub> 世代: 図 4, p.36) における安定性について、NGS のデータを用いて相同性検索を行った結果、特定された 4 つの接合領域は 3 世代において同じ箇所を確認され、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 (別添資料 4)。

30 表 8 遺伝子解析の要約

項目	結果
挿入箇所数	別々の染色体に 1 ヲ所ずつ、計 2 ヲ所。
コピー数	2 コピー。
外骨格領域の有無	検出されず。
挿入遺伝子の近傍配列の確認	セイヨウナタネゲノムと同一と確認された。



発現カセットを構成する遺伝要素

カセット	プロモーター	イントロン	翻訳領域	ターミネーター
1	p- <i>USP(Vf)</i>	i- <i>At1g01170</i>	c- <i>D6E(Pp)</i>	t- <i>CaMV35S</i>
2	p- <i>CNL(Lu)</i>	i- <i>At5g63190</i>	c- <i>D5D(Tc)1</i>	t- <i>OCS</i>
3	p- <i>SBP(Vf)</i>	i- <i>At1g65090</i>	c- <i>D6D(Ot)</i>	t- <i>CATHD(St)</i>
4	p- <i>PXR(Lu)</i>	i- <i>At1g62290</i>	c- <i>D6E(Tp)</i>	t- <i>PXR(At)</i>
5	p- <i>napA(Bn)</i>	i- <i>At5g63190</i>	c- <i>D12D(Ps)</i>	t- <i>rbcS(Ps)</i>
6	p- <i>SETL(Bn)</i>		c- <i>O3D(Pir)1</i>	t- <i>SETL(Bn)</i>
7	p- <i>USP(Vf)</i>	i- <i>At1g01170</i>	c- <i>O3D(Pi)</i>	t- <i>CaMV35S</i>
8	p- <i>SETL(Bn)</i>		c- <i>D5D(Tc)2</i>	t- <i>SETL(Bn)</i>
9	p- <i>ARC5(Pv)</i>		c- <i>D4D(Tc)</i>	t- <i>ARC(Pv)</i>
10	p- <i>PXR(Lu)</i>	i- <i>AGO4(At)</i>	c- <i>O3D(Pir)2</i>	t- <i>PXR(At)</i>
11	p- <i>CNL(Lu)</i>	i- <i>At1g65090</i>	c- <i>D4D(Pl)</i>	t- <i>OCS</i>
12	p- <i>FAE1(Bn)</i>	i- <i>At1g62290</i>	c- <i>D5E(Ot)</i>	t- <i>FAE1(At)</i>
13	p- <i>Ubi4(Pc)</i>	i- <i>Ubi4(Pc)</i>	c- <i>AHAS(At)</i>	t- <i>AHAS(At)</i>

図5 本組換えセイヨウナタネにおける Insert 1、Insert 2 及び近傍配列の概略図

近傍配列は白矢印とし、T-DNA 領域内の発現カセットは番号付きの灰色矢印で示している (番号 1 ~13)。黒の太線は、T-DNA 領域の配列がプラスミド LTM593 の配列と異なっている領域を示している。「G から T」はグアニンからチミンへの、「C から A」はシトシンからアデニンへの塩基置換を示している (A, B)。

- ③ 染色体上に複数コピーが存在している場合は、それらが隣接しているか離れているかの別

本組換えセイヨウナタネは、異なる染色体のそれぞれ1カ所 (Locus 1 及び Locus 2) に挿入された2つの T-DNA 領域 (Insert 1 及び Insert 2) を持つ。セイヨウナタネは、二倍体のアブラナ (*B. rapa*, AA) 及びキャベツ類 (*B. oleracea*, CC) の間で自然に種間交雑が発生し、四倍体種のセイヨウナタネ (*B. napus*, AACC) が成立したと考えられている (津田ら, 2016)。NCBI RefSeq *B. napus* データベースを使用して相同性検索を行った結果、本組換えセイヨウナタネの Insert 1 は C08、Insert 2 は C03 と報告されている Cゲノムを構成する染色体にそれぞれ組み込まれていることを確認した (社内報告書)。

- ④ (6)の①において具体的に示される特性について、自然条件の下での個体間及び世代間での発現の安定性

2015年及び2016年に米国の4試験地 (アイダホ州、ミネソタ州、モンタナ州、ノースダコタ州) で栽培された、本組換えセイヨウナタネ(T<sub>4</sub>及びT<sub>5</sub>世代: 図4, p.36) を用い、各組織及び各生育段階におけるそれぞれの蛋白質の発現量を測定した (別添資料5)。測定は、感受性、特異性及び再現性を考慮して ELISA 法又は定量的ウエスタンブロット法を用いた。ELISA 法は、D12D(*Ps*) 蛋白質、D6E(*Pp*) 蛋白質、D5D(*Tc*) 蛋白質及び D5E(*Ot*) 蛋白質に、定量的ウエスタンブロット法は、D6D(*Ot*) 蛋白質、D6E(*Tp*) 蛋白質、O3D(*Pir*) 蛋白質、O3D(*Pi*) 蛋白質、D4D(*Tc*) 蛋白質、D4D(*Pl*) 蛋白質及び AHAS(*At*) 蛋白質の発現量の決定に用いた。

その結果、T<sub>4</sub>世代において D6E(*Pp*) 蛋白質及び O3D(*Pi*) 蛋白質はいずれの組織においても発現が検出されなかったが、D12D(*Ps*) 蛋白質、D5D(*Tc*)蛋白質、D5E(*Ot*) 蛋白質、D6D(*Ot*) 蛋白質、D6E(*Tp*) 蛋白質、O3D(*Pir*) 蛋白質、D4D(*Pl*) 蛋白質及び D4D(*Tc*) 蛋白質は、未成熟及び/又は成熟種子内においてのみ検出された(表9及び10, p.42)。一方、T<sub>5</sub>世代においては、D6E(*Pp*) 蛋白質、D5D(*Tc*) 蛋白質、O3D(*Pi*) 蛋白質、D4D(*Tc*) 蛋白質及び D4D(*Pl*) 蛋白質は、未成熟及び/又は成熟種子内において発現が検出されなかった。また、AHAS(*At*) 蛋白質は、T<sub>4</sub>世代の成熟種子を除き全ての組織において定量された。なお、D6E(*Pp*)及びO3D(*Pi*)蛋白質はELISA法及び定量的ウエスタンブロット法を用いた際には検出限界以下であったが、免疫沈降法による濃縮後に行ったウエスタンブロット法では検出され(T<sub>3</sub>世代)、更に、LC-MS/MSにおいてもD6E(*Pp*)及びO3D(*Pi*)蛋白質は検出された(T<sub>3</sub>世代)。

また、本組換えセイヨウナタネに導入されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼによる EPA 及び DHA の増加について、T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> 世代の種子を用いて脂肪酸組成分析

を行った。その結果、導入されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼにより従来のセイヨウナタネには産生されない EPA 及び DHA が、本組換えセイヨウナタネに複数世代にわたり安定的に産生されていることが確認された (表 12, p.43)。

- 5 各組織及び世代において、導入された全てのデサチュラーゼ蛋白質及びエロンガーゼ蛋白質の発現はいずれかの方法により確認された (社内報告書)。本組換えセイヨウナタネにおける脂肪酸合成は供試種子や環境等により影響を受けるため蛋白質の発現は世代間で増減があったものの (社内報告書)、ELISA 法 (表 9 及び 10, p.42) により確認されなかった D6E(*Pp*)及び O3D(*Pi*)蛋白質が触媒する段階には D6E(*Tp*)及び
- 10 O3D(*Pir*)蛋白質がそれぞれの段階で補完しており、最終産物である EPA 及び DHA の複数世代にわたる安定的な産生が確認された (表 12, p.43)。

表9 本組換えセイヨウナタネ (T<sub>4</sub>世代) の各組織における導入した各蛋白質の発現量

組織	D12D( <i>Ps</i> )	D6D( <i>Ot</i> )	D6E( <i>Tp</i> )	D6E( <i>Pp</i> )	D5D( <i>Tc</i> )	O3D( <i>Pir</i> )	O3D( <i>Pi</i> )	D5E( <i>Ot</i> )	D4D( <i>Tc</i> )	D4D( <i>Pl</i> )	AHAS( <i>At</i> )
全植物体 ロゼット段階	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	16.27 ±6.62
全植物体 開花段階	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
葉 成熟段階の 初期	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	7.41 ±1.67
根 成熟段階の 初期	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.49 ±0.19
未成熟種子	3.72 ± 1.69	30.89 ±18.45	626.21 ±194.98	<LOD	<LOD	169.26 ±86.39	<LOD	<LOD	22.53 ±18.72	13.28 ±6.67	14.12 ±3.68
成熟種子	0.83 ± 0.23	41.80 ±16.11	915.86 ±276.98	<LOD	1.53 ±0.55	561.61 ±196.20	<LOD	15.36 ±3.63	10.88 ±3.71	4.03 ±2.29	<LOD

値は、平均±標準偏差(μg/g DW)で示す。DW：乾燥重、LOD：検出限界。LODは表11(p.43)に示す。

本組換えセイヨウナタネは、雑草防除のための標準的な除草剤管理と、葉が3~4枚の段階でのイミダゾリノン系除草剤除草剤の散布(35 g a.i./ha)が行われた。各組織は2015年に米国の4カ所(ミネソタ州、モンタナ州、アイダホ州、ワシントン州)のほ場で栽培された植物から採取した(n=20)。

表10 本組換えセイヨウナタネ (T<sub>5</sub>世代) の未成熟及び成熟種子における導入した各蛋白質の発現量

組織	D12D( <i>Ps</i> )	D6D( <i>Ot</i> )	D6E( <i>Tp</i> )	D6E( <i>Pp</i> )	D5D( <i>Tc</i> )	O3D( <i>Pir</i> )	O3D( <i>Pi</i> )	D5E( <i>Ot</i> )	D4D( <i>Tc</i> )	D4D( <i>Pl</i> )	AHAS( <i>At</i> )
未成熟種子	4.24 ± 2.77	27.13 ± 23.53	826.70 ± 261.32	<LOD	<LOD	86.54 ± 31.79	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ <sup>1</sup>	11.54 ± 3.53
成熟種子	0.80 ± 0.27	26.83 ± 9.16	682.75 ± 100.10	<LOD	<LOQ <sup>1</sup>	172.56 ± 51.18	<LOD	7.58 ± 2.56	<LOD	<LOQ <sup>1</sup>	3.31 ± 0.45

値は、平均±標準偏差(μg/g DW)で示す。DW：乾燥重、LOQ：定量限界。

本組換えセイヨウナタネは、雑草防除のための標準的な除草剤管理と、葉が3~4枚の段階でのイミダゾリノン系除草剤除草剤の散布(35 g a.i./ha)が行われた。

1. 測定値がLOQ以下だった場合は、LOQの値を用いて平均値を計算した。LOQ及びLODは表11(p.43)に示す。

各組織は2016年に米国の4カ所(ワシントン州、アイダホ州、モンタナ州、ノースダコダ州)のほ場で栽培された植物から採取した(n=20)。

表 11 本組換えセイヨウナタネ組織における導入した各蛋白質の発現量測定における定量限界 (LOQ) の値及び検出限界 (LOD) の値

	D12D( <i>Ps</i> )	D6D( <i>Ot</i> )	D6E( <i>Tp</i> )	D6E( <i>Pp</i> )	D5D( <i>Tc</i> )	O3D( <i>Pir</i> )	O3D( <i>Pi</i> )	D5E( <i>Ot</i> )	D4D( <i>Tc</i> )	D4D( <i>Pl</i> )	AHAS( <i>At</i> )
組織	LOQ (µg/g DW)										
	LOD (µg/g DW)										
全植物体 ロゼット段 階	5.22	110.81	252.15	29.25	98.50	409.99	303.07	22.90	16.55	29.70	8.96
	1.22	36.94	163.27	4.88	39.40	117.26	101.97	4.99	6.81	18.86	1.88
全植物体 開花段階	4.76	101.09	230.03	26.69	89.86	374.03	552.97	20.89	60.38	40.64	13.62
	1.11	33.70	148.95	4.45	35.94	106.97	186.06	4.55	24.83	25.80	1.72
葉 成熟段階の 初期	38.18	101.30	230.52	53.49	180.10	499.77	923.59	41.87	60.51	27.15	6.55
	8.93	33.77	149.26	8.91	72.04	142.93	310.76	9.13	24.89	17.24	1.38
根 成熟段階の 初期	0.64	54.54	62.05	14.40	24.24	784.77	149.17	9.39	16.29	21.93	0.39
	0.15	18.18	40.18	2.40	9.70	224.44	50.19	2.05	6.70	13.92	0.25
未成熟種子 成熟段階の 初期	2.97	15.77	448.51	16.65	28.03	87.51	19.03	13.03	8.83	5.63	6.12
	0.70	5.26	232.33	2.78	11.21	33.37	7.26	2.84	4.84	2.68	1.28
成熟種子	0.55	11.77	375.03	6.22	1.31	117.60	71.02	4.87	9.23	4.21	3.05
	0.13	3.92	242.83	1.04	0.52	37.37	27.08	1.06	3.80	2.00	0.64

値は、平均±標準偏差(µg/g DW)で示す。DW：乾燥重

表 12 複数世代を用いた EPA 及び DHA の分析結果

世代	EPA	DHA
T <sub>3</sub> 世代	7.21 ± 1.26	1.02 ± 0.18
T <sub>4</sub> 世代	6.27 ± 0.46	0.77 ± 0.12

値は、分析した値の平均値±標準誤差(総脂肪酸量に対する割合 (%))



- ⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝達される恐れのある場合は、当該伝達性の有無及び程度

本組換えセイヨウナタネは、伝達性のある DNA 配列を有しておらず、自然環境下  
5 において移入された核酸が野生動植物等に伝達されるおそれはない。

(5) 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

本組換えセイヨウナタネは、2 ヶ所の異なる遺伝子座に挿入されたそれぞれの挿  
10 入 DNA (Insert 1 及び Insert 2) に特異的なプライマーセットと TaqMan プローブを用  
いた real-time PCR 法により検出及び識別が可能である (別添資料 6)。

本法による両遺伝子座の検出限界は、ゲノム量比で 0.01% である。

本方法の信頼性は、4 施設において検証され、施設間互換性があることが確認さ  
れている。

15

(6) 宿主又は宿主が属する分類学上の種との相違

- ① 移入された核酸の複製物の発現により付与された生理学的又は生態学的特性の  
具体的内容

20

本組換えセイヨウナタネは、導入した 7 種類のデサチュラーゼ及び 3 種類のエロン  
ガーゼの発現により種子内の内在性脂肪酸であるオレイン酸から EPA 及び DHA を産  
生する。また、*AHAS(At)* 遺伝子の発現により *AHAS(At)* 蛋白質が産生され、イミダ  
ゾリノン系除草剤への耐性を示す。当該デサチュラーゼ及びエロンガーゼは脂肪酸  
25 合成経路にのみに働き、また、*AHAS(At)* 蛋白質は高い基質特異性を有しており、こ  
れらの蛋白質が他の代謝系経路と相互作用を示すことは報告されておらず、脂肪酸  
合成経路を除く宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。

更に、本組換えセイヨウナタネに導入した 10 の脂肪酸合成関連遺伝子のうち、9  
30 又は全てが導入された他の遺伝子組換えセイヨウナタネ系統において脂肪酸の測定  
を行った結果、想定された脂肪酸が合成され、脂肪酸合成経路において意図しない  
影響は認められなかった (表 13, p.45; Senger *et al.*, 2016)。

表 13 本組換えセイヨウナタネに導入した 9 又は全ての脂肪酸合成関連遺伝子及びイミダゾリノン系除草剤耐性遺伝子を導入し、脂肪酸の測定を行ったセイヨウナタネの系統及び酵素の組み合わせ

系統名 酵素	LBFDAU	LBFDGG	LBFDHG	LBFGKN	LBFIHE	LBFPRA
D12D( <i>Ps</i> )	X	X	X	X	X	X
D6D( <i>Ot</i> )	X	X	X	X	X	X
D6E( <i>Tp</i> )	X	X	X	X	X	X
D6E( <i>Pp</i> )	X		X	X	X	X
D5D( <i>Tc</i> )	X	X	X	X	X	X
O3D( <i>Pir</i> )	X	X	X	X	X	X
O3D( <i>Pi</i> )	X	X	X	X	X	X
D5E( <i>Ot</i> )	X	X	X	X	X	X
D4D( <i>Tc</i> )	X	X	X	X	X	X
D4D( <i>Pl</i> )	X	X	X	X	X	X
AHAS( <i>At</i> )	X	X	X	X	X	X

各系統に導入された酵素を X で示す。

5

② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え作物と宿主の属する分類学上の種との間の相違の有無及び相違がある場合はその程度

2020-2021 年にバイエルクロップサイエンス株式会社 明野事業所隔離ほ場 (以下、「隔離ほ場」とする) において本組換えセイヨウナタネの隔離ほ場試験を行った。試験には、本組換えセイヨウナタネの T<sub>8</sub> 世代を供試した (図 4, p.36)。対照の非組換えセイヨウナタネとして、本組換えセイヨウナタネの遺伝的背景品種である Kumily を用いた (以下、「非組換えセイヨウナタネ」とする。)。なお、交雑率を評価するための試験 (項目 f, p.47) は米国のほ場で実施した。

15 a 形態及び生育の特性

農林水産省の農林水産植物種類別審査基準 (なたね種) を参考に、発芽揃い、開花期、開花揃い、成熟期、草丈、一次分枝数、主茎着花数、主茎着莢数、子実の色、地上部重 (乾燥重)、の計 10 項目について本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネを比較した。花粉長径、花粉稔性、草丈、一次分枝数、主茎着花数、主茎着莢数、地上部重 (乾燥重)、一株子実収量、千粒重、裂莢率、収穫種子の発芽率に関しては統計処理を行い、発芽揃い、開花期、開花揃い、成熟期、子実の色に関しては観察結果を比較した。その結果、すべての項目において両系統間に統計学的有意差又は相違は認められなかった (別添資料 9 の表 2-3, p.4-5)。

25 b 生育初期における高温耐性

35°C・13 時間明条件下、30°C・11 時間の暗条件下における高温が本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの幼植物体に与える影響を経時的に調査した。

その結果、いずれの調査時においても両系統の幼植物体に高温の影響は確認されなかった(別添資料9の表4, p.6)。

c 成体の越夏性

- 5 本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネを収穫期後も栽培を続けたところ、2021年10月14日の観察時に、非組換えセイヨウナタネ1株の生存が確認されたものの、本組換えセイヨウナタネは夏季の栽培を通じて全ての株の枯死が認められたことから、本組換えセイヨウナタネは新たに越夏性を獲得していないものと考えられる(別添資料9のp.7)。

10

d 花粉の稔性及びサイズ

本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネから花粉を採取し、花粉長径及び花粉の充実度を比較した。その結果、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの花粉長径及び花粉の充実度に統計学的有意差は認められなかった

- 15 (別添資料9の表6, p.8)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

種子の生産量に関する項目として、農林水産省の農林水産植物種類別審査基準(なたね種)を参考に、一株子実収量及び千粒重を調査した。これらの項目について統計

- 20 処理を行った結果、一株子実収量及び千粒重の調査項目において本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9の表8, p.9)。

- 25 種子の脱粒性に関する項目として、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの裂莢率を調査した。その結果、両系統間の裂莢率に統計学的有意差がないことから、本組換えセイヨウナタネの種子の脱粒性は非組換えセイヨウナタネと同等であると考えられた(別添資料9の表8, p.9)。

- 30 休眠性及び発芽率に関する項目として、隔離ほ場において収穫した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの収穫種子を2週間風乾したもの及び収穫3か月後の種子の発芽率を調査した。その結果、系統間の発芽率に統計学的有意差は認められず、休眠性に差はなかった(別添資料9の表9, p.10)。なお、海外のほ場においては本組換えセイヨウナタネの発芽率が低くなる場合も報告されている。

35

#### f 交雑率

交雑率の評価試験は、2020年に米国(ミネソタ州)のほ場において実施した。本試験においては、非組換えセイヨウナタネ(Kumily)から1, 2, 4, 6 m離して本組換えセイヨウナタネ又は参照の非組換えセイヨウナタネ(CL 46H75 (Clearfield® *B. napus*))をそれぞれ花粉親として栽培し、非組換えセイヨウナタネ(Kumily)の収穫種子各440粒における交雑体の発生頻度を調査した。

交雑体の判定は、参照の非組換えセイヨウナタネを花粉親にした場合には、Clearfield®<sup>7</sup>のPM1及び/又はPM2の変異を、本組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合にはinsert1及び/又はinsert2をPCRを用いて調査し、本組換えセイヨウナタネと宿主品種の交雑率を算出した。

その結果、花粉親と種子親を1, 2, 4, 6 m離した場合の交雑率は、本組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合0.86, 0.17, 0.00, 0.06%、参照の非組換えセイヨウナタネを花粉親とした場合で3.18, 0.81, 0.17, 0.23%であり、距離が遠くなるにつれ、交雑率は低くなった(別添資料10のTable1及び2)。この交雑率は、いずれもこれまでに報告されているセイヨウナタネの他殖率(花粉親と種子親の距離が1m以内の場合において0.0121%~14.5%)(Beckie *et al.*, 2003; Ramsay *et al.*, 2003; Hüsken and Dietz-Pfeilstetter, 2007; Cai *et al.*, 2008)の範囲内であった。

#### g 有害物質の産生性

有害物質の産生性を調査するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った。

### 後作試験

隔離ほ場において収穫期まで約7ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの収穫後の根域土壌をそれぞれ採取し、その土壌を使用して検定作物としてダイコンを栽培し、発芽率、草丈及び乾物重について比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9の表10, p.12)。

### 30 鋤込み試験

隔離ほ場において収穫期まで約7ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの植物体の葉を収穫し、乾燥・粉砕して試料とした。これを重量約1%の割合で混和した土壌を使用し、検定作物としてダイコンを栽培し、発芽

<sup>7</sup> *B. napus* の *AHAS1* 遺伝子の 1874 番目に変異がある PM1 変異及び *AHAS3* 遺伝子の 1712 番目に変異がある PM2 変異を持つイミダゾリノン系除草剤耐性の非組換えセイヨウナタネ。

率、草丈及び乾物重を比較した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区間に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9の表11, p.13)。

## 5 土壌微生物相試験

隔離ほ場において収穫期まで約7ヶ月間栽培した本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区の土壌を採取し、希釈平板法により、糸状菌、放線菌及び細菌を計測した。その結果、いずれの項目についても本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネの試験区に統計学的有意差は認められなかった(別添資料9の表12, p.14)。

### 3. 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

#### (1) 使用等の内容

15

食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為

#### (2) 使用等の方法

20

\_\_\_\_\_

#### (3) 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集する方法

25

\_\_\_\_\_

#### (4) 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

30

緊急措置計画書を参照。

(5) 実験室等での使用等又は第一種使用等が予定されている環境と類似した環境での使用等の結果

5

(6) 国外での使用等に関する情報

本組換えセイヨウナタネの国外における申請状況を表14に示す。

表 14 本組換えセイヨウナタネの海外における申請状況 (2022年6月現在)

機関	安全性審査の種類	申請時期
米国農務省(USDA)	環境	2019年8月 承認
米国食品医薬品庁(FDA)	食品・飼料	2022年3月 承認
カナダ保健省(HC)	食品	2019年12月 承認
カナダ食品検査庁(CFIA)	環境・飼料	2019年12月 承認
韓国食品医薬安全省(MFDS)	食品	2018年9月 (審査中)
韓国農村振興庁(RDA)	環境・飼料	2018年9月 (審査中)

10

## 第二 項目ごとの生物学的多様性影響の評価

### 1. 競合における優位性

#### 5 (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

セイヨウナタネは我が国において、北海道や本州で河原や線路沿いでの群生や、主なナタネの輸入港並びにその周辺での生育が報告されている。一方で、我が国では長期にわたりセイヨウナタネの種子の輸入経験があるが、運搬の途中でこぼれ落ちたセイヨウナタネが野生動植物等の個体や個体群の維持に影響を及ぼしたとする報告はない。我が国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)ものの、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反面、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)。また、セイヨウナタネが自然環境下で優占する多年生草本と競合することはないと報告されている(OECD, 2012)。

実際に、わが国では、セイヨウナタネの輸入港周辺のモニタリング調査の結果から、遺伝子組換えセイヨウナタネの生育は、陸揚げ地点から一定範囲の道路沿いに限られ、年度毎の連続性もないことから、主に輸送中にこぼれ落ちた種子に由来し、その生育範囲は拡大していないと考えられている(農林水産省, 2021a)。さらに、遺伝子組換えセイヨウナタネと非遺伝子組換えナタネとの交雑体と推定された種子・植物体についても、後代の定着は確認されていない(独立行政法人 国立環境研究所, 2021)。

さらに、大規模にセイヨウナタネの商業栽培を行っている英国での調査において、人為的攪乱のない自然条件下で野生化したセイヨウナタネは 2~4 年で消滅すると報告されている(Crawley and Brown, 1995)。また、同じく英国で行われた 3 年間にわたるモニタリング調査において、ほ場から逸出して群生したと考えられるセイヨウナタネの個体群は 3 年目にはほぼ消滅したことが報告されている(Scott and Wilkinson, 1999)。

競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における高温耐性、成体の越夏性、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率をわが国の隔離ほ場において調査した結果、全ての項目において両系統間に相違又は統計学的有意差は認められなかった(第一. 2. (6). ②. a~f, p.45~47)。

本組換えセイヨウナタネは、AHAS(*Ai*) 蛋白質の発現によるイミダゾリノン系除草剤に耐性を示すが、本除草剤の使用が想定されにくい自然環境下において、イミダゾリノン系除草剤に耐性であることが、競合における優位性を高めることは考え難い。

また、デサチューラーゼ及びエロンガーゼの発現により EPA 及び DHA を含む  $\omega$ -3 長鎖多価不飽和脂肪酸が産生されるが、本形質は競合において優位に作用する形質ではないと考えられる。

- 5 以上のことから、本組換えセイヨウナタネについて競合における優位性に起因して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

10 \_\_\_\_\_

(3) 影響の生じやすさの評価

15 \_\_\_\_\_

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えセイヨウナタネにおける優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

20



## 2. 有害物質の産生性

### (1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

- 5 セイヨウナタネの種子には、ヒトと動物に有害とされているエルシン酸及びグルコシノレートを含むことが知られている (OGTR, 2017)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主品種である非組換えセイヨウナタネは、エルシン酸及びグルコシノレート含有量の低いカノーラ品種である。
- 10 本組換えセイヨウナタネに導入された脂肪酸合成酵素であるデサチュラーゼ及びエロンガーゼは脂肪酸合成経路においてのみ働くことが知られている (Shanklin and Cahoon, 1998, Leonard *et al.*, 2004) ことから、脂肪酸合成経路以外の宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられる。よって、新たな有害物質が産生された可能性について、本組換えセイヨウナタネにおいて新たに産生した脂肪酸及び影響を受けた既存の脂肪酸に限り検討した。なお、セイヨウナタネの葉で脂肪酸を測定した結果、多くの脂肪酸は検出限界以下であり測定された脂肪酸は9種で、その含有量は本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネにおいては同程度であった (表 5, p.29; 添付資料 7)。つまり、本組換えセイヨウナタネの葉を野生動物や昆虫が摂食することは、非組換えセイヨウナタネの葉を摂食することと同じであると考えられたため、本組換えセイヨウナタネの種子が新たに産生した脂肪酸及び影響を受けた既存の脂肪酸が野生動物及び昆虫に与える影響を検討した。

- 本組換えセイヨウナタネの種子において新たに産生した脂肪酸及び影響を受けた既存の脂肪酸 (表 4, p.27-28) が野生動物及び昆虫に対して影響を及ぼす可能性は、それを摂餌する可能性のある野生動物及び昆虫に限られる。日本におけるナタネの害虫には、モンシロチョウ (アオムシ)、コナガ、ワタアブラムシ、ハモグリバエがある (独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター、2008 ; 本田、2014)。また、米国におけるナタネの莢及び種子を摂餌する主な昆虫には、キャベツサヤゾウムシ (*Ceutorhynchus assimilis* (Paykull))、バーサーミーワーム (英名 : Bertha armyworm)、ノミハムシ (*Phyllotreta cruciferae* Goeze)、キスジノミハムシ (*Phyllotreta striolata* (F.))、サビイロメクラガメ (*Lygus lineolaris*)、コナガ (*Plutella xylostella* (Linnaeus))、アブラムシやバッタ等がある (Weiss *et al.*, 2022)。いずれも農家にとっては害虫であるが、本組換えセイヨウナタネがこれらの害虫に影響を与える可能性があると考えられた。
- 35 昆虫は、植物の種子中に存在する脂肪酸を含む様々な脂肪酸を消費、産生することが知られている (Turunen, 1974; Stanley-Samuelson *et al.*, 1988; Fontaneto *et al.*, 2011; Tzompa-Sosa *et al.*, 2014)。例えば、本組換えセイヨウナタネに含まれているリノール

酸、 $\alpha$ -リノレン酸、 $\gamma$ -リノレン酸、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、アラキドン酸、EPA は、コオロギ(バッタ目)、ハチミツガ(チョウ目)、mealworm beetle(コウチュウ目)、ゴキブリ(ゴキブリ目)が含有していることが確認され、それらの生理学的役割が評価されている(Stanley-Samuelson and Dadd, 1983; Stanley-Samuelson *et al.*, 1988)。また、セイヨウナタネの害虫であるツマジロクサヨトウ(*Spodoptera frugiperda*)やキャベツルーパー(*Trichoplusia ni*)においても、本組換えセイヨウナタネの種子中に存在する EPA を含むいくつかの脂肪酸を含有していることが確認されており(Stanley-Samuelson *et al.*, 1986)、昆虫は EPA 及び DHA を含む長鎖脂肪酸を消費、産生することが示唆された。また、近年 $\omega$ -3 デサチュラーゼは節足動物や環形動物を含む多くの生物種において確認されており(Kabeya *et al.*, 2018)、陸生の無脊椎動物においても $\omega$ -3 長鎖脂肪酸を産生する能力があることが示唆されている。

本組換えセイヨウナタネにおいて新規に産生された脂肪酸(表 4, p.27-28)のうち、EPA 及び DHA は主に魚類(サケ、マグロ、マスなど)及び貝類・甲殻類(ムラサキイガイ、カキ、カニなど)を含む海産物を通してヒト等に摂食されている(Blasbalg *et al.*, 2011; Kitessa *et al.*, 2014)。海産物に含まれている EPA 及び DHA 以外の脂肪酸としては、ステアリン酸(Passi *et al.*, 2002)、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸、ビスホモステアリン酸(Ghioni *et al.*, 2002)、アラキドン酸(FAO, 2010)、C22:4n-3(Alasalvar *et al.*, 2002)、アドレン酸(Li *et al.*, 2011)、及びクルパノドン酸(USDA, 2017)がある。動物組織及びアヒルの卵又は鶏卵に含まれる脂肪酸としては、エイコサトリエン酸(Moreno *et al.*, 2007)、ジホモリノレン酸(FAO, 2010)、ミード酸(Wang *et al.*, 2014)、ビスホモステアリン酸(FAO, 2010)、アラキドン酸(FAO, 2010)、アドレン酸(FAO, 2010)及びオスボンド酸(FAO, 2010; Li *et al.*, 2011)、C18:2n-9(Adkisson *et al.*, 1991)、C20:2n-9(Forrester-Anderson *et al.*, 2006)がある。

また、本組換えセイヨウナタネが含有する脂肪酸量を、非組換えセイヨウナタネと比較した結果、長鎖多価不飽和脂肪酸の生産における主要な前駆体であるオレイン酸含量は本組換えセイヨウナタネにおいて統計学的に有意に低く、リノール酸含有量は本組換えセイヨウナタネにおいて統計学的に有意に高かった。これらは商業品種の範囲及び ILSI 構成成分データベースの変動の範囲を超えていたものの、一般の植物由来の食用油(オレイン酸:大豆油、リノール酸:食用ひまわり油)の範囲内であり(公益財団法人日本油脂検査協会, 2017)、これまでにヒトが食経験がある量であると考えられた。また、これらの植物油の元となる植物において、これまでに動物や昆虫が摂食したことがあるオレイン酸及びリノール酸量であると考えられた。

更に、本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸の含有量は、非組換えセイヨウナタネと比べ統計学的に有意に高く、商業品種の変動範囲を超えていた。本組換えセイヨウナタネにおいては、非組換えセイヨウナタネと比較して二重結合をもつ脂肪酸が多く存在するため、それらがトランス型になる可能性がある。本組換えセイヨウナタネ種子が産生するトランス脂肪酸は少量であるが、本組換えセイ

ヨウナタネがナタネの種子を食害する動物及び昆虫に摂食された場合、本組換えセイヨウナタネの種子で非組換えセイヨウナタネより増加したトランス脂肪酸が、野生動物及び昆虫に与える影響を以下に考察した。

5 本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が動物に与える影響については、ラットへの投与試験を用いて考察した。本組換えセイヨウナタネの精製油を 3 ml (2.76 g)/kg/day の用量で 28 日間反復経口投与した結果、いずれの検査項目においても毒性徴候は示さず、本組換えセイヨウナタネの油をラットが摂食しても安全であることを示した (Andre *et al.*, 2019)。よって、野生動物においても、本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸が影響を及ぼすことはないと考えられた。

10 本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が昆虫に与える影響については、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネを野外において栽培し、訪れる昆虫を含む節足動物及びミミズを同定し、数える調査を行った。具体的には、2015年に米国の 3 つのほ場 (ミネソタ州、サウスダコダ州、アイダホ州) において、本組換えセイヨウナタネ、対照の非組換えセイヨウナタネ (Kumily) 及び商業品種を栽培し、それぞれの植物体及びその周辺に訪れる節足動物及びミミズを捕獲して調査した (別添資料 11)。その結果、合計で 65,251 個体の節足動物 (13 目(コウチュウ目、鱗翅目、双翅目、半翅目、トビムシ目、膜翅目、アミメカゲロウ目、アザミウマ目、ハサミムシ目、カゲロウ目、直翅目、トンボ目、クモ目)、16 科) が同定され (別添資料 11 の p.18 及び Table 21, p.38)、非組換えセイヨウナタネの栽培区と比較して、本組換えセイヨウナタネの栽培区は節足動物及びミミズの多様性に影響はなかった。ただし、ノミハムシの数が、非組換えセイヨウナタネ栽培区より本組換えセイヨウナタネ栽培区において多い時期が見られたほ場があったが、セイヨウナタネの生育時期や複数のほ場にわたっての一貫性はなかった。よって、本試験において観察及び調査した項目において、非組換えセイヨウナタネと本組換えセイヨウナタネ栽培区に見られる生物学的に有意な一貫した傾向はなかったため、本組換えセイヨウナタネの栽培が昆虫に影響を及ぼさないと結論した。

更に、本組換えセイヨウナタネのトランス脂肪酸量が昆虫に与える影響については、モデル昆虫であるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) にトランス脂肪酸量を増減させた餌を与えた給餌試験 (Meichtry *et al.*, 2020) を元に考察した。本実験に使用したコントロール餌 (regular diet) は、9.1%の脂肪酸 (餌の総重量に対しての含有量) の内 0.16%がトランス脂肪酸であった。本実験に使用した最もトランス脂肪酸量が高い餌には、38.97%の脂肪酸 (餌の総重量に対しての含有量) の内 4.91%のトランス脂肪酸が含まれていた。この高濃度のトランス脂肪酸を含む餌を与えたショウジョウバエは高い死亡率 (給餌開始後 7 日目に約 75%) を示したが、コントロール餌 (regular diet) を与えたショウジョウバエの死亡率 (給餌開始 7 日後に約 12%) が最も低かった。本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸量は総脂肪酸中の 0.27%

であり、本実験で使用したコントロール餌 (regular diet) における総トランス脂肪酸は総脂肪酸中の 1.75% であるため、本組換えセイヨウナタネにおける総トランス脂肪酸量より低い。したがって、昆虫が本組換えセイヨウナタネを摂餌した際にトランス脂肪酸が昆虫に与える影響は更に低いと考えられた。

5

以上より、従来のセイヨウナタネと比べ、本組換えセイヨウナタネ種子において統計学的に有意に増減したリノール酸、オレイン酸及びトランス脂肪酸含量は野生動物及び昆虫が摂食しても影響を及ぼさない量であると考えられた。

- 10 AHAS 蛋白質は、植物及び微生物のバリン、ロイシン、及びイソロイシンのアミノ酸生合成経路でのみ働いている特異的な代謝酵素である (Delfourne *et al.*, 1994)。2分子のピルビン酸を縮合してアセト乳酸を生成する反応、及びピルビン酸1分子と2-ケト酪酸1分子を縮合して、2-アセト-2-ヒドロキシ酪酸を生成する反応を触媒し、基質特異性は高い (Singh and Shaner, 1995; Duggleby and Pang, 2000)。

15

また、本組換えセイヨウナタネに導入された遺伝子により発現するデサチュラーゼ、エロンガーゼ及び AHAS(*At*) 蛋白質は、既知アレルゲンと相同性がないことを確認した。

- 20 更に、実際に、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性を比較するため、隔離ほ場試験において、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行った結果、いずれの試験においても、本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの試験区の上に統計学的有意差は認められなかった(第一. 2. (6). ②. g, p.47-48)。

25

以上より、本組換えセイヨウナタネが新たに有害物質の産生性を獲得したとは考え難く、有害物質の産生性に関して影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

- 30 (2) 影響の具体的内容の評価
-

(3) 影響の生じやすさの評価

---

5 (4) 生物多様性影響が生じるおそれの有無等の判断

以上のことから、本組換えセイヨウナタネの有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

10 3. 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物の特定

我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生し  
15 ていないため、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物  
は特定されなかった。

なお、我が国に分布する近縁種のうち、セイヨウナタネと交雑可能な近縁種とし  
て、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* が挙げら  
れるが、いずれも我が国に帰化した外来種である (OECD, 2012; OGTR, 2017; 環境省,  
20 2002; 中井, 2003; 農林水産省, 2021a)。

(2) 影響の具体的内容の評価

---

25

(3) 影響の生じやすさの評価

---

30 (4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

以上のことから、交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断  
した。

#### 4. その他の特性

第二、3、(1)に挙げた我が国において自生するセイヨウナタネ及びその近縁種はいずれも外来種であり、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある我が国在来の野生動植物等としては特定されなかった。しかし、本組換えセイヨウナタネが、我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種が交雑した際に生ずる可能性のある間接的な影響として、以下の2点が考えられた。

- [1] 雑種後代が優占化して他の野生動植物種を駆逐する。
- [2] 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷により、近縁種の個体群数が減少し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす。

[1] 雑種後代が優占化して他の野生動植物種を駆逐する可能性。

15 本組換えセイヨウナタネと外来近縁種との交雑性及び種間雑種が優占化する可能性を検討した。

第一、1、(3)、ニ、③に示したように、セイヨウナタネは我が国に分布する近縁種である *B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* と交雑可能である。雑種後代に関して、F<sub>1</sub> 個体では稔性が低くなるが、戻し交雑をした場合は稔性が回復するという報告がある (津田ら, 2016)。これらの内、*B. rapa* 及び *B. juncea* は、自然条件下で交雑する可能性がある (OECD, 2012; 農林水産省, 2021a) が、交雑し雑種を形成するためには、親植物同士の物理的距離、花粉の飛散距離及び寿命、開花期の同調性、親植物の栽培方法、花序組織の特性、花粉の交雑和合性及び他の植物の花粉との競合性等の種々の生殖的隔離障壁が存在すること (OECD, 2012) から、自然条件下で雑種後代が優占化する可能性は低く、雑種後代が他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられる。仮に、本組換えセイヨウナタネが我が国の自然環境下でこれら近縁種と交雑しても、その交雑率は低く、形成された雑種の稔性も低下すると考えられる。

30 以上から、本組換えセイヨウナタネ系統がセイヨウナタネや外来近縁種と交雑し、自然環境下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は、従来のセイヨウナタネと同様に低いと考えられる。

[2] 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷により、近縁種の個体群数が減少し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性。

5 第二の 1 及び 2 並びに 4 [1] で示したように、本組換えセイヨウナタネは、競合における優位性及び有害物質の産生性並びに雑種後代が優占化して他の野生動植物種を駆逐する可能性は、非組換えセイヨウナタネと相違ないと考えられた。

また、本組換えセイヨウナタネは、イミダゾリノン系除草剤に対する耐性を付与する *AHAS(At)* 遺伝子を有するが、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中  
10 に移入したとしても負荷にならないという報告 (Crawley *et al.*, 1993; Snow *et al.*, 1999) があることから、イミダゾリノン系除草剤が散布されることが想定されない自然条件下において、*AHAS(At)* 遺伝子がもたらす負荷が種間雑種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

15 以上から、本組換えセイヨウナタネと我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の交雑により間接的に生物多様性影響が生じるおそれはないと判断した。

### 第三 生物多様性影響の総合的評価

競合における優位性：

5 セイヨウナタネは、我が国において長期にわたる栽培等の経験があるが、自然環境下において雑草化した例は報告されていない。

競合における優位性に関わる形質として、形態及び生育の特性、生育初期における高温耐性、成体の越夏性、花粉の充実度及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び収穫種子の発芽率を隔離ほ場試験において比較検討した結果、両系統間に統計学的有意差は認められなかった。

10 本組換えセイヨウナタネはイミダゾリノン系除草剤耐性を有するが、自然環境下において除草剤が選択圧となる状況は想定し難く、この形質が競合における優位性を高めることはないと考えられた。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネは競合における優位性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

15

有害物質の産生性：

従来のセイヨウナタネの種子中にはヒト及び動物に有害と考えられるエルシン酸及びグルコシノレートが含まれている。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主は、品種改良により両物質の含有量が低いカノーラ品種である。

20 これまでにセイヨウナタネが他感物質等のような野生動植物等に影響を及ぼす有害物質を産生するという報告はない。

有害物質の産生性について、隔離ほ場において後作試験、鋤込試験及び土壌微生物相試験を実施した結果、いずれの試験においても本組換えセイヨウナタネと非組換えセイヨウナタネの試験区の間で統計学的有意差は認められなかった。

25 また、本組換えセイヨウナタネが遺伝子組換えにより新たに発現するデサチュラーゼ、エロンガーゼ及び AHAS(*At*) 蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知のアレルゲンと相同性も認められなかった。さらに、本組換えセイヨウナタネの脂肪酸組成の結果から、デサチュラーゼ及びエロンガーゼの発現により影響を受けた脂肪酸以外に、宿主の代謝系に影響して新たな有害物質が産生されることはないと考えられる。

30 本組換えセイヨウナタネに存在する新規に産生された脂肪酸は、これまでにヒトが摂取した経験があり、他の生物及び食物内に存在するものである。よって、ヒト及び他の生物に対して食物暴露及び環境暴露が長い間繰り返し生じてきたことを示している。また、本組換えセイヨウナタネの種子を摂餌する可能性のある昆虫にお



いても、EPA を含むいくつかの脂肪酸が確認されており、EPA 及び DHA を含む長鎖脂肪酸を消費、産生することが示唆されている。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断した。

5

交雑性：

我が国において、セイヨウナタネと交雑可能な我が国在来の近縁野生種は自生していないため、本組換えセイヨウナタネの交雑性に起因して生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

10

その他の特性：

我が国に自生するセイヨウナタネの交雑可能な外来近縁種として、*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* が挙げられる。本組換え

15 ① 雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性、② 交雑により浸透した導入遺伝子がもたらす遺伝的負荷によって近縁種の個体群が縮小し、それらに依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に影響を及ぼす可能性が考えられるため、既知の知見に基づき検討を行った。

20 セイヨウナタネと外来近縁種の交雑及び雑種が優占化する可能性については、第二、4、①に示したように、種々の生殖的隔離障壁が存在することから、自然条件下で雑種後代が優占化して他の野生植物種の個体群を駆逐する可能性は極めて低いと考えられた。

25 競合における優位性及び有害物質の産生性は、非組換えセイヨウナタネと相違ないと考えられた。導入遺伝子がもたらす負荷が我が国に自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性については、除草剤耐性遺伝子が交雑により近縁種のゲノム中に移入したとしても負荷にならないという報告があることから、本組換えセイヨウナタネに導入された *AHAS(At)* 遺伝子も同様であると考えられた。したがって、除草剤を散布することを想定しない自然条件下では、*AHAS(At)* 遺伝子がもたらす負荷が交雑した近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。よって、導入遺伝子がもたらす負荷が、交雑した我が国

30 自生するセイヨウナタネ及び外来近縁種の個体群の維持に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

35 以上を総合的に評価し、本組換えセイヨウナタネを第一種使用規程に従って使用した場合に、我が国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと判断した。

## 参考文献

- 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.
- 5 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.
- 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.
- 10 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.
- 15 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.
- Bates, P. D., Stymne S., Ohlrogge, J. 2013. Biochemical pathways in seed oil synthesis. *Current opinion in plant biology* 16, 358-364.
- 20 Bauer, J., Senger, T. 2010. Promoters from *Brassica napus* for seed specific gene expression. Patent WO2010000708, World Intellectual Property Organization.
- 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.
- 25 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.
- Beckie, H. J., Warwick, S. I., Nair, H., *et al.* (2003). Gene flow in commercial fields of herbicide-resistant canola (*Brassica napus*). *Ecol. Appl.*, **13**, 1276– 1294.
- 30 Bing, D. J., Downey, R. K., Rakow, G. F. W. 1996 Hybridizations among *Brassica napus*, *B. rapa* and *B. juncea* and their two weedy relatives *B. nigra* and *Sinapis arvensis* under open pollination conditions in the field. *Plant Breeding* 115, 470-473.
- 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.
- 35 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.

5 Cai, L., Zhou, B., Guo, X., Dong, C., Hu, X., Hou, M., Liu, S. 2008. Pollen-mediated gene flow in Chinese commercial fields of glufosinate-resistant canola (*Brassica napus*). *Chin. Sci. Bull.* 53, 2333.

CFIA, 2012, online. The biology of *Brassica napus*, L. (canola/rapeseed).  
10 (<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/brassica-napus-l-/eng/1330729090093/1330729278970>) (閲覧日 2018年 11月 21日)

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.

15 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.

Chèvre, A. M., Eber, F., Darmency, H., Fleury, A., Picault, H., Letanneur, J. C., Renard, M., 2000 Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theor Appl Genet* 100, 1233-1239.

20 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.

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  
25 carboxylase. *EMBO Journal* 3, 1671.

Crawley, M. J., Hails, R. S., Rees, M., Hohn, D., Buxton, J. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature* 363, 620-623.

30 Crawley, M. J., Brown, S. L. 1995 Seed Limitation and the Dynamics of Feral Oilseed Rape on the M25 Motorway. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 259, 49-54.

De Block, M., De Brouwer, D., and Tenning, P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the *bar* and *neo*  
35 genes in the transgenic plants. *Plant Physiology* 91, 694-701.

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

- Domergue, F., Abbadi, A., Zähringer, U., Moreau, H., Heinz, E. 2005. *In vivo* characterization of the first acyl-CoA  $\Delta$  6-desaturase from a member of the plant kingdom, the microalga *Ostreococcus tauri*. *Biochemical Journal* 389, 483-490.
- Duggleby, R. G., Pang, S. S. 2000. Acetohydroxyacid synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 33, 1-36.
- Duwenig, E., Loyall, L. P. 2006. Expression cassettes for seed-preferential expression in plants. Patent WO2006089950 A2, World Intellectual Property Organization.
- 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.
- FAO, 2010. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- FAO, 2022, online. FAOSTAT. (<http://www.fao.org/faostat/en/#home>) (閲覧日 2022年5月16日)
- Flock, MR, Harris, WS., Kris-Etherton PM, 2013. Long-chain omega-3 fatty acids: time to establish a dietary reference intake. *Nutrition Reviews* 71, 692-707.
- Fontaneto, D., Tommaseo-Ponzetta, M., Galli, C., Risé, P., Glew, R. H., Paoletti, MG. 2011. *Differences in Fatty Acid Composition between Aquatic and Terrestrial Insects Used as Food in Human Nutrition*. *Ecology of Food and Nutrition* 50, 351-367.
- Forrester-Anderson, I. V., 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.
- Gebauer, SK, Psota TL, Harris, WS., Kris-Etherton, PM., 2006. n-3 fatty acid dietary recommendations and food sources to achieve essentiality and cardiovascular benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 83, S1526-1535S.
- Gerdes, K., Møller - Jensen, J., Jensen, R. B., 2000. Plasmid and chromosome partitioning: Surprises from phylogeny. *Molecular Microbiology* 37, 455-466.
- 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 F<sub>2</sub>  $\alpha$  (PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ ) from 20:4n-6 (arachidonic acid). *Fish Physiology and Biochemistry* 27, 81-96.
- 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.
- 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.

- 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.
- Guéritaine, G., Bonavent, J. F., Darmency, H. 2003. Variation of prezygotic barriers in the interspecific hybridization between oilseed rape and wild radish. *Euphytica* 130, 349-353.
- 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.
- Han, J., Lühs, W., Sonntag, K., Zähringer, U., Borchardt, D. S., Wolter, F. P., Heinz, E., Frentzen, M. 2001. Functional characterization of  $\beta$ -ketoacyl-CoA synthase genes from *Brassica napus* L. *Plant Molecular Biology* 46, 229-239.
- 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.
- Haslam, T. M. and Kunst, L. 2013. Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation. *Plant Science* 210, 93-107
- 15 Haslekås, C., Stacy, R. A., Nygaard, V., Culiáñez-Macià, FA., Aalen, RB. 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.
- Hauser, T. P., Jorgensen, R. B., Ostergard, H. 1998 Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity* 81, 436-443.
- 20 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.
- Helsberg, 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.
- 25 Hüsken, A., & Dietz-Pfeilstetter, A. 2007. Pollen-mediated intraspecific gene flow from herbicide resistant oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Transgenic Res.*, 16, 557– 569.  
<https://doi.org/10.1007/s11434-008-0305-6>
- 30 ILSI, 2016, online. International Life Sciences Institute Crop Composition Database, Version 6. (閲覧日 2017年5月15日). <https://www.cropcomposition.org/>
- Jørgensen, R., Andersen, B., Landbo, L., Mikkelsen, T. R. 1996. Spontaneous hybridization between oilseed rape (*Brassica napus*) and weedy relatives. *Acta Hort.* (ISHS) 407, 193-200.
- 35 Kabeya, N., Miguel, M., Fonseca, David. K., K. Ferrier, Juan C. Navarro, Line K. Bay, David S. Francis, Douglas R. Tocher, L. Fillipe C. Castro, Oscar Monroig, 2018. Genes for de novo biosynthesis of omega-3 polyunsaturated fatty acids are widespread in animals. *Science Advances*, 4, 1-8

- Kawalleck, P., Somssich, I. E., Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B. 1993. Polyubiquitin gene expression and structural properties of the *ubi4-2* gene in *Petroselinum crispum*. *Plant Molecular Biology* 21, 673-684.
- 5 Kitessa, S. M., Abeywardena, M., Wijesundera, C., Nichols P. D. 2014. DHA-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.
- 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  
10 modern biotechnology. *Plant Genome* 5, 149-163.
- Kris-Etherton, PM, Grieger, JA., Etherton, TD. 2009. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 81, 99-104.
- 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.
- 15 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.
- Li, G., Sinclair, A. J., 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.  
20 *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 1871-1881.
- 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.
- Marx, C. J., Lidstrom, M. E. 2001. Development of improved versatile broad-host-range  
25 vectors for use in methylotrophs and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 147, 2065-2075.
- Masson, L., Ray, D. S. 1986. Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: Different complexes of the initiator/repressor protein are bound to its operator and to an F plasmid replication origin. *Nucleic Acids Research* 14, 5693-5711.
- 30 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.
- Meichtry, L. B., Poetini, M. R., Dahleh, M. M. M., Araujo, S. M., Musachio, E. A. S., Bortolotto, V. C., Couto, S. de F., Somacal, S., Emanuelli, T., Cristofari, M., Roehrs, R., Gueea, G. P.,  
35 Prigol, M. 2020. Addition of saturated and trans-fatty acids to the diet induces depressive and anxiety-like behaviors in *Drosophilla melanogaster*. *Neuroscience* 443: 164-175.

- 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.
- Mori, H., Kondo, A., Ohshima, A., Ogura, T., Hiraga S. 1986. Structure and function of the F  
5 plasmid genes essential for partitioning. *Journal of Molecular Biology* 192, 1-15.
- 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.
- Nakabayashi, K., Okamoto, M., Koshihara, T., Kamiya, Y., Nambara, E. 2005. Genome - wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: Epigenetic and genetic  
10 regulation of transcription in seed. *Plant Journal* 41, 697-709.
- 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.
- 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.
- 15 NIH, 2018. Omega-3 Supplements: In Depth  
<https://nccih.nih.gov/health/omega3/introduction.htm> (閲覧日 2018年11月21日)
- Nishizawa, T., Tamaoki, M., Aono, M., Kubo, A., Saji, H., Nakajima, N. 2010. Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of genetically modified oilseed rape  
20 in Japan. *GM Crops* 1, 143-156.
- OECD, 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (Oilseed rape). Series on harmonization of regulatory oversight in biotechnology No.7. OECD Environmental Health and Safety publications.
- OECD, 2011. Revised consensus document on compositional considerations for new varieties  
25 of low erucic acid rapeseed (canola): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants.
- OECD, 2012. Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* spp.).
- OGTR, 2011. The Biology of *Brassica napus* L. (canola).
- OGTR, 2017. The Biology of *Brassica napus* L. (canola) and *Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard).
- 30 Oka, A., Sugisaki, H., Takanami, M. 1981. Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *Journal of Molecular Biology* 147, 217-226.
- 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.
- 35 Pinto, U. M., Pappas, K. M., Winans, S. C. 2012. The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nature Reviews Microbiology* 10, 755-765.

- 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.
- 5 Ramsay, G, Thompson C, Squire G. Quantifying landscape-scale gene flow in oilseed rape. Final Report of DEFRA Project RG0216, An experimental and mathematical study of the local and regional scale movement of an oilseed rape transgene. 2003
- Rantio-Lehtimäki, A. 1995 Aerobiology of pollen and pollen antigens. In: Cox, C.S., Wathes, C.M. (Eds.), *Bioaerosols Handbook*. Taylor & Francis, 387-406.
- 10 Rask, L., Ellerström, M., Ezcurra I., Stålberg, K., Wycliffe, P. 1998. Seed-specific regulation of the napin promoter in *Brassica napus*. *Journal of Plant Physiology* 152, 595-599.
- Rieger, M. A., Potter, T. D., Preston, C., Powles, S. B. 2001 Hybridisation between *Brassica napus* L. and *Raphanus raphanistrum* L. under agronomic field conditions. *Theor Appl Genet* 15 103, 555-560.
- 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.
- Salem, N., Eggersdorfer, M. 2015. Is the world supply of omega-3 fatty acids adequate for optimal human nutrition? *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 18, 147-154.
- 20 Scott, S. E., Wilkinson, M. J. 1999 Low probability of chloroplast movement from oilseed rape (*Brassica napus*) into wild *Brassica rapa*. *Nat Biotech* 17, 390-392.
- Senger, T., Marty, L., Kunze, I., Haertel, H. A., Bremmer, S., Breazeale, S., Bauer, J., Vrinten, P., Stymne, S., Lindberg, Y. J., 2016. Materials and Methods for PUFA Production, and PUFA-containing Compositions. Patent WO2016075326 A2, World Intellectual Property Organization.
- 25 Shanklin, J., Cahoon, E. B., 1998. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 611-41.
- 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.
- 30 Shizuya, H., Birren, B., Kim, U.-J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., Simon, M. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 8794-8797.
- 35 Singh, B. K., Shaner, D. L. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acids: From test tube to field. *Plant Cell* 7, 935-944.
- Smigocki, AC. 1991. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene. *Plant Molecular Biology* 16, 105-115.



- Snow, A. A., Andersen, B., Jørgensen, R. B., 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology* 8, 605-615.
- Stanley-Samuelson, D. W., Dadd, R. H. 1983. *Long-chain polyunsaturated fatty acids: Patterns of occurrence in insects*. *Insect Biochemistry* 13, pp. 549-558.
- 5 Stanley-Samuelson, D. W., Keddie, B. A., Volkman, L. E. 1986. *Fatty acid composition of whole bodies, specific tissues and cell lines of two lepidopteran insects*. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry* 85, pp. 369-373.
- Stanley-Samuelson, D. W., Jurenka, R. A., Cripps, C., Blomquist, G. J., de Renobales, M. 1988. *Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance*. *Archives of*
- 10 *Insect Biochemistry and Physiology* 9, pp. 1-33.
- Stidham, M.A., Singh, B. K., 1991 Imidazolinone-acetohydroxyacid synthase interactions. *In: The imidazolinone herbicides*. Chapter 6; D. shner and S. O'Connor(eds.). 71-90, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Tabata, S., Hooykaas, P. J. J., Oka, A. 1989. Sequence determination and characterization of
- 15 the replicator region in the tumor-inducing plasmid pTiB6S3. *Journal of Bacteriology* 171, 1665-1672.
- Takahata, Y., Konno, N., Hinata, K. 2008. Genotypic variation for floral characters in *Brassica* and allied genera with special reference to breeding system. *Breeding Science* 58, 385-392.
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., Shaner, D. L. 2005. Imidazolinone -
- 20 tolerant crops: History, current status and future. *Pest Management Science* 61, 246-257.
- Tonon, T., David, H., Larson, T. R., Graham, I. A. 2003. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid  $\Delta$ 4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Letters* 553, 440-444.
- 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.
- Tsuda, M., Okuzaki, A., Kaneko, Y., Tabei. Y. 2012. Relationship between hybridization frequency of *Brassica juncea*  $\times$  *B. napus* and distance from pollen source (*B. napus*) to recipient (*B. juncea*) under field conditions in Japan. *Breeding Science* 62, 274-281.
- 30 Turunen, S. 1974. *Lipid utilization in adult Pieris brassicae with special reference to the role of linolenic acid*. *Journal of insect physiology* 20, pp. 1257-1269.
- Tzompa-Sosa, DA., Yi, L., van Valenberg HJF, van Boekel MAJS, and Lakemond CMM. 2014. Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International* 62, 1087-1094.
- 35 USDA, 2017, National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. Full Report (All Nutrients): 04594, Fish oil, sardine. (<https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/730?n1=%7BQv%3D1%7D&fgcd=&man=&facet=&count=&max=&sort=&qlookup=&offset=&format=Fu>)

[ll&new=&measureby=&Qv=1&ds=&qt=&qp=&qa=&qn=&q=&ing=](#)) (閲覧日 2018 年 11 月 21 日)

- 5 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.
- 10 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.
- Warwick, S. I., Simard, M. J., Légère, A., Beckie, H.J., Braun, L., Zhu, B., Mason, P., Séguin-Swartz, G., Stewart, C.N., Jr. 2003 Hybridization between transgenic *Brassica napus* L. and its wild relatives: *Brassica rapa* L., *Raphanus raphanistrum* L., *Sinapis arvensis* L., and *Erucastrum gallicum* (Willd.) O.E. Schulz. *Theor Appl Genet* 107, 528-539.
- 15 Weiss, T. J., Knodel, J. J., Olson, D. 2022. Insect pests of canola. In: E. B. Radcliffe, W. D. Hutchison & R. E. Cancelado [eds.], *Radcliffe's IPM World Textbook*, URL: <https://ipmworld.umn.edu>, University of Minnesota, St. Paul, MN. V (閲覧日 2022 年 5 月 31 日)
- 20 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.
- Yamamori, M. 2011. Outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an experimental field. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ* 45, 173-179.
- 25 Yi, T., Li, S-M., Fan, J-Y., Fan, L-L., Zhang, Z-F., Luo, P., Zhang, X-J., Wang, J-G., Zhu, L., Zhao, Z-Z., Chen, H-B., 2014. Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS. *Lipids in Health and Disease* 13, 190.
- 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.
- 30 Zank, T., Zähringer, U., Lerchl, J., Heinz, E. 2000. Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for  $\Delta^6$ -polyunsaturated fatty acids. *Biochemical Society Transactions* 28, 654-658.
- 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.
- 35 Zauner, S., Jochum, W., Bigorowski, T., Benning, C. 2012. A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 11, 856-863.

- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, SE. 2003. *ARGONAUTE4* control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* 299, 716-719.
- 稲永忍, 2000. ナタネ. 作物学 II 工芸・飼料作物編. 文永堂出版, p.108-118.
- 環境省, 2002. 我が国における移入種(外来種)リスト  
5 (<http://www.env.go.jp/nature/report/h14-01/mat01a.pdf>) (閲覧日 2018年11月21日)
- 公益財団法人 日本油脂検査協会, 2017. (<http://www.oil-kensa.or.jp/statistics/statistics.html>) (閲覧日 2018年11月21日)
- 厚生労働省, 2019. 日本人の日本人の食事摂取基準(2020年版)  
(<https://www.mhlw.go.jp/content/10904750/000586558.pdf>) (閲覧日 2021年12月2日)
- 10 清水矩宏, 森田弘彦, 廣田伸七 2001. 日本帰化植物写真図鑑. 全国農村教育協会.  
杉山信太郎, 2001. 日本人とナタネ. 転作全書第3巻 雑穀. 農山漁村文化協会, p.273-280.  
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.1-46.
- 15 独立行政法人 国立環境研究所, 2021. 令和2年度遺伝子組換え生物による影響監視調査報告書. ([https://www.biodic.go.jp/bch/download/natane/R2\\_eikyo.pdf](https://www.biodic.go.jp/bch/download/natane/R2_eikyo.pdf))  
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター. 2008. なたね栽培の手引き(東北地方向け). ([https://www.naro.go.jp/publicity\\_report/publication/pamphlet/tech-pamph/004266.html](https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/004266.html)) (閲覧日: 2022年6月3日)
- 20 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. P.80-96.  
農林水産省, 2021a. 「令和元年年度遺伝子組換え植物実態調査」の結果について(令和3年1月8日公表)  
(<https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-272.pdf>) (閲覧日 2022年5月16日)
- 25 農林水産省, 2022b. 令和3年産なたね(子実用)の作付面積及び収穫量. (更新日令和4年3月31日) 農林水産統計 大臣官房統計部 ([https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka\\_gaiyou/sakumotu/sakkyou\\_kome/kougei/r3/natane/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kekka_gaiyou/sakumotu/sakkyou_kome/kougei/r3/natane/index.html)) (閲覧日 2022年5月16日)
- 30 農林水産省, 2022c. 農林水産物輸出入概況 2021年(令和3年). 国際部国際経済課(令和4年4月8日発表)  
(<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kokusai/attach/pdf/index-99.pdf>)  
(閲覧日 2022年5月16日)

本田裕, 2014. ナタネ栽培. クボタ eプロジェクト再生農地での作物のつくり方.  
([https://www.jeinou.com/e\\_project/saisei\\_nochi/2013/01/22/110000.html](https://www.jeinou.com/e_project/saisei_nochi/2013/01/22/110000.html)) (閲覧日 : 2022 年  
6 月 3 日)

## 別添資料の内容

- 別添資料 1 形質転換に使用したベクターLTM593 について (Transformation vector LTM593)
- 別添資料 2 EPA + DHA カノーラ LBFLFK の 2015 年春における脂肪酸組成及び分岐鎖アミノ酸含量の分析 (Compositional analysis of harvested seed from EPA + DHA canola event LBFLFK in the spring 2015 season – fatty acids and branch-chain amino acids)
- 別添資料 3 EPA + DHA カノーラ LBFLFK の挿入 DNA 及び挿入部位の塩基配列 (Sequence of inserts and integration sites)
- 別添資料 4 EPA + DHA カノーラ LBFLFK における分子生物学的特性 (Molecular characterization of EPA + DHA canola event LBFLFK)
- 別添資料 5 EPA + DHA カノーラ LBFLFK において新しく産生された蛋白質含量 (Level of newly expressed protein in EPA + DHA canola event LBFLFK)
- 別添資料 6 イベント識別法 (Quantitative detection method)
- 別添資料 7 LBFLFK *Brassica napus* – 葉の脂肪酸組成, 2020 (LBFLFK *Brassica napus* – Fatty acid composition of leaf tissue, 2020)
- 別添資料 8 EPA + DHA カノーラ LBFLFK 種子においてアグロバクテリウムが残存しないことの確認 (Confirmation of absence of *Agrobacterium* in seeds of EPA + DHA canola event LBFLFK)
- 別添資料 9 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 の隔離ほ場試験報告書
- 別添資料 10 LBFLFK *Brassica napus* – 他殖の可能性 (EPA+DHA *Brassica napus* event LBFLFK – Outcrossing Potential, 2020)
- 別添資料 11 Assessment of environmental interaction of EPA + DHA canola event LBFLFK under field conditions in the United States during 2015. 2015 年の米国におけるほ場試験における EPA + DHA カノーラ LBFLFK の環境への影響評価

# 緊急措置計画書

令和4年6月21日

5 氏名 BASF ジャパン株式会社  
代表取締役社長 石田 博基  
住所 東京都中央区日本橋室町三丁目4番4号

10 第一種使用規程の承認を申請している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(*D6E (Pp)*, *D5D (Tc)*, *D6D (Ot)*, *D6E (Tp)*, *D12D (Ps)*, *O3D (Pir)*, *O3D (Pi)*, *D4D (Tc)*, *D4D (Pl)*, *D5E (Ot)*, *AHAS (At)*, *Brassica napus L.*) (LBFLFK, OECD UI: BPS-BFLFK-2) (以下、「本組換えセイヨウナタネ」とする。)の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずるおそれがあると科学的に認められた場合は、以下の措置を執ることとする。

15 1 第一種使用等における緊急措置を講ずるための実施体制及び責任者

本組換えセイヨウナタネが生物多様性影響を生ずるおそれがあると判断された場合は、緊急措置に適切に対応するために危機対策本部(表1)を速やかに設置する。

20 表1 危機対策本部\*名簿(令和4年6月現在)

(危機対策本部長)	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部 執行役員 事業部長
**	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部
	BASF ジャパン株式会社 アグロソリューション事業部

\*本危機対策本部は、社内 Country Incident Management Team の指揮管理のもと、第一種使用等に係る緊急措置の実働対応を行う。

\*\*管理責任者  
(個人名は個人情報のため非開示)

2 第一種使用等の状況の把握の方法

25 弊社は、BASF Agricultural Solutions Seed US LLC と連絡を取り、種子、セイヨウナタネの生産、収穫物の状況に関し、セイヨウナタネ種子の生産、供給、販売及び取扱いなど使用の可能性がある関係各社から可能な限り情報収集を行う。

30 3 第一種使用等をしている者に緊急措置を講ずる必要があること及び緊急措置の内容を周知するための方法

弊社は、BASF Agricultural Solutions Seed US LLC と連絡を取り、生産農家やセイヨ

ウナタネ種子の取扱業者など取引ルートへ本組換えセイヨウナタネの適切な管理、  
取扱いなどの生物多様性影響のリスクとその危機管理計画について情報提供を行う。

- 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続する  
5 ための具体的な措置の内容

- 当該影響を生ずるおそれに基づき、弊社は **BASF Agricultural Solutions Seed US LLC**  
の協力のもと、本組換えセイヨウナタネを不活化する措置、本組換えセイヨウナタ  
ネの環境への放出を防止するための措置、又はすでに環境に放出された本組換えセ  
10 イヨウナタネの拡散を防止する措置を講ずる。

## 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

- 本組換えセイヨウナタネが我が国の生物多様性に影響を及ぼすおそれがあると認  
15 められた場合には、速やかに、農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省  
野生生物課に連絡するとともに、緊急措置に対応するための社内における組織体制  
及び連絡窓口を報告する。