

長鎖オメガ三系脂肪酸産生及び除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ
(*Lackl- Δ12D*, *Picpa- ω3D*, *Micpu- Δ6D*, *Pyrco- Δ6E*, *Pavsa- Δ5D*, *Pyrco- Δ5E*,
Pavsa- Δ4D, *pat*, *Brassica napus* L.) (NS-B50027-4, OECD UI: NS-B50027-4)

申請書等の概要

5		
	第一種使用規程承認申請書	1
	生物多様性影響評価書の概要	3
	第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報.....	3
	1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報.....	3
10	(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況.....	3
	(2) 使用等の歴史及び現状.....	4
	(3) 生理学的及び生態学的特性.....	5
	2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報.....	9
	(1) 供与核酸に関する情報.....	9
15	(2) ベクターに関する情報.....	25
	(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	26
	(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.....	31
	(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.....	38
	(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	38
20	3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報.....	40
	(1) 使用等の内容.....	40
	(2) 使用等の方法.....	40
	(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の方法.....	41
25	(4) 生物多様性影響が生ず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.....	41
	(5) 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用.....	41
	(6) 国外における使用等に関する情報.....	41
30	第二 項目ごとの生物多様性影響の評価.....	43
	1 競合における優位性.....	43
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	43
	(2) 影響の具体的内容の評価.....	47
	(3) 影響の生じやすさの評価.....	47

	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	47
2		有害物質の産生性.....	48
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	48
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	49
5	(3)	影響の生じやすさの評価.....	49
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	49
3		交雑性.....	49
	(1)	影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定.....	49
	(2)	影響の具体的内容の評価.....	50
10	(3)	影響の生じやすさの評価.....	50
	(4)	生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断.....	50
	4	その他の性質.....	50
	第三	生物多様性影響の総合的評価.....	53
		参考文献.....	57
15		緊急措置計画書.....	67
		別添資料リスト.....	69

第一種使用規程承認申請書

令和5年7月4日

5 農林水産大臣 野村 哲郎 殿
環境大臣 西村 明宏 殿

10 申請者 氏名 ニューファム株式会社
代表取締役社長 陳 順得
住所 東京都千代田区内幸町二丁目2番2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	長鎖オメガ三系脂肪酸産生及び除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ (<i>Lackl-Δ12D</i> , <i>Picpa-ω3D</i> , <i>Micpu-Δ6D</i> , <i>Pyrco-Δ6E</i> , <i>Pavsa-Δ5D</i> , <i>Pyrco-Δ5E</i> , <i>Pavsa-Δ4D</i> , <i>pat</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (NS-B50027-4, OECD UI: NS-B50027-4)
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	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

5 1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

(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

10

和名：セイヨウナタネ

英名：Oilseed Rape

学名：*Brassica napus* L.

15

② 宿主の品種名又は系統名

遺伝子導入に用いた宿主の品種は AV Jade である。

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* L.) は、アブラナ科アブラナ属の *Brassica rapa* L. (在来ナタネ、カブ、ハクサイ等) とキャベツなどが属する *Brassica oleracea* L. との交雑の結果できた複二倍体種である (OGTR, 2008)。セイヨウナタネは、交雑親の *B. rapa* と *B. oleracea* の分布が重なる北ヨーロッパが原産地と考えられており、現在は、世界中にその分布が見られる (OECD, 2012)。

25

我が国において、河川敷などに自生しているセイヨウナタネは栽培種からの逸出種と考えられている (清水ら, 2001)。また、サラダ油などの原料としてセイヨウナタネの種子が輸入され広く利用されており、こぼれ落ちた種子が輸入港周辺に生育している (Aono et al., 2011; Aono et al., 2006; Nishizawa et al., 2009; Nishizawa et al., 2010; Saji et al., 2005)。しかし、セイヨウナタネは自然環境下では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, 1997)。

30

我が国に分布する近縁種として、アブラナ (*B. rapa*)、カラシナ (*B. juncea*)、クロガラシ (*B. nigra*)、ハリゲナタネ (*B. tournefortii*)、キバナスズシロ (*Eruca vesicaria*)、オハツキガラシ (*Erucastrum gallicum*)、セイヨウノダイコン

35

(*Raphanus raphanistrum*)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)、ノハラガラシ (*Sinapis arvensis*)、及びシロガラシ (*Sinapis alba*) が挙げられる (OECD, 2012; OGTR, 2008; 中井, 2003; 農林水産省, 2018)。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ている (Nishizawa et al., 2010)。一方で、戦後各地に広まった *B. juncea* は、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 (清水ら, 2001; 中井, 2003)。他方、*B. nigra*、*B. tournefortii*、*E. vesicaria*、*E. gallicum*、*R. raphanistrum*、*H. incana*、*S. arvensis* 及び *S. alba* は、いずれも明治以降に帰化した外来種である (村上・鷺谷, 2002; 中井, 2003)。なお、セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しない。

(2) 使用等の歴史及び現状

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 世紀にヨーロッパで栽培化されたと考えられている (OECD, 2011a)。我が国においては、明治時代から栽培されるようになり、生産量 (栽培面積) は、昭和 12 年に 13 万 t (11 万 ha) に達したが、第二次世界大戦によって激減した (杉山, 2001)。戦後再び増加し、昭和 31~33 年には 32 万 t (6 万 ha) に達したが、農産物自由化と、畑作生産衰退の傾向により急速に減退し、昭和 49 年の生産は 9,100 t (5,280 ha) となった (志賀, 2001)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

国連食料農業機関 (FAO) の統計情報に基づくと、2018 年における世界のセイヨウナタネの栽培面積は約 3,757 万 ha であり、その上位国はカナダが 912 万 ha、EU が 689 万 ha、中国が 655 万 ha、インドが 670 万 ha、オーストラリアが 317 万 ha となっている (FAO, 2020)。なお、我が国で栽培されているセイヨウナタネの栽培面積は 1,900 ha、収穫量は 4,130 t である (農林水産省, 2020b)。

セイヨウナタネには、花芽分化、抽苔及び開花に至るための低温要求度が低い春播き品種と低温要求度が高い秋播き品種があり (Brown et al., 2008)、カナダ西部や中国北部では主に春播き品種が栽培され、ヨーロッパ北部や中国中部では主に秋播き品種が栽培されている (OECD, 2012)。

日本には 2019 年に約 236 万 t のナタネ種子が輸入され、主な輸入国はカナ

ダ (約 224 万 t)、次いでオーストラリア (約 12 万 t) である (財務省, 2020)。セイヨウナタネ種子から搾油・精製された油は、食用及び食品加工油脂として利用されている。搾油後の油かすは飼肥料として用いられる (OGTR, 2008)。

5 (3) 生理学的及び生態学的特性

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 生育又は生育可能な環境の条件

セイヨウナタネは、一般に冷涼な気候で栽培され、最適生育温度は 20°C をわずかに超えた程度である (OECD, 1997; OGTR, 2008)。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, 2017)。

15

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

自然条件下では、15~25 粒の種子が入っている莢 (長角果) を形成し、乾燥した莢がはじけることで成熟した種子を飛散させる (OGTR, 2017)。乾燥した莢は、わずかな物理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。

30

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)。

35

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。後熟後に乾燥状態で冷蔵保存した場合には、少なくとも 25 年を経過しても発芽する (OECD, 2012)。しかしながら、収穫時に飛散し、地表に落ちた種子の多くは

発芽し、霜害や食害を受けるため、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

5

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

10

セイヨウナタネは主に自殖性であるが、部分的には他殖も行われ、自家不和合性は有さない (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)。我が国の試験ほ場において、異なる品種を用いた他殖率を3年間の栽培試験で調査したところ、平均が11.61%であった (Yamamori, 2011)。

15

セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国には存在しない。セイヨウナタネと交雑可能な近縁種として、アブラナ (*B. rapa*)、カラシナ (*B. juncea*)、クロガラシ (*B. nigra*)、ダイコンモドキ (*H. incana*)、セイヨウノダイコン (*R. raphanistrum*) 及びノハラガラシ (*S. arvensis*)が知られている (OECD, 2012; OGTR, 2008; 中井, 2003)。

20

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、形成された雑種の生存率は2%未満であった (OGTR, 2008)。しかし、セイヨウナタネと同一ほ場内に *B. rapa* を1:1で植えた場合の交雑率は、セイヨウナタネを種子親とした場合は9%、花粉親とした場合は13%であった (Jørgensen et al., 1996)。また、F₂及びBC世代については、品種・集団間に差異があるものの、全体的に適応度が低下するとの報告がある (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* 栽培品種55系統を配置し、種子親とした *B. rapa* から得られた種子の倍数性から後代の雑種形成頻度を調査した結果、*B. rapa* とセイヨウナタネの自然交雑率は2~50%、平均で22.8%であった (Yamamori, 2011)。

25

30

セイヨウナタネと *B. juncea* との交雑性について、自然条件下でセイヨウナタネを花粉親とした場合の交雑率は3~4.7%であった (OGTR, 2008)。農業生物

35

資源研究所 (現:農業・食品産業技術総合研究機構) の試験ほ場において、花粉源となる突然変異由来の除草剤耐性セイヨウナタネを中央に配置し、花粉源内で *B. juncea* を混植及び花粉源の周囲に *B. juncea* を栽植して、*B. juncea* における自然交雑率を調査した。その結果、交雑率は、花粉源内の混植地点では 1.62%、
5 花粉源との隣接地点では 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セイヨウナタネが種子親の場合 0.07 個 (雑種個体数/交配花)、花粉親の場合 4.05 個という報告がある (津田ら, 2016)。また、形成された雑種の花粉稔性は 0~28%
10 であり、セイヨウナタネよりも低い (OGTR, 2008)。雑種後代に関して、F₁ 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)。

セイヨウナタネと *B. nigra* との交雑性について、両者を隣接して生育させた後に雑種の形成率を調査した報告があるが、自然交雑試験において雑種形成は確認されなかった (Bing et al., 1996; Scheffler and Dale, 1994)。また、人工交配によって交雑体を得られたという報告はない。なお、*B. nigra* を花粉親とした交配から得られた雑種個体の胚珠培養を行った場合、3.4%の交雑率で交雑体を得られたが、セイヨウナタネを花粉親として胚珠培養を行った場合には交雑体は
20 得られなかったと報告されている (Kerlan et al., 1992)。

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頻度は 4.0×10^{-8} 、花粉親とした場合の交雑体は確認されなかった (Rieger et al., 2001)。別の試験において、セイヨウナタネを花粉親とした場合の交雑頻度は $1 \times 10^{-7} \sim 3.1 \times 10^{-5}$ という報告がある (Chèvre et al., 2000)。また、F₁ 個体では幼苗の発芽率や生存率、ロゼット葉の直径、乾燥重などに顕著な低下が認められた (Guéritaine et al., 2003)。実際に、除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネと *R. raphanistrum* をほ場で栽培し、定期的なモニタリングを英国で 5 年間 (Chèvre et al., 2004) 及びカナダで 2 年
30 間 (Warwick et al., 2003) 実施した結果、交雑体は認められなかった。

セイヨウナタネと *H. incana* との交雑性について、人工受粉によりセイヨウナタネを種子親とした場合は 100 花あたり 3.1 粒、花粉親とした場合は 100 花あたり 1.3 粒の F₁ 種子が得られたが、その発芽率は 1%未満と低い適応度を示した (OECD, 2012)。
35

セイヨウナタネと *S. arvensis* との交雑性について、セイヨウナタネを花粉親とした場合の *S. arvensis* との交雑は自然条件下では認められておらず、胚珠培養を行った場合でのみ交雑体を得られた (OECD, 2012)、なお、*S. arvensis* を花粉親とした場合の雄性不稔セイヨウナタネにおける交雑率は 1.2%であった (Lefol et al., 1996)。

セイヨウナタネにはアポミクシスの特性を有するとして報告はない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

一花当たり約 6~7 万粒の花粉を産生する (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、風媒のほか、ミツバチなどの昆虫によっても媒介される (OECD, 2012)。

東北農業研究センターの試験ほ場において、エルシン酸含量が異なる 2 品種を用いてセイヨウナタネの他殖率について調査した結果、花粉源から風下方向に 0.25 m、1 m、5 m、10 m、30 m、60 m 離れた地点の他殖率は、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したがって急激に減少した (Yamamori, 2011)。また、OECD (2012) は従来知見を総括し、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。

花粉の寿命は 1 週間以上であるが、発芽率は自然条件下では、4~5 日間で徐々に低下する (Rantio-Lehtimäki, 1995)。

ホ 病原性

—

ヘ 有害物質の産生性

セイヨウナタネ種子には、ヒトを含む哺乳動物に有害であるとされているエルシン酸及びグルコシノレートが含まれている。エルシン酸は、ラットの給餌試験において心筋への脂肪酸蓄積に関与し心臓病変を引き起こすことが報告されており、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, 2008)。しかし、長年にわたる品種改良の結果、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、種子は食用油として、油かすは飼肥料用として利用されるようになった (OECD,

2012; OGTR, 2008)。なお、このような低エルシン酸 (精製油中で2%未満) で低グルコシノレート (油粕1 g当たり30 μmol 未満) のセイヨウナタネは、一般にカノーラ品種と呼ばれている (OECD, 2012; OGTR, 2008)。宿主であるAV Jadeもカノーラ品種の一つである。

5

ト その他の情報

—

10 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

15 Nuseed Pty Ltd.は、種子中において ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸の一種であるドコサヘキサエン酸 (DHA, C22:6 n-3) を産生し、除草剤グルホシネートに対する耐性が付与された長鎖オメガ三系脂肪酸産生及び除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ (NS-B50027-4、OECD UI: NS-B50027-4 ; 以下「本組換えセイヨウナタネ」という。) を作出した。

20 本組換えセイヨウナタネには、DHA を最終生成物とする長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFAs) 合成に関わる微細藻類由来又は酵母由来の 5 種のデサチュラーゼ¹及び 2 種のエロンガーゼ²をコードする遺伝子及び *Streptomyces viridochromogenes* 由来の *pat* 遺伝子が導入されている。

25

イ 構成及び構成要素の由来

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及び構成要素の由来を表 1 (p10~13) に示した。

30

¹ デサチュラーゼは炭化水素鎖から 2 個の水素原子を抜き出す酵素で、脂肪酸中に二重結合を生成する。カルボニル基から一定の位置に二重結合を導入する Δ -デサチュラーゼ及び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。

² エロンガーゼは脂肪酸を 2 炭素ずつ伸長させる酵素である。4 つのステップから成る脂肪酸の伸長反応 (縮合、還元、脱水、還元) のうち、最初の縮合反応を触媒する。

表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の各構成要素の由来及び機能³

構成要素 ^{注1}	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
T-DNA領域		
T-DNA right border	1 - 163	<i>Rhizobium radiobacter</i> ^{注2} 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される右側境界配列を含む (Jefferson et al., 1987)。
Multiple cloning site	164 - 231	ベクターコンストラクトの際に利用された配列 ^{注3} 。
TER_ <i>Linus-Cnl2</i>	232 - 769	<i>Linum usitatissimum</i> の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin2</i> 遺伝子のターミネーター (Chaudhary et al., 2001)。転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する。
Intervening sequence	770 - 777	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>Micpu-Δ6D</i>	778 - 2,172	微細藻類 <i>Micromonas pusilla</i> 由来のΔ6-デサチュラーゼをコードする遺伝子 (Petrie et al., 2010c)。
Intervening sequence	2,173- 2,175	DNAクローニングの際に利用された配列。
Tobacco mosaic virus (TMV) 5' UTR leader	2,176 - 2,240	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。
Intervening sequence	2,241 - 2,248	DNAクローニングの際に利用された配列。
PRO_ <i>Linus-Cnl2</i>	2,249 - 4,281	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin2</i> 遺伝子のプロモーター (Chaudhary et al., 2001)。mRNAの転写を胚特異的に誘導する。
Intervening sequence	4,282 - 4,287	DNAクローニングの際に利用された配列。
PRO_ <i>Arath-FAE1</i>	4,288 - 5,221	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来のエロンガーゼ (FAE1) 遺伝子のプロモーターで、mRNAの転写を胚特異的に誘導する (Rossak et al., 2001)。
Tobacco mosaic virus 5' UTR leader	5,222 - 5,286	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での転写を高める (Gallie et al., 1987)。
Intervening sequence	5,287 - 5,289	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>Pyrco-Δ5E</i>	5,290 - 6,096	微細藻類 <i>Pyramimonas cordata</i> 由来のΔ5-エロンガーゼをコードする遺伝子 (Petrie et al., 2010a)。
Intervening sequence	6,097 - 6,111	DNAクローニングの際に利用された配列。
TER_ <i>Glyma-Lectin</i>	6,112 - 6,445	ダイズ (<i>Glycine max</i>) のレクチンをコードする <i>Le1</i> 遺伝子のターミネーター (Choi et al., 1995; Vodkin et al., 1983)。転写の終結及びmRNAのポリアダニル化を誘導する。
PRO_ <i>Brana-FP1</i>	6,446 - 6,803	セイヨウナタネ (<i>B. napus</i>) の <i>napin</i> 遺伝子のプロモーターで、mRNAの転写を胚特異的に誘導する (Stålberg et al., 1993)。
TMV 5' UTR leader	6,804 - 6,868	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。

³ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
Intervening sequence	6,869 - 6,871	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>Pavsa-Δ5D</i>	6,872 - 8,152	微細藻類 <i>Pavlova salina</i> 由来のΔ5-デサチュラーゼをコードする遺伝子 (Zhou et al., 2007)。
TER_ <i>Agrtu-NOS</i>	8,153 - 8,407	<i>R. radiobacter</i> Ti由来のノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) のターミネーターで (Bevan, 1984; Rogers et al., 1985; Sanders et al., 1987)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
MAR_ <i>Nicta-RB7</i>	8,408 - 9,575	タバコ (<i>Nicotiana tabacum</i>) 由来のRb7マトリックス結合領域で、植物細胞内での転写を高める (Hall et al., 1991; Halweg et al., 2005)。
TER_ <i>Linus-Cnl1</i>	9,576 - 10,309	<i>L. usitatissimum</i> の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin1</i> 遺伝子のターミネーター (Chaudhary et al., 2001)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
<i>Picpa-ω3D</i>	10,310 - 11,560	酵母 <i>Pichia pastoris</i> 由来のΔ15-ω3-デサチュラーゼをコードする遺伝子 (Zhang et al., 2008)。
Intervening sequence	11,561 - 11,563	DNAクローニングの際に利用された配列。
TMV 5' UTR leader	11,564 - 11,628	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。
PRO_ <i>Linus-Cnl1</i>	11,629 - 12,078	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin1</i> 遺伝子のプロモーター (Chaudhary et al., 2001)。mRNAの転写を胚特異的に誘導する。
PRO_ <i>Linus-Cnl2</i>	12,079 - 14,111	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin2</i> 遺伝子のプロモーター (Chaudhary et al., 2001)。mRNAの転写を胚特異的に誘導する。
TMV 5' UTR leader	14,112 - 14,176	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。
Intervening sequence	14,177 - 14,179	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>Pavsa-Δ4D</i>	14,180 - 15,526	微細藻類 <i>P. salina</i> 由来のΔ4-デサチュラーゼをコードする遺伝子 (Zhou et al., 2007)。
TER_ <i>Linus-Cnl2</i>	15,527 - 16,064	<i>L. usitatissimum</i> の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin2</i> 遺伝子のターミネーター (Chaudhary et al., 2001)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。

表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
PRO_Linus-Cn11	16,065 - 16,514	<i>L. usitatissimum</i> 由来の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin2</i> 遺伝子のプロモーター (Chaudhary et al., 2001)。mRNAの転写を胚特異的に誘導する。
TMV 5' UTR leader	16,515 - 16,572	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。
Intervening sequence	16,573 - 16,575	DNAクローニングの際に利用された配列。
Lack1-Δ12D	16,576 - 17,829	酵母 <i>Lachancea kluyveri</i> 由来のΔ12-デサチュラーゼをコードする遺伝子 (Petrie et al., 2012)。
TER_Linus-Cn11	17,830 - 18,563	<i>L. usitatissimum</i> の種子貯蔵蛋白質をコードする <i>conlinin1</i> 遺伝子のターミネーター (Chaudhary et al., 2001)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
MAR_Nicta-RB7	18,564 - 19,731	タバコ (<i>N. tabacum</i>) 由来のRb7マトリックス結合領域で、植物細胞内での転写を高める (Hall et al., 1991; Halweg et al., 2005)。
Intervening sequence	19,732 - 19,739	DNAクローニングの際に利用された配列。
PRO_Arath-FAE1	19,740 - 20,673	<i>A. thaliana</i> 由来のエロンガーゼ (FAE1) 遺伝子のプロモーターで、mRNAの転写を胚特異的に誘導する (Rossak et al., 2001)。
TMV 5' UTR leader	20,674 - 20,738	タバコモザイクウイルス由来のエンハンサーで、植物細胞内での翻訳を高める (Gallie et al., 1987)。
Intervening sequence	20,739 - 20,741	DNAクローニングの際に利用された配列。
Pyrco-Δ6E	20,742 - 21,611	微細藻類 <i>P. cordata</i> 由来のΔ6-エロンガーゼをコードする遺伝子 (Petrie et al., 2010a)。
TER_Glyma-Lectin	21,612 - 21,945	ダイズ (<i>G. max</i>) のレクチンをコードする <i>Le1</i> 遺伝子のターミネーター (Vodkin et al., 1983)。転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	21,946 - 21,967	DNAクローニングの際に利用された配列。
PRO_35S×2	21,968 - 22,505	2重のエンハンサー領域をもつカリフラワーモザイクウイルス35S RNAのプロモーター (Coutu et al., 2007; Kay et al., 1987)。
Intervening sequence	22,506 - 22,514	DNAクローニングの際に利用された配列。
pat	22,515 - 23,066	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> に由来するホスフィノスリシンN-アセチルトランスフェラーゼ (PAT 蛋白質) のコード配列。除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (Dröge et al., 1992)。
Intervening sequence	23,067 - 23,074	DNAクローニングの際に利用された配列。

表 1 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた供与核酸の各構成要素の由来及び機能 (続き)

構成要素	プラスミド中の位置 (bp)	由来及び機能
TER_Agrtu-NOS	23,075 - 23,327	<i>R. radiobacter</i> Ti由来のノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) のターミネーターで (Bevan, 1984; Rogers et al., 1985; Sanders et al., 1987)、転写の終結及びmRNAのポリアデニル化を誘導する。
Intervening sequence	23,328 - 23,344	DNAクローニングの際に利用された配列。
T-DNA left border	23,345 - 23,505	<i>A. tumefaciens</i> 由来のDNA領域で、T-DNAを伝達する際に利用される左側境界配列を含む (Jefferson et al., 1987)。
外側骨格配列 (本組換えセイヨウナタネには存在しない)		
Intervening sequence	23,506 - 23,519	DNAクローニングの際に利用された配列。
Origin_RiA4	23,520 - 28,155	プラスミド pRi_15834由来の複製開始領域 (RepA) で、 <i>Rhizobium</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (GenBank accession # KX986281)。
Intervening sequence	28,156 - 28,372	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>nptIII</i>	28,373 - 29,167	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来のネオマイシン-カナマイシンホストランスメンフェラーゼ III (NPTIII) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード配列 (Xiang et al., 1999)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Trieu-Cuot and Courvalin, 1983)。
Intervening sequence	29,168 - 29,467	DNAクローニングの際に利用された配列。
<i>TrfA</i>	29,468 - 30,614	RK2プラスミド由来の複製開始領域 <i>TrfA</i> のコード配列であり (Xiang et al., 1999)、 <i>Escherichia coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する
Intervening sequence	30,615 - 30,671	DNAクローニングの際に利用された配列。
Origin_ColE1	30,672 - 31,552	Col E1プラスミド由来の複製開始領域。 <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Xiang et al., 1999)。
Intervening sequence	31,553 - 31,557	DNAクローニングの際に利用された配列。

注 1 : 各構成要素において使用されている接頭辞は以下のとおり。

Origin (複製開始領域)、TER (ターミネーター)、PRO (プロモーター)、MAR (マトリックス付着領域)

注 2 : 再分類前の学名は *Agrobacterium tumefaciens* である。

注 3 : 当該配列は特別な機能を有する配列を含まない。

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の機能を表 1 (p10~13) 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出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、導入遺伝子から発現する 5 種類のデサチュラーゼ (*Lack1-Δ12D*、*Picpa-ω3D*、*Micpu-Δ6D*、*Pavsa-Δ5D* 及び *Pavsa-Δ4D*) 及び 2 種類のエロンガーゼ (*Pyrco-Δ6E* 及び *Pyrco-Δ5E*) により種子内の内在性脂肪酸であるオレイン酸から DHA を最終生成物とする長鎖多価不飽和脂肪酸が産生される (図 1, p17)。また、*pat* 遺伝子から発現する PAT 蛋白質により、除草剤グルホシネートへの耐性が付与されている。

15

20 デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

Petrie et al. (2020) は本組換えセイヨウナタネの種子中における 5 種類のデサチュラーゼ及び 2 種類のエロンガーゼの働きについて調査を行っている。その結果、本組換えセイヨウナタネでは、セイヨウナタネ内在性の脂肪酸であるオレイン酸を基質とした α -リノレン酸の生合成から始まる脂肪酸の不飽和化及び伸長反応が導入されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼにより引き起こされることによって、最終産物として長鎖多価不飽和脂肪酸である DHA が産生されることが確認されている(*Petrie et al., 2020*)。それぞれのデサチュラーゼ及びエロンガーゼ遺伝子の機能について以下に記載した。

25

30

a. *Lack1-Δ12d* 遺伝子

Lack1-Δ12D は、脂肪酸の既存の二重結合の位置を認識し、そこからメチル基末端に向かって 3 番目の炭素の位置に二重結合を導入する (v+3 活性)、メチルエンド型の不飽和化酵素である。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 発現システムにおいて、パルミトレイン酸 (C16:1 n-7)、オレイン酸 (C18:1 n-9)、ノ

35

ナデセン酸 (C19:1 n-9)、エイコセン酸 (C20:1 n-9)を基質として、それぞれ C16:2 n-4、リノール酸 (C18:2 n-6)、ノナデカジエン酸 (C19:2)、エイコサジエン酸 (C20:2 n-6) を生成することが確認されているが、そのうちオレイン酸 (C18:1 n-9)を基質とした場合が最も変換効率が高いことが報告されており (Oura and Kajiwara, 2008)、セイヨウナタネではオレイン酸 (C18:1 n-9)を基質としてリノール酸 (C18:2 n-6) を生成することが報告されている (Petrie et al., 2012)。

b. *Picpa- ω 3d* 遺伝子

Picpa- ω 3D は、メチル基末端から 3 番目の炭素-炭素結合 (ω 3) の位置に二重結合を導入する ω 3-不飽和化酵素であり、酵母発現システムにおいて、C18、C20 及び C22 の ω 6 系基質 (リノール酸 (C18:2 n-6)、 γ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6)、アラキドン酸 (C20:4 n-6)、 ω 6 ドコサテトラエン酸 (DTA, C22:4 n-6)、 ω 6 ドコサペンタエン酸 (C22:5 n-6) に対して、選好性なく ω 3-不飽和化活性を有することが確認されている (Shrestha et al., 2019; Zhang et al., 2008)。

c. *Micpu- Δ 6d* 遺伝子

Micpu- Δ 6D は Δ 6-不飽和化酵素であり、基質となる脂肪酸のカルボキシル基末端から 6 番目の炭素-炭素結合 (Δ 6) の位置に二重結合を導入する。酵母発現システムにおいて、*Micpu- Δ 6D* は ω 6 系脂肪酸であるリノール酸 (C18:2 n-6) 及び ω 3 系脂肪酸である α -リノレン酸 (C18:3 n-3) を Δ 6-不飽和化することが報告されており、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3) を基質とした変換効率の方が約 3.5 倍高いことが確認されている (Petrie et al., 2010c)。

d. *Pyrco- Δ 6e* 遺伝子

Pyrco- Δ 6e 遺伝子の遺伝子産物である *Pyrco- Δ 6E* は、 Δ 6-不飽和脂肪酸の鎖長を伸長する酵素である。*Pyrco- Δ 6E* は、酵母発現システムにおいて、 ω 6 系脂肪酸であるリノール酸 (C18:2 n-6) 及び γ -リノレン酸 (C18:3 n-6) 並びに ω 3 系脂肪酸である α -リノレン酸 (C18:3 n-3)、ステアリドン酸 (C18:4 n-3) 及びエイコサテトラエン酸 (ETA, C20:4 n-3) に対して脂肪酸伸長活性を有することが報告されている (Meyer et al., 2004; Petrie et al., 2010a)。

e. *Pavsa- Δ 5d* 遺伝子

Pavsa- Δ 5d 遺伝子の遺伝子産物である *Pavsa- Δ 5D* は、 Δ 5-不飽和化酵素であり、オレイン酸 (C18:1 n-9) からタキソール酸 (C18:2 n-9) を生成することが

報告されている (Knutzon et al., 1998)。

また、 ω 3系脂肪酸である ETA (C20:4 n-3) からエイコサペンタエン酸 (EPA, C20:5 n-3) を生成する Δ 5-不飽和化活性を有し、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6) をアラキドン酸 (C20:4 n-6) に変換することが確認されている (Petrie et al., 2010b)。

f. *Pyrco-Δ5e* 遺伝子

Pyrco-Δ5e 遺伝子の遺伝子産物である *Pyrco-Δ5E* は、 Δ 5-不飽和脂肪酸の鎖長を伸長する酵素である。*Pyrco-Δ5E* は、C20:4 n-6 アラキドン酸を DTA (C22:4 n-6) に、ステアリドン酸 (C18:4 n-3) を ETA (C20:4 n-3) に、EPA (C20:5 n-3) をドコサペンタエン酸 (DPA, C22:5 n-3) に変換することが確認されている (Petrie et al., 2010a)。

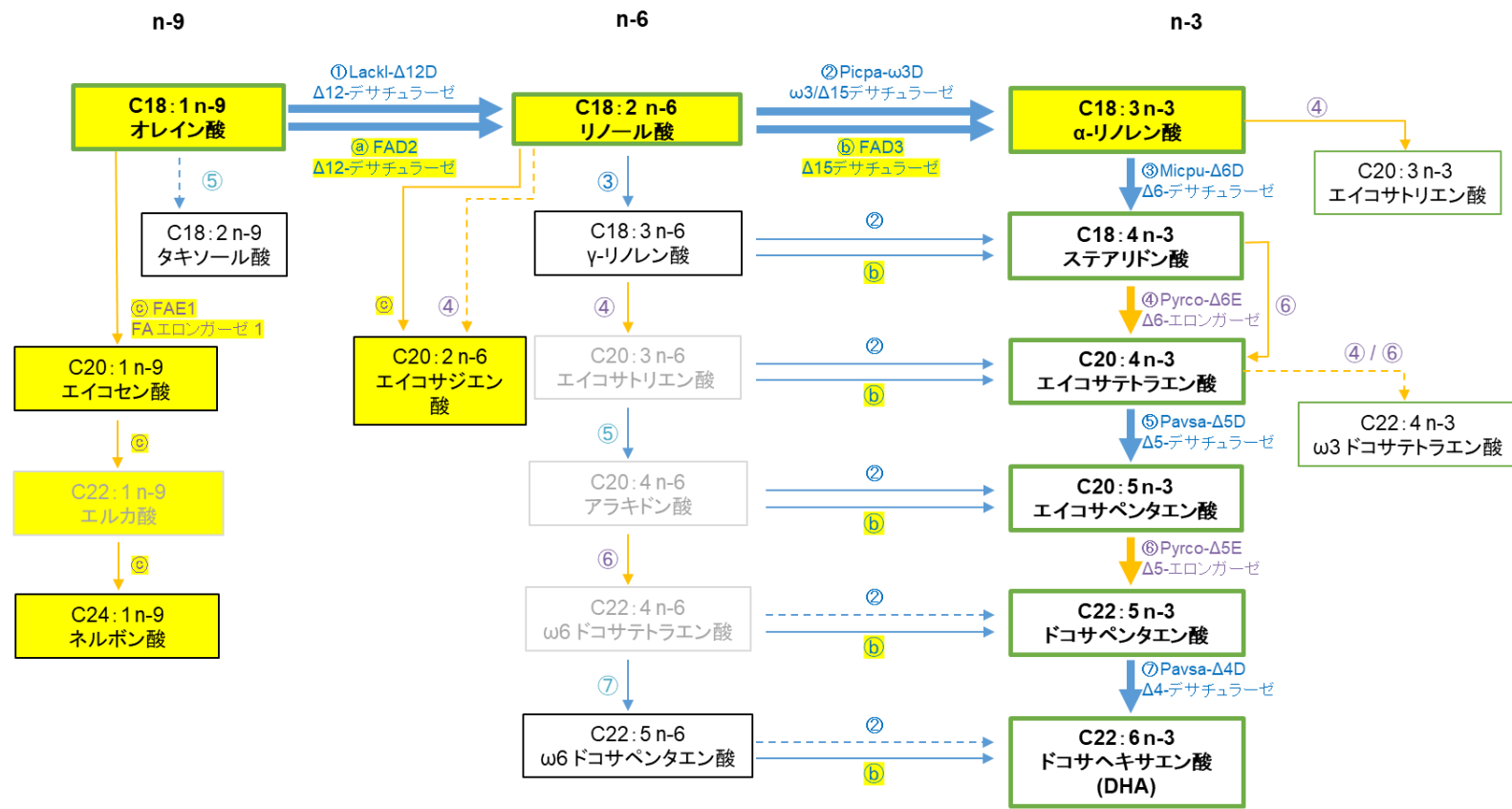
また、ETA (C20:4 n-3) を DTA (C22:4 n-3) に変換することが確認されている (Meyer et al., 2004)。

g. *Pavsa-Δ4d* 遺伝子

Pavsa-Δ4d 遺伝子の遺伝子産物である *Pavsa-Δ4D* は、 Δ 4-不飽和化酵素であり、酵母発現システムにおいて、 ω 6系脂肪酸である DTA (C22:4 n-6) 及び ω 3系脂肪酸である DPA (C22:5n-3) のいずれに対しても、同程度の Δ 4-不飽和化活性を有することが確認されている (Petrie et al., 2010b; Tonon et al., 2003)。

なお、本組換えセイヨウナタネで産生されるデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、図 1 (p17) に示した以外の脂肪酸の不飽和化又は伸長反応に影響を及ぼすことで意図した以外の脂肪酸組成の変化をもたらす可能性が考えられる。しかしながら、2015年にオーストラリアの8試験地において収穫された本組換えセイヨウナタネの種子における脂肪酸含量を測定した結果、これらの5種類のデサチュラーゼ及び2種類のエロンガーゼが産生されたことにより、意図した以外の脂肪酸組成の変化は認められなかったことが確認されている (別添資料 1)。詳細は第一の 2-(1)-ロ-③に後述する。

この脂肪酸分析の結果からも、産生されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼが意図した形で機能し、高い DHA 含量をもたらしていることが示された。



セイヨウナタネ内在性の脂肪酸 → 主要な脂肪酸不飽和化経路 → その他の脂肪酸不飽和化経路 → 可能性のある経路 ① - ⑦ 新たに産生されるデサチュラーゼ及びエロンガーゼ
NS-B50027-4における主要脂肪酸合成経路 → 主要な脂肪酸伸長経路 → その他の脂肪酸伸長経路 FA <LOQ NS-B50027-4において定量限界以下 ⑧ ⑨ ⑩ 内在性デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

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⁴

⁴ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

PAT 蛋白質

本組換えセイヨウナタネには、*S. viridochromogenes*由来の*pat*遺伝子が導入されており、PAT蛋白質を発現する。PAT蛋白質は除草剤グルホシネートへの耐性を付与する (OECD, 2002)。

除草剤グルホシネートは、その活性成分であるL-グルホシネートがグルタミン合成酵素活性を阻害することにより、植物体内にアンモニアを蓄積させることで植物を枯死させる。本組換えセイヨウナタネから産生されるPAT蛋白質はL-グルホシネートをアセチル化し、除草活性のないN-アセチルグルホシネートに変換することで、植物体にグルホシネートに対する耐性を付与する。

なお、同じ作用機作を示すPAT蛋白質を発現する遺伝子組換え作物であり、カルタヘナ法に基づき第一種使用規程の承認を受けている系統 (スタック系統は除く) は、これまでに5作物34系統 (セイヨウナタネでは5系統) (2023年6月26日時点) があり、いずれの系統もそれぞれの第一種使用等の内容で使用した場合、我が国の生物多様性に影響が生ずるおそれはないと判断されている。

本組換えセイヨウナタネで発現する 5 種類のデサチュラーゼ (Lack1- Δ 12D、Picpa- ω 3D、Micpu- Δ 6D、Pavsa- Δ 5D 及び Pavsa- Δ 4D)、2 種類のエロンガーゼ (Pyrco- Δ 6E 及び Pyrco- Δ 5E) 並びに PAT 蛋白質が、既知のアレルゲンと類似のアミノ酸配列を共有するか否かを判断するため、Allergen Online version 21⁵に登録されている既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認した。その結果、連続する 80 以上のアミノ酸配列について 35%以上の相同性を有する又は連続する 8 アミノ酸の一致を有する既知のアレルゲンは認められなかった。

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

本組換えセイヨウナタネでは、導入遺伝子から発現する 5 種類のデサチュラーゼ (Lack1- Δ 12D、Picpa- ω 3D、Micpu- Δ 6D、Pavsa- Δ 5D 及び Pavsa- Δ 4D) 及び 2 種類のエロンガーゼ (Pyrco- Δ 6E 及び Pyrco- Δ 5E) により、種子内の内在性脂

⁵ The AllergenOnline version 21: Food Allergy Research and Resource Program (<http://www.allergenonline.org/>) により開発・運営されるデータベースで、2,233 のアミノ酸配列が含まれる (2021 年 2 月 14 日更新)。

脂肪酸であるオレイン酸から DHA を最終生成物とする長鎖多価不飽和脂肪酸が産生される (図 1, p17)。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報告されている (Leonard et al., 2004; Shanklin and Cahoon, 1998)。

5

本組換えセイヨウナタネで産生するデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、図 1 (p17) に示した以外の脂肪酸の不飽和化又は伸長反応に影響を及ぼすことで意図した以外の脂肪酸組成の変化をもたらす可能性が考えられる。しかしながら、本組換えセイヨウナタネ及び本組換えセイヨウナタネと同じ組合せの導入遺伝子をもつシロイヌナズナにおける研究において、これらの 5 種類のデサチュラーゼ遺伝子及び 2 種類のエロンガーゼ遺伝子を導入したことにより、意図しない脂肪酸組成の変化は認められなかったことが確認されている (Petrie et al., 2012; Petrie et al., 2020)。

10

15

実際に、2015 年にオーストラリアの 8 試験地において収穫された本組換えセイヨウナタネ (T₃ 世代: 図 3, p30)、対照の非組換えセイヨウナタネ及び商業品種の種子における脂肪酸含量を測定した (表 2, p23~24; 別添資料 1, Table 7, p24~26)。なお、供試サンプル数の 33%以上が定量限界以下であった脂肪酸については、統計解析から除外した⁶。

20

分析の結果、ミリスチン酸 (C14:0)、ステアリン酸 (C18:0)、リグノセリン酸 (C24:0) において、各脂肪酸が総脂肪酸に占める割合は、本組換えセイヨウナタネと対照の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。

25

また、パルミチン酸 (C16:0)、C16:1 総量、マルガリン酸 (C17:0)、マルガロレイン酸 (C17:1)、cis-バクセン酸 (C18:1 n-7)、アラキジン酸 (C20:0)、エイコセン酸 (C20:1 n-9)、エイコサジエン酸 (C20:2 n-6) 及びベヘン酸 (C22:0) において、各脂肪酸が総脂肪酸に占める割合は、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間に統計学的有意差が認められたものの、商業品

⁶エライジン酸 (C18:1 *trans*)、C18:2 n-9、リノールエライジン酸 (C18:2 *trans*)、 γ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、ステアリドン酸 (C18:4 n-3)、C18 総量、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-3)、C20:3 総量、ETA (C20:4 n-3)、C20:4 総量、EPA (C20:5 n-3)、エルカ酸 (C22:1 n-9)、C22:1 総量、C22:4 n-3、DPA (C22:5 n-3)、 ω 6 ドコサペンタエン酸 (C22:5 n-6) 及び C22:5 総量については、供試サンプルの 33%以上が定量下限以下であった。また、C16:1 *trans*、C16:3 n-3、C20:2 n-9、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6)、C20:3 n-9、アラキドン酸 (C20:4 n-6)、ドコサジエン酸 (C22:2 n-6) 及び DTA (C22:4 n-6) は全てのサンプルにおいて定量限界以下であった。

種又は Agriculture and Food Systems Institute (AFSI) データベース (AFSI, 2023)⁷ に示される変動範囲内であった。

5 一方で、対照の非組換えセイヨウナタネと比較してオレイン酸 (C18:1 n-9)、C18:1 総量及び C18:2 総量、リノール酸 (C18:2 n-6) の各脂肪酸が総脂肪酸に占める割合は有意に減少し、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3)、C18:3 総量及び DHA (C22:6 n-3) では有意に増加した。これらのうち、意図して産生させた DHA (C22:6 n-3) を除いた各脂肪酸が総脂肪酸に占める割合の平均値は、商業品種又は AFSI データベースの範囲を超えていた。これらの脂肪酸の変化は産生されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼが図 1 (p17) に示した脂肪酸合成経路を触媒することによりもたらされたものと推察された。オレイン酸 (C18:1 n-9) 及び C18:1 総量の減少は Δ -12 デサチュラーゼの働き、リノール酸 (C18:2 n-6) 及び C18:2 総量の減少は ω 3/ Δ -15 デサチュラーゼの働きによるものと考えられる。また、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3) 及び C18:3 総量の増加は、 ω 3/ Δ -15 デサチュラーゼ及び Δ -12 デサチュラーゼの働きによるものと考えられる。

15 なお、本組換えセイヨウナタネにおいて、これらの脂肪酸が総脂肪酸に占める割合の平均値は、植物由来の食用油 (ナタネ油、トウモロコシ油、エゴマ油等) の範囲内であった (日本油脂検査協会, 2020)。また、DHA (C22:6 n-3) が総脂肪酸に占める割合の平均値は長鎖多価不飽和脂肪酸を産生することが知られている魚介類の範囲内であった (文部科学省, 2020)。

20 なお、従来セイヨウナタネ品種では長鎖多価不飽和脂肪酸は α -リノレン酸 (C18:3 n-3) までしか産生されない (図 1, p17)。しかしながら、本試験において、対照の非組換えセイヨウナタネにおいて DHA (C22:6 n-3) が検出された (表 2, p23~24)。これは、試験地でプロットを乱塊法配置することにより栽培を行ったため、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間に一部交雑が生じたことによるものと推察された。本組換えセイヨウナタネにおいて、DHA (C22:6 n-3) の中間産物であるステアリドン酸 (C18:4 n-3)、ETA (C20:4 n-3)、EPA (C20:5 n-3) 及び DPA (22:5 n-3) が総脂肪酸に占める割合の平均値はそれぞれ約 2.5%、1%、0.5%及び 1%であったが、供試サンプル数の 33%以上が定量限界以下であったため統計解析の対象外となった。これらの中間産物の脂肪酸の蓄積量が少なかったのは、産生されたデサチュラーゼ及びエロンガーゼが中間産物を効率よく DHA (C22:6 n-3) へと転換したためと考えられた。

⁷ ILSI Research Foundation により作成、公開されている構成成分のデータベースで、非組換え作物から得られたデータからなる。現在 16 作物が登録されており、約 1,400,000 データポイントが収載されている。なお、本データベースを作成、公開している ILSI Research Foundation は、2020 年 5 月 1 日より Agriculture and Food Systems Institute (AFSI) と改称している (<https://foodsystems.org>)。

また、本組換えセイヨウナタネにおいて、総トランス脂肪酸が総脂肪酸に占める割合の平均値は、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考えられたが、総脂肪酸に占めるトランス脂肪酸の割合は 1% 未満であった (表 2, p23~24)。さらに、セイヨウナタネの種子中に含まれ、有害物質として知られるエルシン酸 (C22:1 n-9) の値は、供試サンプルの 95% が定量限界値未満であり、カノーラ品種の基準である精油中のエルシン酸含量が 2% 未満であること (OECD, 2011b) を満たすものであった。本組換えセイヨウナタネにおける総脂肪酸の値は対照の非組換えセイヨウナタネと比較して有意に減少していたが、商業品種の変動範囲内であった。また、従来セイヨウナタネ油と本組換えセイヨウナタネ油を経口投与したラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験では、投与による悪影響は認められなかった (Murillo et al., 2021)。また本組換えセイヨウナタネ油と油かすを混合した飼料を投与した 13 週間食餌毒性試験においても悪影響は認められなかった (Murillo et al., 2021)。さらに、本組換えセイヨウナタネ油を魚 (アトランティックサーモン) の飼料に使用した研究においても、従来の魚油を使用した飼料を与えた魚と比較し成長性、生存率及び健康状態を調査したが、悪影響は見られなかった (Davis and Devine, 2023)。

以上の結果から、図 1 (p17) に示した意図した脂肪酸以外については、対照の非組換えセイヨウナタネと比較して統計学的有意差が認められない、又は統計学的有意差が認められたものの商業品種又は AFSI データベース (AFSI, 2023) に示される変動範囲内であることが確認されている (表 2, p23~24)。

なお、シロイヌナズナ (*A. thaliana*)、カラシナ (*B. juncea*)、アブラナ (*B. rapa*) 及びセイヨウナタネにおいて、脂肪酸改変に伴う脂質の減少が発芽率の低下に影響を及ぼす可能性が報告されている (Bhattacharya et al., 2015; Knutzon et al., 1992; Miquel and Browse, 1994)。

そこで、2015 年にオーストラリアの温室で収穫された本組換えセイヨウナタネ (T₃ 世代: 図 3, p30) 及び対照の非組換えセイヨウナタネから収穫された種子の発芽率を、4 段階の温度において調査した。その結果、16°C 及び 24°C における発芽率は、本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネともに 100% であった。一方で、10°C 及び 32°C において、本組換えセイヨウナタネの発芽率は、非組換えセイヨウナタネの発芽率と比較して有意に低下していた (表 3, p25)。10°C における発芽率は、本組換えセイヨウナタネが 81.3%、対照の非組換えセイヨウナタネが 100% であった。また、32°C にお

る発芽率は、本組換えセイヨウナタネが 86.8%、対照の非組換えセイヨウナタネが 98.3%であった (表 3, p25)。

5 また、詳細は第一-2-(6) に記載するが、筑波大学 T-PIRC 産官学・共同研究部門 (インダストリアルゾーン)・模擬的環境試験圃場V (隔離ほ場) において実施した隔離ほ場試験において、収穫後の種子の発芽率を調査した結果、本組換えセイヨウナタネが 98.0%、対照の非組換えセイヨウナタネが 95.3%となり、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5)。

PAT 蛋白質

10

PAT 蛋白質は、除草剤グルホシネートの活性成分である L-グルホシネートをアセチル化する反応を触媒するが、L-グルホシネートの構造類似体である L-グルタミン酸やその他の L-アミノ酸に対してアセチル基を転移することはなく、20 種のそれぞれのアミノ酸存在下においても L-グルホシネートへのアセチル基転移反応は阻害されることはない (Wehrmann et al., 1996)。このことから、PAT 蛋白質はグルホシネートに対して高い基質特異性を有しており、グルホシネート以外の化合物を代謝して宿主の代謝系への影響を及ぼすことはないと考えられる。

15

表 2 本組換えセイヨウナタネの種子中における脂肪酸組成⁸

分析対象	試験材料	平均値 (%)	標準偏差	測定範囲	p-値	商業品種の範囲	AFSIデータベースの値 (範囲) (AFSI, 2023)
C14:0 ミリスチン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.075	0.005	0.067 ~ 0.089	0.2289	0.055 ~ 0.096	0.06 (0.04 ~ 0.09)
	本組換えセイヨウナタネ	0.077	0.004	0.070 ~ 0.086			
C16:0 パルミチン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	4.310	0.110	4.093 ~ 4.582	<0.0001*	3.625 ~ 4.818	4.20 (3.47 ~ 5.70)
	本組換えセイヨウナタネ	4.503	0.086	4.368 ~ 4.692			
C16:1 総量	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.267	0.012	0.250 ~ 0.302	<0.0001*	0.214 ~ 0.335	0.24 (0.16 ~ 0.40)
	本組換えセイヨウナタネ	0.294	0.012	0.272 ~ 0.325			
C17:0 マルガリン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.047	0.005	0.042 ~ 0.055	0.0248*	0.040 ~ 0.060	0.07 (0.03 ~ 0.14)
	本組換えセイヨウナタネ	0.048	0.004	0.038 ~ 0.056			
C17:1 n-8 マルガロレイン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.059	0.004	0.050 ~ 0.068	<0.0001*	0.052 ~ 0.079	0.08 (0.04 ~ 0.16)
	本組換えセイヨウナタネ	0.044	0.003	0.042 ~ 0.054			
C18:0 ステアリン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	2.212	0.082	2.050 ~ 2.340	0.0868	1.410 ~ 2.260	2.01 (1.35 ~ 2.89)
	本組換えセイヨウナタネ	2.151	0.078	2.020 ~ 2.460			
C18:1 n-7 バクセン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	2.678	0.079	2.503 ~ 2.872	<0.0001*	2.363 ~ 3.100	NR
	本組換えセイヨウナタネ	2.870	0.096	2.701 ~ 3.079			
C18:1 n-9 オレイン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	57.069	1.477	54.591 ~ 59.906	<0.0001*	49.157 ~ 72.679	63.21 (53.19 ~ 76.85)
	本組換えセイヨウナタネ	42.031	2.429	37.231 ~ 47.382			
C18:1 総量	対照の非組換えセイヨウナタネ	59.823	1.441	57.404 ~ 62.601	<0.0001*	51.934 ~ 74.358	NR
	本組換えセイヨウナタネ	45.005	2.379	40.443 ~ 50.278			
C18:2 n-6 リノール酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	19.341	0.827	16.600 ~ 20.580	<0.0001*	11.592 ~ 23.265	19.04 (12.70 ~ 25.68)
	本組換えセイヨウナタネ	8.502	0.237	8.037 ~ 9.075			
C18:2 総量	対照の非組換えセイヨウナタネ	19.441	0.825	16.737 ~ 20.680	<0.0001*	11.706 ~ 23.361	NR
	本組換えセイヨウナタネ	8.762	0.232	8.367 ~ 9.328			
C18:3 n-3 α -リノレン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	11.185	0.743	9.960 ~ 12.620	<0.0001*	3.905 ~ 12.083	8.36 (1.79 ~ 13.07)
	本組換えセイヨウナタネ	21.040	1.081	18.810 ~ 22.870			

⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

表 2 本組換えセイヨウナタネの種子中における脂肪酸組成 (続き)

分析対象	試験材料	平均値 (%)	標準偏差	測定範囲	p-値	商業品種の範囲	AFSIデータベースの値 (範囲) (AFSI, 2023)
C18:3 総量	対照の非組換えセイヨウナタネ	11.278	0.767	10.020 ~ 12.730	<0.0001*	3.930 ~ 12.192	NR
	本組換えセイヨウナタネ	22.207	1.141	19.810 ~ 24.190			
C20:0 アラキジン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.475	0.012	0.455 ~ 0.500	<0.0001*	0.422 ~ 0.730	0.64 (0.48 ~ 0.95)
	本組換えセイヨウナタネ	0.589	0.012	0.568 ~ 0.624			
C20:1 n-9 エイコセン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.951	0.025	0.903 ~ 1.040	<0.0001*	0.878 ~ 1.590	1.30 (0.93 ~ 3.33)
	本組換えセイヨウナタネ	1.185	0.032	1.130 ~ 1.250			
C20:2 n-6 エイコサジエン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.060	0.005	0.049 ~ 0.073	<0.0001*	0.050 ~ 0.190	0.08 (0.04 ~ 0.86)
	本組換えセイヨウナタネ	0.091	0.004	0.084 ~ 0.100			
C22:0 ベヘン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.189	0.007	0.176 ~ 0.204	<0.0001*	0.180 ~ 0.387	0.31 (0.19 ~ 0.52)
	本組換えセイヨウナタネ	0.253	0.007	0.242 ~ 0.273			
C22:6 n-3 ドコサヘキサエン酸 (DHA)	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.153	0.284	0.034 ~ 1.550	<0.0001*	0.030 ~ 1.338	NR
	本組換えセイヨウナタネ	8.376	0.810	6.500 ~ 10.300			
C24:0 リグノセリン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.100	0.006	0.089 ~ 0.111	0.1906	0.105 ~ 0.207	0.18 (0.09 ~ 0.32)
	本組換えセイヨウナタネ	0.094	0.005	0.084 ~ 0.104			
C24:1 n-9 ネルボン酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.096	0.007	0.084 ~ 0.110	<0.0001*	0.102 ~ 0.166	0.16 (0.08 ~ 0.40)
	本組換えセイヨウナタネ	0.059	0.004	0.050 ~ 0.069			
総脂肪酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	29.906	1.950	26.267 ~ 34.073	<0.0001*	23.937 ~ 35.778	41.7 (24.6-55.2%DW)
	本組換えセイヨウナタネ	27.265	1.883	22.229 ~ 31.021			
総トランス脂肪酸	対照の非組換えセイヨウナタネ	0.107	0.032	0.077 ~ 0.253	<0.0001*	0.046 ~ 0.232	NR
	本組換えセイヨウナタネ	0.839	0.050	0.727 ~ 0.933			

各脂肪酸の平均値は、総脂肪酸に占める百分率で示した。また、総脂肪酸の平均値については、種子の乾燥重に占める百分率で示した。オーストラリアの8か所のほ場から得られたサンプルについて分析を行い、線形混合モデルを用いた分散分析により統計処理を行った (n=5)。

*: 有意差あり (p<0.05)

表 3 本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネにおける収獲種子の発芽率⁹

供試サンプル	発芽温度			
	10 °C	16 °C	24 °C	32 °C
対照の非組換えセイヨウナタネ	100±0.0 ^a	100±0.0 ^a	100±0.0 ^a	98.3±2.5 ^a
本組換えセイヨウナタネ	81.3±6.1 ^b	100±0.0 ^a	100±0.0 ^a	86.8±6.3 ^b

Holm-Sidak 法により統計処理を行った (n=3)。

異なる文字間に有意差あり (p<0.05)。

5

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

10 本組換えセイヨウナタネの作出に用いたプラスミドは、バイナリーベクター pORE03 (Coutu et al., 2007) 由来の pJP3416 を基に構築された pJP3416_GA7-ModB である (図 2, p27)。

ロ 特性

15

① ベクターの塩基数及び塩基配列

本組換えセイヨウナタネの作出に用いた pJP3416_GA7-ModB の塩基数は 31,557 bp であり、T-DNA 領域の塩基数は 23,505 bp である (別添資料 2)。

20

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

pJP3416_GA7-ModB は、*E. coli* 及びアグロバクテリウムにおける構築ベクターの選抜マーカー遺伝子としてカナマイシンに対する耐性を付与する *nptIII* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

25

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

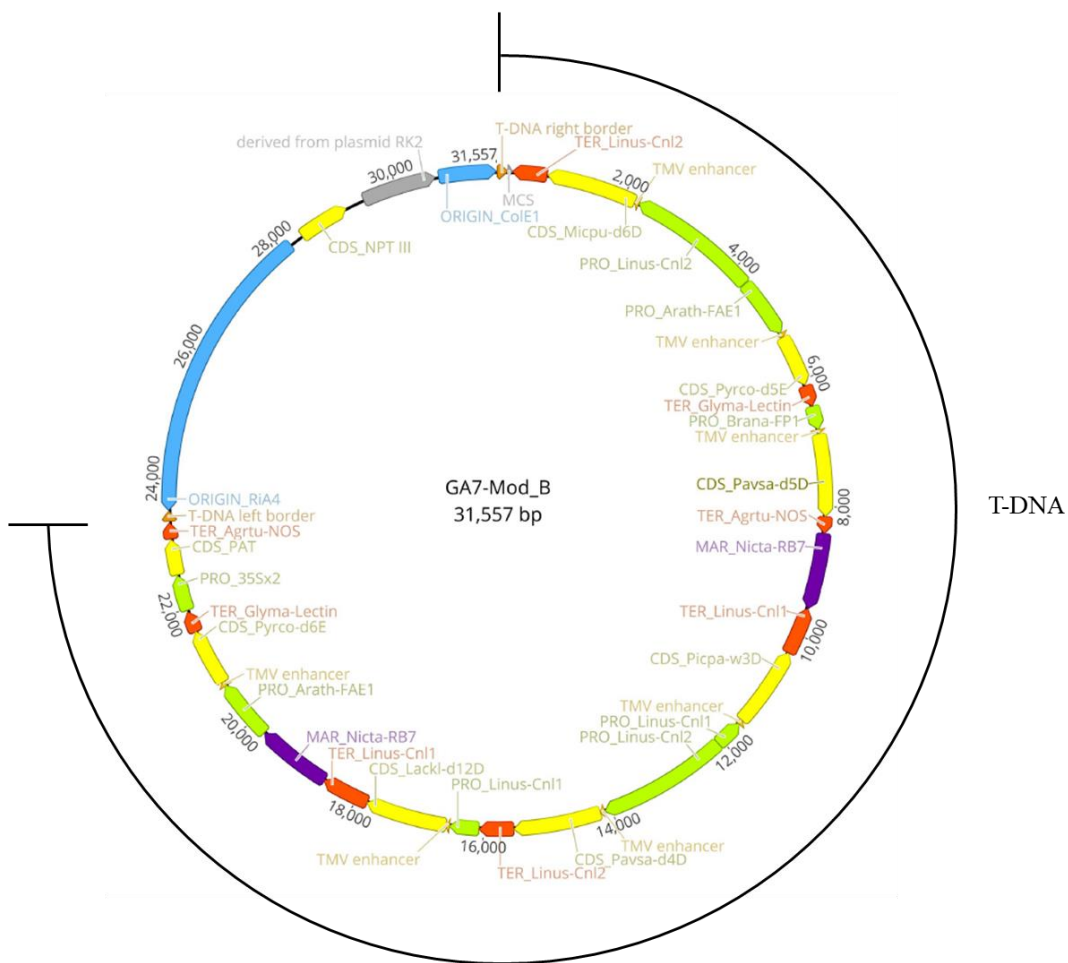
⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

5 イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

宿主内に移入された pJP3416_GA7-ModB の構成要素は表 1 (p10~13) に記載した。また、ベクター内での供与核酸の構成要素の位置は図 2 (p27) に示した。



5 図 2 本組換えセイヨウナタネの作出に用いた pJP3416_GA7-ModB のプラスミドマップ¹⁰

T-DNA 領域は、*Micpu-Δ6D* 遺伝子、*Pyrco-Δ5E* 遺伝子、*Pavsa-Δ5D* 遺伝子、*Picpa-ω3D* 遺伝子、*Pavsa-Δ4D* 遺伝子、*Lackl-Δ12D* 遺伝子、*Pyrco-Δ6E* 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットを含む右

10 側境界配列 (T-DNA right border) から左側境界配列 (T-DNA left border) の間の配列である。

¹⁰ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

pJP3416_GA7-ModB 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法により、従来セイヨウナタネ品種 AV Jade の胚軸部分へ導入した。

5

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

① 核酸が移入された細胞の選抜方法

10 従来セイヨウナタネ品種 AV Jade の胚軸を pJP3416_GA7-ModB を含む *Rhizobium radiobacter* AGL1 株と共置培養した後、セフトキシム、チカルシリン・クラブラン酸及びグルホシネートを含む培地により形質転換された細胞の選抜を行った。

15 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

セフトキシム、チカルシリン・クラブラン酸及びグルホシネートを添加した培地により、形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体を除去した。さらに、
20 本組換えセイヨウナタネの T₃、T₆ 及び T₈ 世代の葉を用いた次世代シーケンサー (以下「NGS」という。) を用いた塩基配列解析の結果、本組換えセイヨウナタネには pJP3416_GA7-ModB の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 2)。このことから、本組換えセイヨウナタネには形質転換に用いられたアグロバクテリウム菌体は残存しないことが確認された。なお、NGS を用いた塩基
25 配列解析の詳細については、第一の 2-(4)-② (p31) に記載した。

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の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

30

形質転換後の胚軸において、除草剤グルホシネートを含む培地で選抜を繰り返す、カルス及び不定芽を誘導した。さらに、除草剤グルホシネート選抜下で不定芽の伸長と発根誘導し、T₀世代の植物体を得た。T₀世代から自殖により得られたT₁世代において、ddPCR (Droplet Digital PCR) 法により、導入遺伝子をホモ接合体で有する個体を選抜した。その後、自殖を繰り返す、各試験に用いた
35 世代の植物体を得た。

本組換えセイヨウナタネの育成図を図 3 (p30) に示した。なお、本申請の対象はT₆世代及びT₆世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

【社外秘情報につき非開示】

10

図 3 本組換えセイヨウナタネの育成図

各試験に供試験した世代は図下部に記載した。

15

(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 移入した核酸の複製物が存在する場所

5 次項の NGS を用いた解析により、本組換えセイヨウナタネにおいて、A02 染色体に一部欠損をもつ 1 コピーの T-DNA 領域、A05 染色体に完全長の T-DNA 領域及び複数の T-DNA 領域の断片 (図 5, p35) がそれぞれ存在していることを確認した。

10 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おける伝達の安定性

本組換えセイヨウナタネにおける導入遺伝子のコピー数及び配列同一性、ベクター由来の非意図的な配列の有無、並びに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を用いたシーケンス解析及び導入遺伝子領域の塩基配列解析を実施した (別添資料 2)。

NGSを用いたシーケンス解析

20 NGSであるPacBio®ロングリードシーケンシングテクノロジー (PacBio® ロングリードシーケンス)¹¹ は、1) 平均で10~20 kbの長さのリードを解析することができるため、繰り返しの多い配列や複雑な配列の解析に適している、2) 800万個の zero-mode waveguides (ZMW) を含有する1分子リアルタイム (SMRT®) Cellにより大量のデータを同時に取得することが可能である¹²、3) ロングリードで解析することにより、GC含量の高い領域と低い領域をカバーできるためGC含量による解析精度のバイアスがない、4) ライブラリ作成にPCRを用いないため、PCR増幅バイアスがない、5) ヌクレオチドの取り込みのカイネティクスをリアルタイムで測定することによりDNAの修飾を直接検出可能である、といった特徴をもつ (Gkazi, 2021; Hon et al., 2020; Mantere et al., 2019)。

25

30 以下にその解析手順を記載する。

PacBio®ロングリードシーケンスでは、植物ゲノムを15~18 kbのDNAフラグメントに断片化し、シーケンス用のSMRTbellライブラリを作製する。ライブラリは一本鎖環状DNAとして合成され、その環状化されたDNAを繰り返しシ

¹¹ <https://www.pacb.com/japan/blog/sequencing-101-long-read-sequencing/>

¹² PacBio 社による解説動画; <https://www.youtube.com/watch?v=NHCJ8PtYCFc>

ークエンスすることにより99%以上の解析精度をもつHiFiリードと呼ばれるリードが生成される (中村, 2021) (図 4, p 32;別添資料 2のFigure 3, p10)。

次に、生成されたHiFiリード配列を、本組換えセイヨウナタネの作出に用いたpJP3416_GA7-ModB の塩基配列と照合し¹³、pJP3416_GA7-ModBと相同性がある配列を選抜した。この解析の際に、非意図的な外側骨格領域由来の配列の有無を解析した。その後、選抜されたHiFiリードをGeneious Prime V11を用いてアセンブリ¹⁴し、コンティグを作成した。コンティグのうち、pJP3416_GA7-ModBと相同性を示した部分 (導入遺伝子の配列) はpJP3416_GA7-ModBの配列と、それ以外の配列はNCBIに保管されているセイヨウナタネゲノム配列と照合し、導入遺伝子のコピー数及び導入遺伝子構成を解析した。

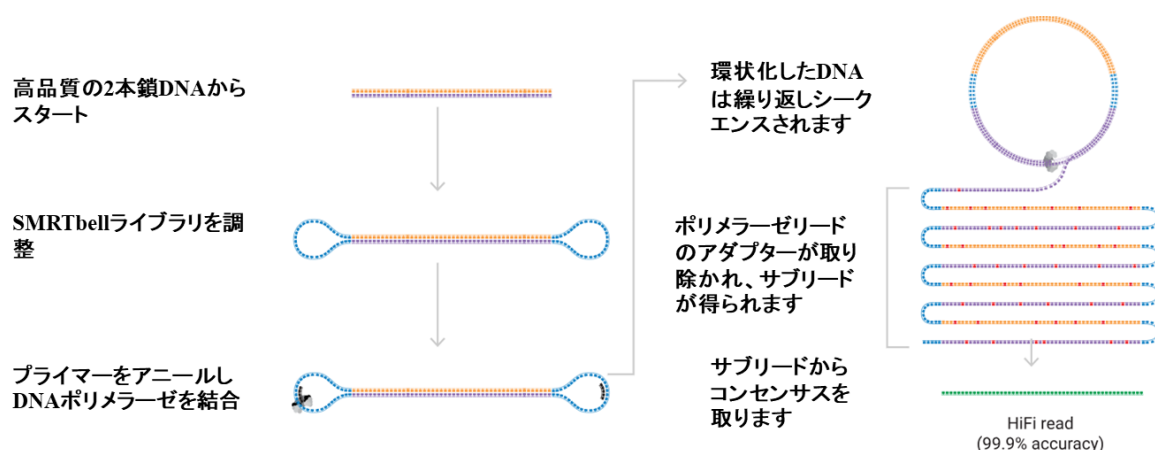


図 4 HiFi リードの生成方法¹⁵

<https://www.pacb.com/technology/hifi-sequencing/>を基に改定

15

¹³ BLAST 検索において、1 か所のミスマッチが 4 塩基未満、E-score が 1×10^{-1} 以下の相同性が認められた配列を選抜した。

¹⁴ アセンブリ (assembly) とは、「組み立て」という意味で、シーケンス解析においてはリード (read) をつないで、コンティグ (contig) という一つながりの長い塩基配列を組み立てることをいう。(http://www.med.osaka-cu.ac.jp/bacteriology/b-online/omics/yougo/assembly.shtml)

¹⁵ 本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

本組換えセイヨウナタネのPacBio®ロングリードシーケンスを用いた解析

本組換えセイヨウナタネのT₃、T₆及びT₈世代の葉から抽出したゲノムDNAを PacBio®ロングリードシーケンサー (PacBio® Sequel IIe) を用いて解析した。その結果、T₃世代で約7.3 Gb (平均冗長度約7.3)、T₆世代で29.9 Gb (平均冗長度約30)、T₈世代で約37.9 Gb (平均冗長度約38)の塩基配列を解析することができた (別添資料 2のTable 2, p11)。また、HiFiリードの数は、T₃世代で15,967、T₆世代で15,694、T₈世代で18,077であった (別添資料 2のTable 2, p11)。なお、pJP3416_GA7-ModBにはセイヨウナタネ由来のプロモーターである PRO_Brana-FPIが含まれるため、PRO_Brana-FPIに対応する配列を含むものの pJP3416_GA7-ModBに含まれる他の構成要素の配列を含まないHiFiリードは以後の解析対象から除外した。

得られたHiFiリードのうち、pJP3416_GA7-ModBと相同性があるHiFiリード配列を抽出した結果、T₃世代で36 (平均リード長15,781 bp)、T₆世代で158 (平均リード長15,823 bp)、T₈世代で148 (平均リード長17,987 bp) のHiFiリードが選抜された。これらの配列をアセンブルした結果、2つのコンティグが得られた。1つはA02染色体のゲノム配列に隣接するコンティグ、もう1つはA05染色体のゲノム配列に隣接するコンティグであった。よって、本組換えセイヨウナタネのゲノム中の2か所にT-DNA領域が組込まれていることが示された。また、本解析において得られたHiFiリードにはpJP3416_GA7-ModBの外側骨格領域と相同性をもつものは認められなかったことから、これら外側骨格領域が挿入されていないことが確認された。

以下、A02及びA05染色体に挿入された導入遺伝子についてT₆世代のサンプルから得られた結果にもとづき記載する。

A02染色体上における導入遺伝子の構成

本組換えセイヨウナタネのA02染色体のゲノム配列を含むコンティグは、47個のHiFiリードから構築され、16,078 bpの導入遺伝子5'末端側のセイヨウナタネ内在性配列、12,110 bpの導入遺伝子配列、22,594 bpの導入遺伝子3'末端側のセイヨウナタネ内在性配列を含む合計50,782 bpの長さをもつ配列であった (別添資料 2のFigure 5, p15)。コンティグを解析した結果、本組換えセイヨウナタネのA02染色体に挿入された導入遺伝子配列は、*Micpu-Δ6d*、*Pyrco-Δ5e*、*Pavsa-Δ5d*及び*Picpa-ω3d*の4つの遺伝子発現カセット並びに*Pavsa-Δ4D*遺伝子発現カ

セットのプロモーターである*Linus-Cnl2*の一部を含んでおり、これら導入遺伝子領域内に塩基置換は見られなかった (別添資料 2のTable 4, p22~23)。

A05染色体上における導入遺伝子の構成

5

本組換えセイヨウナタネのA05染色体のゲノム配列を含むコンティグは、111個のHiFiリードから構築され、23,802 bpの導入遺伝子5'末端側のセイヨウナタネ内在性配列、【社外秘情報につき非開示】 bpの導入遺伝子配列、19,724 bpの導入遺伝子3'末端側のセイヨウナタネ内在性配列を含む合計99,301 bpの長さをもつ配列であった (別添資料 2のFigure 7, p18)。コンティグを解析した結果、本組換えセイヨウナタネのA05染色体に挿入された導入遺伝子の配列は、完全なT-DNA領域とT-DNA領域の断片の両方を含む、複数のT-DNAのコピーを含んでいることが確認された。導入遺伝子の構成は、【社外秘情報につき非開示】を含むことが確認された (図 5, p35及び別添資料 2のTable 5, p24~28)。

15

本組換えセイヨウナタネのT₃及びT₈世代を対象とした解析においても同様の結果が得られていることから、各世代において、本組換えセイヨウナタネの導入遺伝子が、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 2のFigure 6, p16 及び Figure 8, p19)。

20

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

上述したように、本組換えセイヨウナタネのA02染色体には一部が欠失した1コピーのT-DNA領域、具体的には、*Micpu-A6D*遺伝子、*Pyrco-A5E*遺伝子、*Pavsa-A5D*遺伝子及び*Picpa-ω3D*遺伝子の完全な形の遺伝子発現カセット及び*Micpu-A6D*遺伝子発現カセットのターミネーターである*Linus-Cnl2*の一部が導入されていることが確認されている (図 5, p35)。

また、A05染色体には、完全長のT-DNA領域及び複数のT-DNA領域の断片が導入されていることが確認されている (図 5, p35)。

30

【社外秘情報につき非開示】

5

図 5 本組換えセイヨウナタネの A02 染色体及び A05 染色体に導入された導入遺伝子の模式図

- 10 図は本組換えセイヨウナタネ中の構成要素の大まかな位置と配列を示している。
本組換えセイヨウナタネの A02 染色体には T-DNA 領域のうち、*Micpu-A6D* 遺伝子、*Pyrco-A5E* 遺伝子、*Pavsa-A5D* 遺伝子及び *Picpa-ω3D* 遺伝子の完全な形の遺伝子発現カセット並びに *Pavsa-A4D* 遺伝子発現カセットのプロモーターである *Linus-Cnl2* の一部が導入されている。
本組換えセイヨウナタネの A05 染色体には、完全長の T-DNA 領域 (③) 及び複数の T-DNA 領域の断片 (①、②、④～⑦) が導入されている。

15

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

2016年にオーストラリアの3試験地において栽培した本組換えセイヨウナタネ (T₅ 世代) の異なる生育段階及び組織における導入遺伝子から発現する各蛋白質の発現の有無を Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry (LC-MRM-MS)¹⁶ により確認した (Colgrave et al., 2019)。その結果、種子特異的プロモーターを使用した5種類のデサチュラーゼ及び2種類のエロンガーゼの発現は、成熟種子及び未熟種子において検出された (表 4, p37)。

Pyrco-Δ6E 蛋白質の発現量は、本組換えセイヨウナタネにおいて新たに発現する5種類のデサチュラーゼ及び2種類のエロンガーゼの中で最も低く、成熟種子では定量限界以下であった。一方、未熟種子では発現が確認された (230 ~ 480 ng/mg 総蛋白質)。Pavsa-Δ4D 蛋白質は、5種類のデサチュラーゼ及び2種類のエロンガーゼの中で最も発現量が高く、成熟種子において 1,340 ~ 1,550 ng/mg 総蛋白質、未熟種子において 3,200 ~ 5,600 ng/mg 総蛋白質であった。

一方で、導入遺伝子から発現するデサチュラーゼ及びエロンガーゼは胚特異的プロモーターで制御されていることから、分析を行った種子以外の組織・生育段階 (5 葉期の植物体、第3節伸長期の植物体、50%開花期の花、根及び植物体) では、種子で最も発現量が高かった Pavsa-Δ4D 蛋白質においても検出限界以下であった (Colgrave et al., 2019)。

また、PAT 蛋白質の発現量は、未熟種子及び成熟種子を含むいずれの組織、生育段階においても発現が確認された (表 4, p37 及び表 5, p37; Colgrave et al., 2019)。

さらに、2013年から2016年にかけてオーストラリアの温室で栽培された本組換えセイヨウナタネ (T₃ ~ T₇ 世代) の種子を用いて、ガスクロマトグラフ法により DHA 含量を測定した。その結果、本組換えセイヨウナタネの各世代において DHA が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 (別添資料 3 の Table 11, p15)。

¹⁶ 質量分析による蛋白質定量法の1つで、選択的にペプチドを定量することができる。本組換えセイヨウナタネ中で産生されるデサチュラーゼ及びエロンガーゼは膜蛋白質であり、ELISA 法等で用いられる特異的抗体の作製が困難であることから、本手法を用いた。なお、本手法の精度については Colgrave et al. (2019) によって確認されている。

表 4 オーストラリアの 3 地点で栽培した本組換えセイヨウナタネにおける導入した各蛋白質の発現量 (Colgrave et al. 2019 より抜粋)¹⁷

発現蛋白質	成熟種子 (ng/mg 総蛋白質 ^a)			未熟種子 (ng/mg 総蛋白質 ^a)		
	栽培地 1	栽培地 2	栽培地 3	栽培地 1	栽培地 2	栽培地 3
Lackl-Δ12D	412 ± 95	476 ± 60	406 ± 81	670 ± 610	1,050 ± 170	850 ± 120
Picpa-ω3D	483 ± 94	430 ± 30	351 ± 92	650 ± 530	1,057 ± 28	635.1 ± 9.1
Micpu-Δ6D	190 ± 91	220 ± 140	210 ± 180	470 ± 370	870 ± 300	794 ± 95
Pyrco-Δ6E	<LOD	<LOD	<LOD	230 ± 120	430 ± 220	480 ± 50
Pavsa-Δ5D	742 ± 92	930 ± 290	760 ± 480	940 ± 750	2,030 ± 270	1,900 ± 200
Pyrco-Δ5E	409 ± 78	500 ± 270	440 ± 320	670 ± 490	1,310 ± 390	1,290 ± 150
Pavsa-Δ4D	1,550 ± 130	1,430 ± 300	1,340 ± 520	3,200 ± 2,700	5,600 ± 1,300	5,560 ± 920
PAT	23.1 ± 4.5	33 ± 11	29.2 ± 5.5	330 ± 140	390 ± 210	605 ± 76

5 ^a: 蛋白質の発現量は総蛋白質1mg当たりのngで表記する。平均値、標準偏差は採取されたそれぞれのサンプルから計算している (栽培地3の未熟種子はn=2、それ以外はn=3)
<LOD: 定量限界以下

表 5 本組換えセイヨウナタネにおける PAT 蛋白質の発現量 (Colgrave et al. 2019 より改変)¹⁸

10

生育段階 組織	5 葉期 全植物体	第 3 節伸長期 全植物体	根	50%開花期 花	その他の植物組織
本組換えセイヨウナタネ	46 ± 15	107 ± 66	173 ± 33	310 ± 180	130 ± 92
対照の非組換えセイヨウナタネ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

*蛋白質の発現量は総蛋白質1mg当たりのngで表記する。平均値、標準偏差は採取されたそれぞれのサンプルから計算している (n=3)
<LOD: 定量限界以下

¹⁷ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

¹⁸ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

⑤ ウイルス感染その他経路を経由して移入された核酸が野生動植物に伝達されるおそれのある場合は、当該伝達性の有無および程度

5 移入された核酸の配列には伝達を可能とする機能はないため、ウイルスの感染その他の経路を経由して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

10 本組換えセイヨウナタネは、2か所の異なる遺伝子座に導入されたそれぞれの導入遺伝子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 4)。

本法による導入遺伝子の検出限界は、ゲノム量比で0.01%である。また、本法の信頼性はNuseed社及びeBDI社において、施設間互換性が確保されていることが確認されている (別添資料 4のSection VII. Page 36~58)。

15

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

20 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

25 本組換えセイヨウナタネは、導入した5種類のデサチュラーゼ及び2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DHAを最終生成物とする長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する。また、*pat* 遺伝子から発現するPAT蛋白質により、除草剤グルホシネートへの耐性が付与されている。

30 ② 以下に掲げる生理学的又は生態学的特性について、遺伝子組換え農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

35 令和3年から令和4年にかけて生物多様性影響評価を行うため、筑波大学 T-PIRC 産官学・共同研究部門 (インダストリアルゾーン)・模擬的環境試験圃場 V (隔離ほ場) において隔離ほ場試験を実施した。試験には、本組換えセイヨウナタネの T₈ 世代及び本組換えセイヨウナタネの遺伝子導入に用いた非組換えセイヨウナタネ品種 AV Jade (以下、非組換えセイヨウナタネという) を用い

た。

a) 形態及び生育の特性

5 形態及び生育特性に関わる項目として、開花揃い、成熟期並びに収穫時における草丈、一次分枝数、主茎着莢数及び地上部重を調査した。

開花揃い及び成熟期に違いは認められず、主茎着莢数に統計学的有意差は認められなかった。一方、草丈、一次分枝数及び地上部重において、統計学的に有意な差が認められ、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの草丈は、それぞれ 162.3 cm と 190.7 cm、一次分枝数は 6.3 と 5.2、地上部重は 0.51 kg と 0.30 kg であった (別添資料 5, p7~8)。

また、開花時期における草型に違いは認められなかった (別添資料 5, p7~8)。

b) 生育初期における高温耐性

15

日中 35°C/夜間 30°C (各 12 時間) に再設定した人工気象器内 (LH-411PFD-SP; 日本医化器械製作所) に完全無作為法を用い配置し、播種後 36 日目の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の幼苗の生育状況を観察した。播種後 36 日目の幼苗において、本組換えセイヨウナタネの幼苗と対照の非組換えセイヨウナタネの幼苗の生育状況に違いは認められなかった (別添資料 5, p9)。

c) 成体の越夏性

25

隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネを成熟期の後も引き続き生育させ、我が国の夏期における生育状況を観察した。その結果、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネにおいて、成体の越夏性の程度に違いは認められなかった (別添資料 5, p9)。

30 d) 花粉の稔性及びサイズ

隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネの採取した花の雄蕊をスライドガラスに擦るように花粉を取り、酢酸カーミン溶液で染色し、カバーガラスをかけて生物顕微鏡で花粉粘性及びサイズを観察した。その結果、花粉の稔性において、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネにおける花粉の稔性調査の結果、統計学的有意差は認め

られなかった (別添資料 5, p10)。また、本組換えセイヨウナタネ及び非組換えセイヨウナタネにおける花粉のサイズに違いは認められなかった (別添資料 5, p10)。

5 e) 種子の生産量、脱粒性、発芽率及び休眠性

隔離ほ場で生育した本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネの千粒重、裂莢数、莢当たりの種子数、発芽率 (収穫直後)、子実の色及び種子の粒大整否について調査を行った。

10 子実の色及び種子の粒大整否に違いは認められず、千粒重及び発芽率に統計学的有意差は認められなかった。一方、莢当たりの種子数及び裂莢数に関しては、統計学的有意差が認められ、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの莢当たりの種子数はそれぞれ 21.55 粒と 23.40 粒、裂莢数は 43.9%と 23.1%であった (別添資料 5, p10~11)。

15 なお、2015 年から 2016 年にかけてカナダ、オーストラリアで行われたほ場試験では本組換えセイヨウナタネの裂莢数は、商業栽培品種の裂莢数の範囲に収まっていた (別添資料 6)。

f) 有害物質の産生性

20

本組換えセイヨウナタネによる有害物質の産生性の有無を確認するため、後作試験、鋤込み試験及び土壌微生物相試験を行なった。その結果、ハツカダイコンの発芽率、草丈、乾燥重及び土壌微生物の菌数において統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5, p11~13)。

25

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

30 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

35

—

(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の方法

—

5

(4) 生物多様性影響が生ず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

緊急措置計画書を参照

10

(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の環境での使用等の結果

—

15

(6) 国外における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は、表 6 (p41)のとおりである。

20 表 6 本組換えセイヨウナタネの海外における申請状況 (2023年12月現在)¹⁹

機関	安全性審査の種類	承認時期
オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ)	食品	2017年12月
オーストラリア遺伝子技術規制局 (OGTR)	飼料・環境	2018年2月
米国農務省 (USDA)	環境	2018年8月
米国食品医薬品庁 (FDA)	食品・飼料	2022年3月
カナダ保健省 (Health Canada)	食品	2020年7月
カナダ食品検査庁 (CFIA)	環境・飼料	2020年7月

25

¹⁹ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

なお、本組換えセイヨウナタネの我が国における申請状況は以下のとおりである (表 7, p42)。

表 7 本組換えセイヨウナタネの我が国における申請状況 (2023 年 12 月現在)²⁰

5

機関	内容	申請・承認時期
厚生労働省	食品 ²¹	2021年4月申請
農林水産省	飼料 ²²	2020年2月申請
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程: 隔離ほ場) ²³	2021年8月承認
農林水産省・環境省	環境 (第一種使用規程: 一般使用)	2023年7月申請

²⁰ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

²¹ 食品衛生法に基づく。

²² 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。

²³ 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に基づく。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

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等の特定

セイヨウナタネは、路傍や線路端のような定期的に人の手が加えられる地域では生育し得ることが知られているものの、自然の未攪乱の土地に侵入して生態系に影響を与えるような植物ではなく (OECD, 1997)、自然条件下では多年生草本と競合し自生化することは困難であるとされている (OECD, 1997)。

我が国においては、セイヨウナタネの北海道や本州の河原及び線路沿いでの群生 (清水ら, 2001) や、主なセイヨウナタネの輸入港及びその周辺での生育が報告されている (Aono et al., 2011; Aono et al., 2006; Nishizawa et al., 2009; Nishizawa et al., 2010; Saji et al., 2005)。また、我が国のセイヨウナタネの輸入港周辺において、2006 年度から農林水産省により遺伝子組換えセイヨウナタネの生育実態調査が行われており、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、年度を超えて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ことが報告されている (農林水産省, 2020a)。

また、英国の高速道路沿い 3,658 か所において 2 年間にわたりセイヨウナタネのモニタリング調査を行った結果から、運搬途中のこぼれ落ちによる種子の供給がなければ道端に生育するセイヨウナタネ集団の維持が困難であることが示され、人為的攪乱のない自然条件下に生育するセイヨウナタネは 2~4 年で消失することが示唆されている (Crawley and Brown, 1995)。

以上のことから、セイヨウナタネは定期的に人の手が加えられる地域では生育し得るものの、人の手がほとんど加えられない地域では競合における優位性は低く、侵略的外来種のように優占群落を作る可能性は低いと判断された。

競合における優位性にかかわる形質として、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で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、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、発芽率及び休眠性について、我が国での隔離ほ場試験において比較した。

その結果、草丈、一次分枝数、地上部重、莢当たりの種子数及び裂莢数において統計学的有意差が認められた。

草丈は、本組換えセイヨウナタネが 162.3 cm、対照の非組換えセイヨウナタネが 190.7 cm であり、本組換えセイヨウナタネの方が低かった (別添資料 5 の

表 2, p8)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主であり、対照の非組換えセイヨウナタネとして使用した AV Jade が含まれるセイヨウナタネの冬期栽培品種は、草丈が 120~210 cm の範囲をとるとされており (OGTR, 2017)、本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの草丈はその範囲に収まっていた。このことから、本組換えセイヨウナタネにおいて認められた草丈の値は、非組換えセイヨウナタネの種内品種間変動の範囲内であると考えられた。

次に、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの一次分枝数は 6.3 と 5.2 であった。

一次分枝数に関して、Zheng et al. (2017) はセイヨウナタネ 333 系統 (20 系統が winter type、308 系統が semiwinter type、5 系統が不明) を調査し、1.7~15.0 の範囲であったと報告している。また、Luo et al. (2015) は、遺伝的に多様な 155 の近交系の一次分枝数が 4.20~12.05 の範囲であったと報告している。本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの一次分枝数は、これらの文献値の範囲に収まっていた。このことから、本組換えセイヨウナタネにおいて認められた一次分枝数の値は、非組換えセイヨウナタネの種内品種間変動の範囲内であると考えられた。

また、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネの地上部重は 0.51 kg と 0.30 kg であった。地上部重に関して、Mekonnen et al. (2020) は、セイヨウナタネ品種 Westar 及び同 Cresor の交配由来の DH12075 及び黄色種子系統の YN01-429 を親とした倍加半数体系統を用いた研究において、地上部重の平均は 0.3~1.24 kg の範囲であったと報告している。本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの地上部重は、この文献値の範囲に収まっていた。このことから、本組換えセイヨウナタネにおいて認められた地上部重の値は、非組換えセイヨウナタネの種内品種間変動の範囲内であると考えられた。

なお、本隔離ほ場試験で観察された差異は、導入遺伝子によるものではなく、育種における選抜効果によるものであると推定された。本組換えセイヨウナタネは、組換え当代 (T_0) から T_7 世代にわたり単粒系統法を用い、各世代で最も優れた個体が選抜されている。現在の商業エリート品種の育種において、生長よりも収量を目標とすることにより (OECD, 2011a; OECD, 2012)、草丈が減少し、地上部重及び一次分枝数が増加することが知られており (Hossain et al., 2012; Lu et al., 2011; OGTR, 2017; Salisbury and Wratten, 1999; Zhang and Flottmann, 2016)、本組換えセイヨウナタネでも同様の選抜圧がかかることにより、草丈、地上部重、一次分枝数に統計学的有意差として現れたと考えられた。また、隔

離ほ場試験において対照の非組換えセイヨウナタネとして用いられた AV Jade は、本組換えセイヨウナタネの形質転換が行われた 2011 年時点では商業品種であったが、その後、より優れた品種に入れ代わったため、現在では商業栽培されていない。そのため本試験に使用された AV Jade の種子は、選抜を行わず

5

に長年にわたって増やされてきたものが使用された。
本組換えセイヨウナタネの選抜は、収量、高油量、タンパク質含量、脂肪酸組成、グルコシノレート含量、エルシン酸含量、病害抵抗性 (特にオーストラリアでの主要病害である黒脚病抵抗性) を基準とし、相対的に優れた個体を選抜した。脂肪酸組成においては、長鎖多価不飽和脂肪酸含量を最大限に高める

10

ことを目的に選抜が行われた。
なお、2020 年に北米で行われたほ場試験における草丈の計測値は、T₈ 世代の本組換えセイヨウナタネが 115.2 cm、対照の非組換えセイヨウナタネが 123.8 cm と我が国での隔離ほ場試験と同様に対照の非組換えセイヨウナタネの草丈が本組換えセイヨウナタネよりも高くなるという同様の結果を示した (表 8,

15

表 8 北米でのほ場試験における草丈の測定データ (2020 年)²⁴

供試サンプル	N	平均 (cm)	標準偏差 (cm)	最小 (cm)	最大 (cm)
本組換え セイヨウナタネ	44	115.2	21.29	59.0	150.2
対照の非組換え セイヨウナタネ	44	123.8	24.83	63.0	170.9
参照品種	176	115.7	27.70	49.5	169.3

20

莢当たりの種子数は、本組換えセイヨウナタネが 21.55 粒と対照の非組換えセイヨウナタネが 23.40 粒であった。莢当たりの種子数は、通常、1 莢当たり 15~40 個の種子が入っているとされており (Canola Council of Canada, 2023)、本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの莢当たりの種子数はその範囲に収まっていた。

25

裂莢数は、本組換えセイヨウナタネが 43.9%、対照の非組換えセイヨウナタネが 23.1%といずれも高い値であった。一般的に、セイヨウナタネは、裂莢による収量損失を避けるため、成熟期前に収穫されることが一般的であり、種子

²⁴ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

中の水分含量が 35%程度の時期に収穫を行い、8~19 日間の風乾を行う (OGTR, 2017)。本隔離ほ場試験では、成熟期まで生育させた後、さらに風乾した莢を用いて裂莢率を測定したことから、通常の栽培とは異なり、高い裂莢率となったと考えられた。

5 一方で、2015 年から 2016 年にかけてカナダ、オーストラリアで行われたほ場試験では本組換えセイヨウナタネの裂莢数は、商業栽培品種の裂莢数の範囲に収まっていた (別添資料 6)。

よって、本隔離ほ場試験で本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で確認された草丈、一次分枝数、地上部重、莢当たりの種子数及び裂莢数における統計学的有意差が、競合における優位性を高めることはないと考えられた。

10 第一の 2-(1)-ロ-③ (p18~25) に記載したように、本組換えセイヨウナタネでは、デサチュラーゼ及びエロンガーゼの発現により DHA が産生され、種子中における脂肪酸組成が変化している。しかしながら、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報告されていることから (Leonard et al., 2004; Shanklin and Cahoon, 1998)、脂肪酸組成の変化以外に、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。さらに、PAT 蛋白質の基質特異性は非常に高く、構造的に類似する植物内在性物質を基質とすることがないため、宿主の代謝系に影響を及ぼすことはないと考えられた。

20 なお、シロイヌナズナ (*A. thaliana*)、カラシナ (*B. juncea*)、アブラナ (*B. rapa*) 及びセイヨウナタネにおいて、脂肪酸量の増減が発芽率の低下に影響するとの報告がある (Bhattacharya et al., 2015; Knutzon et al., 1992; Miquel and Browse, 1994)。第一-2-(1)-ロ-③に記載したように、オーストラリアの温室で収穫された本組換えセイヨウナタネの種子と非組換えセイヨウナタネから収穫された種子との間で 10 °C 及び 32 °C における発芽率に統計学的有意差が認められた。しかしながら、隔離ほ場試験における収穫種子の発芽率 (収穫直後に実施、25°C) では、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5)。また、Schatzki et al. (2013) を一部改変した方法を用い 2018 年にカナダほ場で収穫した T₇ 世代の種子を休眠誘導した休眠性試験では、2 次休眠率及び休眠誘導中の種子の腐敗率において対照の非組換えセイヨウナタネと本組換えセイヨウナタネの間で差は見られなかった (表 9, p47)。このことから、対照の非組換えセイヨウナタネと本組換えセイヨウナタネの種子の休眠特性は同等であり、低温及び高温時の発芽率の低下は種子休眠によるものではないと考えられた。また、発芽率の低下は自然環境下において発生個体数の減少につながることから、低温及び高温における発芽率の低下は競合における優位性を高めるものではないと

35 考えられた。

表 9 本組換えセイヨウナタネ及び対照の非組換えセイヨウナタネにおける休眠性試験²⁵

供試サンプル	全種子の生存率 (%)	2次休眠率 (%)*	種子の腐敗率 (%)*	休眠打破後の発芽率 (%)
対照の非組換えセイヨウナタネ	96.9	1.2 (1.16)	12.0 (6.36)	100.0 (0.00)
本組換えセイヨウナタネ	100.0	1.0 (0.59)	12.0 (6.36)	100.0 (0.00)

各計算は以下を用いた

全種子の生存率 (%) = 発芽種子数+1 次休眠種子/播種数

5 2 次休眠率 (%) = 2 次休眠種子数/播種数

種子の腐敗率 (%) = 腐敗種子数/播種数

休眠打破後の発芽率 (%) = 発芽種子数/2 次休眠種子数

標準誤差を括弧内に記載した。

10 *Tukey 法により統計処理を行った。本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネ間に有意差はなかった (p<0.05)。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性は非組換えセイヨウナタネと相違はないと考えられ、競合における優位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等は特定されなかった。

15

(2) 影響の具体的内容の評価

—

20 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

25

以上のことから、競合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された。

²⁵ 本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は申請者に帰属する。

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等の特定

5 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 (OGTR, 2008)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主である AV Jade は品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートとなったカノーラ品種である。

10 本組換えセイヨウナタネ中では 5 種のデサチュラーゼ、2 種のエロンガーゼ及び PAT 蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている (第一の 2-(1)-ロ-②, p18)。

15 また、第一の 2-(1)-ロ-③ (p18~25) に示したように、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ことから (Leonard et al., 2004; Shanklin and Cahoon, 1998)、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。さらに、PAT 蛋白質は高い基質特異性を有し、基質であるグルコシノレート以外の化合物にアセチル基を転移することは考えられないことから、植物体内の代謝系に影響を及ぼして新たに有害物質を産生することはないと考えられる。

20 そこで、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起因する影響について以下に検討を行った。

25 EPA 及び DHA を含むオメガ 3 系脂肪酸は、多くの動物種において構造上、機能上重要な目的を果たしており、視覚、神経系機能、細胞シグナル伝達プロセスなどの一連の生理学的プロセスに関与していることが報告されている (Calder, 2014; Swanson et al., 2012; Twining et al., 2016b)。陸生生物は EPA や DHA を餌として直接摂取するか、前駆体である α -リノレン酸として摂取したのちに EPA や DHA へと変換することで利用しており、体内には α -リノレン酸が含まれることが知られている (Twining et al., 2016a; Twining et al., 2016b)。

30 セイヨウナタネを食害することが知られているコウチュウ目、カメムシ目、バッタ目及びチョウ目昆虫は多くの脂肪酸を摂取又は変換して利用することが報告されており、鳥類やげっ歯目はこれらの昆虫種から脂肪酸を摂取することが知られている (Fontaneto et al., 2011; Stanley-Samuelson et al., 1988; Turunen, 1974; Tzompa-Sosa et al., 2014)。例えば、リノール酸 (C18:2 n-6)、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3)、 γ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6)、アラキドン酸 (C20:4 n-6) 及び EPA (C20:5 n-3) は、コオロギ (バッタ目)、コハチノ

スズリガ (チョウ目)、ゴミムシダマシ科 (コウチュウ目)、ゴキブリ (ゴキブリ目) 及びカ (カ科) において存在することが確認され、そ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)。よって、本組換えセイヨウナタネにおいて産生される DHA を含む長鎖多価不飽和脂肪酸は自然環境下に広く存在し、野生動物によって摂取される、又は産生されている。

さらに、本組換えセイヨウナタネが有害物質の産生性について、後作試験、鋤き込み試験及び土壌微生物相試験において対照の非組換えセイヨウナタネと比較したが、いずれの試験においても統計学的有意差は認められなかった。

したがって、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は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

—

(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、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された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、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我が国在来の野生動植物等は特定されない。

なお、我が国に分布するセイヨウナタネと交雑可能な外来の近縁種として、*B. juncea*、*B. rapa*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* が知られている (OECD, 2012; OGTR, 2008; 中井, 2003)。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10

以上のことから、交雑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された。

4 その他の性質

15

第二の3- (1) (p49) に示したとおり、セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、交雑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は特定されなかった。一方で、第一の1- (3)-ニ-③ (p6~8) に示したように、セイヨウナタネは我が国に分布する外来の近縁種である*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana*及び*S. arvensis*と交雑し得るため、本組換えセイヨウナタネと我が国に分布する外来の近縁種が交雑した場合に生ずる可能性のある間接的な影響として、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、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、交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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が生じる、の2点について考察した。

20

25

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

30

セイヨウナタネは我が国に分布する外来の近縁種である*B. rapa*、*B. juncea*、*B. nigra*、*R. raphanistrum*、*H. incana*及び*S. arvensis*と交雑し得るが、これらのうち、自然条件下で交雑する可能性があるのは*B. rapa*及び*B. juncea*である (OECD, 2012; OGTR, 2008; 農林水産省, 2018)。しかし、自然条件下で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、親植物の繁殖様式、花序組織の特性、花粉の交雑親和性並びに他の植物の花粉との競合性等の条件が合致することが必要である

35

(OECD, 2012; OGTR, 2008)。実際に、従来のセイヨウナタネと近縁種との交雑率は低く、雑種が形成されたとしても稔性が低下するか、若しくは不稔となることが知られている (OECD, 2012; OGTR, 2008)。よって、本組換えセイヨウナタネが外来の近縁種と交雑するとしても、その交雑率は低く、形成される雑種の稔性も低下すると考えられる。したがって、本組換えセイヨウナタネが我が国に生育する外来の近縁種と交雑し、その雑種後代が自然条件に適応し我が国の自然環境下で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。

- 10 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、交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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

15 第二の1及び2 (p43~49) に示したように、本組換えセイヨウナタネの競合における優位性及び有害物質の産生性は、従来セイヨウナタネと相違ないと考えられる。

20 本組換えセイヨウナタネでは、発芽率の低下が確認された (第一の2-(1)-ロ-③ (p21)。しかし、上述したようにセイヨウナタネと近縁種の雑種後代が優占化することは考えにくいため、導入遺伝子が我が国に自生するセイヨウナタネ及び近縁種の個体群中に浸透していく可能性は低い。また、隔離ほ場試験における収穫種子の発芽率 (収穫直後に実施、25°C) では、統計学的有意差は認められなかった (別添資料 5)。よって、交雑した近縁種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、本組換えセイヨウナタネで認められた発芽率の低下が長期的な影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

25 また、本組換えセイヨウナタネは、除草剤グルホシネートに対する耐性を付与する *pat* 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に移入したとしても負荷にならないことが報告されていることから (Crawley et al., 1993; Snow et al., 1999)、除草剤グルホシネートが散布されることが想定されない自然条件下において、*pat* 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。

30 隔離ほ場試験においても、雄性側の交雑性に影響を与える花粉稔性に関して、非組換えセイヨウナタネとの差はみられず、雌性稔性への影響に関しても本組換えセイヨウナタネの1莢当たりの種子数を除く種子の生産量は非組換えセイヨウナタネと比較し低下していなかった。1莢当たりの種子数においても、従来セイヨウナタネの1莢当たり15~40粒の範囲 (Canola Council of
35 Canada, 2023) に収まっており導入遺伝子による交雑性への影響はないと考え

られた (別添資料 5の表 3, P10及び表 4, P11)。

したがって、本組換えセイヨウナタネの導入遺伝子が遺伝的負荷となるとは考えにくいため、交雑により我が国に生育する外来の近縁種の個体群中に浸透したとしても、交雑した近縁種の個体群が縮小される可能性は低く、これら近縁種に依存して生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持への影響が生ずる可能性も低いと考えられる。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネと我が国に生育する外来の近縁種及び非組換えセイヨウナタネの交雑により、間接的に生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

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間の使用等の歴史があるが、自然環境下においてセイヨウナタネが雑草化し他の植物種より優占化した例は報告されていない。

10 デサチュラーゼ及びエロンガーゼの発現により脂肪酸組成が改変された本組換えセイヨウナタネの種子において、発芽率の低下がみられたが、発芽率の低下が競合における優位性を高めることは考え難い。また、本組換えセイヨウナタネは除草剤グルホシネート耐性を有するが、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。

15 競合における優位性にかかわる形質として、本組換えセイヨウナタネと対照の非組換えセイヨウナタネとの間で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、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、脱粒性、発芽率及び休眠性について、我が国での隔離ほ場試験において比較した。その結果、草丈、一次分枝数、地上部重、1 莢当たりの種子数及び裂莢数において統計学的有意差が認められた。

20 本組換えセイヨウナタネの宿主であり、対照の非組換えセイヨウナタネとして使用した AV Jade は冬期栽培品種である。セイヨウナタネの冬期栽培品種は、草丈が 120~210 cm の範囲をとるとされており、本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの草丈はその範囲に収まっていた。

25 一次分枝数に関しては、Zheng et al. (2017) 及び Luo et al. (2015) による研究でそれぞれ 1.7~15.0 及び 4.20~12.05 との報告があり、本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの一次分枝数の値は、これらの文献値の範囲に収まっていた。

30 地上部重に関しては、Mekonnen et al. (2020) による研究において、0.3~1.24 kg の範囲を示すことが報告されている。本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの地上部重は、この文献値の範囲に収まっていた。

35 本組換えセイヨウナタネは、組換え当代 (T₀) から T₇ 世代にわたり単粒系統法を用い、各世代で最も優れた個体が選抜されている。現在の商業エリート品種の育種において、生長よりも収量を目標とすることにより、草丈、地上部重の減少及び一次分枝数の増加することが知られており、本組換えセイヨウナタネでも同様の選抜圧がかかることにより、草丈、地上部重、一次分枝数に統計学的有意差として現れたと考えられた。

1 莢当たりの種子数に関しては、通常、1 莢当たり 15~40 個の種子が入っているとされており (Canola Council of Canada, 2023)、本隔離ほ場試験で観察された本組換えセイヨウナタネの莢当たりの種子数はその範囲に収まっていた。

5 また、裂莢数に関しては、一般的に、セイヨウナタネは種子中の水分含量が 35%程度の時期に収穫を行い、8~19 日間の風乾を行う。また、セイヨウナタネの商業栽培では、裂莢による収量損失を避けるため、成熟期前に収穫されることが一般的である。本隔離ほ場試験では、成熟期まで生育させた後、さらに風乾した莢を用いて裂莢率を測定したことから、通常の栽培環境とは異なり、高い裂莢率となったと考えられた。さらに、2015 年から 2016 年にかけてカナダ、
10 オーストラリアで行われたほ場試験では本組換えセイヨウナタネの裂莢数は、商業栽培品種の裂莢数の範囲に収まっていた (別添資料 6)。

よって、本隔離ほ場試験で確認された草丈、一次分枝数、地上部重、莢当たりの種子数及び裂莢数における差が競合における優位性を高めるものではないと考えられた。

15 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する生物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

有害物質の産生性

20 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 (OGTR, 2008)。しかし、本組換えセイヨウナタネの宿主である AV Jade は品種改良により低エルシン酸かつ低グルコシノレートとなったカノーラ品種である。

25 本組換えセイヨウナタネでは 5 種のデサチュラーゼ、2 種のエロンガーゼ及び PAT 蛋白質が発現しているが、これらの蛋白質が有害物質であるとの報告はなく、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を持たないことが確認されている。また、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で新たに産生される脂肪酸は、自然環境下に広く存在し、野生動物によって摂取される、又は産生されていることから、野生生物に影響を与えるものではないと考えられた。

さらに、本組換えセイヨウナタネが有害物質の産生性について、後作試験、
35 鋤き込み試験及び土壌微生物相試験において対照の非組換えセイヨウナタネと比較したが、統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本組換えセイヨウナタネは、有害物質の産生に起因する生

物多様性影響を生じるおそれはないと判断された。

交雑性

5

セイヨウナタネと交雑可能な近縁野生種は我が国に存在しないため、交雑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等は特定されない。また、隔離ほ場試験において、雄性側の交雑性に影響を与える花粉稔性に関して、非組換えセイヨウナタネとの差はみられず、雌性稔性への影響に関しても本組換えセイヨウナタネの種子の生産量は非組換えセイヨウナタネと比較し低下しておらず導入遺伝子による交雑性への影響はないと考えられた (別添資料 5 の表 3, p10 及び表 4, p11)。したがって、交雑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された。

15

その他

セイヨウナタネと交雑可能な外来の近縁種として、*B. juncea*、*B. rapa*、*B. nigra*、*H. incana*、*R. raphanistrum* 及び *S. arvensis* が挙げられる。

本組換えセイヨウナタネと我が国に分布する外来の近縁種が交雑した場合、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、及び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交雑した近縁種の個体群が縮小され、これら近縁種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が生じる可能性が考えられるため、既知の知見に基づき考察を行った。

25

①については、第二の 4-① (p50~52) で示したように、従来のセイヨウナタネと外来の近縁種が自然条件下で交雑し雑種を形成するためには種々の条件が揃う必要があること、さらに実際の交雑率も低く、形成される雑種の稔性は低下するか、若しくは不稔となることから、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。②については、本組換えセイヨウナタネで観察された発芽率の低下が、自然環境下に生息する昆虫等の野生生物の個体群の維持に長期的な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。また、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遺伝的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 *pat* 遺伝子が遺伝的負荷となることは考え難い。したがって、交雑により我が国に生息する外来の近縁種の個体群中に浸透したとしても、交雑した近縁種の個体群が縮小される可能性

35

は低く、こ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が生ずる可能性も低いと考えられた。

- 5 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定に従って使用した場合に、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断された。

参考文献

- AFSI. 2023. Crop Composition Database, Version 9.1 <http://www.cropcomposition.org> (Accessed May 25).
- 5 Aono, M., S. Wakiyama, M. Nagatsu, Y. Kaneko, T. Nishizawa, N. Nakajima, M. Tamaoki, A. Kubo & H. Saji. 2011. Seeds of a possible natural hybrid between herbicide-resistant *Brassica napus* and *Brassica rapa* detected on a riverbank in Japan. *GM Crops*, 2, 201-210.
- Aono, M., S. Wakiyama, M. Nagatsu, N. Nakajima, M. Tamaoki, A. Kubo & H. Saji.
10 2006. Detection of feral transgenic oilseed rape with multiple-herbicide resistance in Japan. *Environmental Biosafety Research*, 5, 77-87.
- Bevan, M. 1984. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic acids research*, 12, 8711-8721.
- Bhattacharya, S., S. Sinha, N. Das & M. K. Maiti. 2015. Increasing the stearate content
15 in seed oil of *Brassica juncea* by heterologous expression of MIFatB affects lipid content and germination frequency of transgenic seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 345-355.
- Bing, D. J., R. K. Downey & G. F. W. Rakow. 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,
20 470-473.
- Brown, J., J. B. Davis, M. Lauver & D. Wysocki. 2008. U.S. Canola Association canola grower's manual. Boise, Idaho.
- Calder, P. C. 2014. Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health.
25 *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1280-1300.
- Canola Council of Canada. 2023. Canola growth stage 7: Development of seed <https://www.canolacouncil.org/canola-encyclopedia/growth-stages/> (Accessed March 16, 2023).
- CFIA. 2017. The biology of *Brassica napus*, L. (canola/rapeseed)
30 <https://www.inspection.gc.ca/plant-varieties/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/brassica-napus-l-eng/1330729090093/1330729278970> (Accessed Aug 11, 2020).
- Chaudhary, S., G. Van Rooijen, M. Moloney & S. S. 2001. Flax seed specific promoters.
- 35 Chèvre, A.-M., H. Ammitzbøll, B. Breckling, A. Dietz-Pfeilstetter, F. Eber, A. Fargue, C. Gomez-Campo, E. Jenczewski, R. Jørgensen, C. Lavigne, M. S. Meier, H. C.

- M. den Nijs, K. Pasher, Seguin-Swartz, J. Sweet, C. N. Stewart & S. Warwick. 2004. A review on interspecific gene flow from oilseed rape to wild relatives. In *Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives*, eds. C. M. den Nijs, D. Bartsch & J. Sweet, 235-251. Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing.
- 5 Chèvre, A. M., F. Eber, H. Darmency, A. Fleury, H. Picault, J. C. Letanneur & M. Renard. 2000. Assessment of interspecific hybridization between transgenic oilseed rape and wild radish under normal agronomic conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 1233-1239.
- 10 Choi, Y., J. H. Ahn, Y. D. Choi & J. S. Lee. 1995. Tissue-specific and developmental regulation of a gene encoding a low molecular weight sulfur-rich protein in soybean seeds. *Molecular and General Genetics MGG*, 246, 266-268.
- Colgrave, M. L., K. Byrne, S. V. Pillai, B. Dong, A. Leonforte, J. Caine, L. Kowalczyk, J. A. Scoble, J. R. Petrie, S. Singh & X.-R. Zhou. 2019. Quantitation of seven transmembrane proteins from the DHA biosynthesis pathway in genetically engineered canola by targeted mass spectrometry. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 313-321.
- 15 Coutu, C., J. Brandle, D. Brown, K. Brown, B. Miki, J. Simmonds & D. D. Hegedus. 2007. pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. *Transgenic Research*, 16, 771-781.
- 20 Crawley, M. J. & S. L. Brown. 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.
- Crawley, M. J., R. S. Hails, M. Rees, D. Kohn & J. Buxton. 1993. Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature*, 363, 620-623.
- 25 Davis, B. A. & M. D. Devine. 2023. Evaluation of long-chain omega-3 canola oil on Atlantic salmon growth, performance, and essential fatty acid tissue accretion across the life cycle: a review. *Aquaculture International*.
- Dröge, W., I. Broer & A. Pühler. 1992. Transgenic plants containing the phosphinothricin-N-acetyltransferase gene metabolize the herbicide l-phosphinothricin (glufosinate) differently from untransformed plants. *Planta*, 187, 142-151.
- 30 FAO. 2020. FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/#home> (Accessed Jul 31, 2020).
- Fontaneto, D., M. Tommaseo-Ponzetta, C. Galli, P. Risé, R. H. Glew & M. G. Paoletti. 2011. Differences in Fatty Acid Composition between Aquatic and Terrestrial
- 35

- Insects Used as Food in Human Nutrition. *Ecology of Food and Nutrition*, 50, 351-367.
- Gallie, D. R., D. E. Sleat, J. W. Watts, P. C. Turner & T. M. Wilson. 1987. A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic acids research*, 15, 8693-8711.
- Gkazi, A. 2021. An Overview of Next-Generation Sequencing. *Technology Networks*.
- Guéritaine, G., S. Bazot & H. Darmency. 2003. Emergence and growth of hybrids between *Brassica napus* and *Raphanus raphanistrum*. *New Phytologist*, 158, 561-567.
- Hall, G., Jr., G. C. Allen, D. S. Loer, W. F. Thompson & S. Spiker. 1991. Nuclear scaffolds and scaffold-attachment regions in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 9320-9324.
- Halweg, C., W. F. Thompson & S. Spiker. 2005. The rb7 matrix attachment region increases the likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study. *The Plant cell*, 17, 418-429.
- Hauser, T. P., R. B. Jørgensen & H. østergård. 1998. Fitness of backcross and F2 hybrids between weedy *Brassica rapa* and oilseed rape (*B. napus*). *Heredity*, 81, 436-443.
- Hon, T., K. Mars, G. Young, Y. C. Tsai, J. W. Karalius, J. M. Landolin, N. Maurer, D. Kudrna, M. A. Hardigan, C. C. Steiner, S. J. Knapp, D. Ware, B. Shapiro, P. Peluso & D. R. Rank. 2020. Highly accurate long-read HiFi sequencing data for five complex genomes. *Sci Data*, 7, 399.
- Hossain, S., G. P. Kadkol, R. Raman, P. A. Salisbury & H. Raman. 2012. *Breeding Brassica napus for shatter resistance. In: Plant Breeding*.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh & M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6, 3901-3907.
- Jørgensen, R. B., B. Andersen, L. Landbo & T. R. Mikkelsen. 1996. SPONTANEOUS HYBRIDIZATION BETWEEN OILSEED RAPE (*BRASSICA NAPUS*) AND WEEDY RELATIVES. 193-200. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
- Kay, R., A. M. Y. Chan, M. Daly & J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science*, 236, 1299.

- Kerlan, M. C., A. M. Chèvre, F. Eber, A. Baranger & M. Renard. 1992. Risk assessment of outcrossing of transgenic rapeseed to related species. *Euphytica*, 62, 145-153.
- 5 Knutzon, D. S., G. A. Thompson, S. E. Radke, W. B. Johnson, V. C. Knauf & J. C. Kridl. 1992. Modification of Brassica seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 2624-2628.
- 10 Knutzon, D. S., J. M. Thurmond, Y. S. Huang, S. Chaudhary, E. G. Bobik, Jr., G. M. Chan, S. J. Kirchner & P. Mukerji. 1998. Identification of Delta5-desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola. *J Biol Chem*, 273, 29360-6.
- Lefol, E., V. Danielou & H. Darmency. 1996. Predicting hybridization between transgenic oilseed rape and wild mustard. *Field Crops Research*, 45, 153-161.
- 15 Leonard, A. E., S. L. Pereira, H. Sprecher & Y.-S. Huang. 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 43, 36-54.
- Lu, G.-y., F. Zhang, P.-y. Zheng, Y. Cheng, F.-I. Liu, G.-p. Fu & X.-k. Zhang. 2011. Relationship Among Yield Components and Selection Criteria for Yield Improvement in Early Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Agricultural Sciences in China*, 10, 997-1003.
- 20 Luo, X., C. Ma, Y. Yue, K. Hu, Y. Li, Z. Duan, M. Wu, J. Tu, J. Shen, B. Yi & T. Fu. 2015. Unravelling the complex trait of harvest index in rapeseed (*Brassica napus* L.) with association mapping. *BMC Genomics*, 16, 379.
- Mantere, T., S. Kersten & A. Hoischen. 2019. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet*, 10, 426.
- 25 Mekonnen, M. D., J. L. Mullen, H. S. Arathi, Y. Assefa, J. K. McKay & P. F. Byrne. 2020. Quantitative trait locus mapping for carbon isotope ratio and root pulling force in canola. *Agrosystems, Geosciences & Environment*, 3.
- Meyer, A., H. Kirsch, F. Domergue, A. Abbadi, P. Sperling, J. Bauer, P. Cirpus, T. K. Zank, H. Moreau, T. J. Roscoe, U. Zahringer & E. Heinz. 2004. Novel fatty acid
30 elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res*, 45, 1899-1909.
- Miquel, M. F. & J. A. Browse. 1994. High-Oleate Oilseeds Fail to Develop at Low Temperature. *Plant physiology*, 106, 421-427.
- 35 Murillo, G., T. Horn, W. D. Johnson & S. MacIntosh. 2021. 28-Day oral (gavage) and 13-week (dietary) toxicity studies of DHA canola oil and DHA canola meal in rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 127, 105050.

- Nishizawa, T., N. Nakajima, M. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo & H. Saji. 2009.
Monitoring the occurrence of genetically modified oilseed rape growing along a
Japanese roadside: 3-year observations. *Environmental Biosafety Research*, 8,
33-44.
- 5 Nishizawa, T., M. Tamaoki, M. Aono, A. Kubo, H. Saji & N. Nakajima. 2010.
Rapeseed species and environmental concerns related to loss of seeds of
genetically modified oilseed rape in Japan. *GM crops*, 1, 1-14.
- OECD. 1997. Consensus document on the biology of *Brassica napus* L. (oilseed rape).
Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 10 OECD. 2002. Module II: Herbicide Biochemistry, Herbicide Metabolism and the
Residues in Glufosinate-Ammonium (Phosphinothricin)-Tolerant Transgenic
Plants Environment Directorate Paris, France: Organisation for Economic Co-
operation and Development.
- OECD. 2011a. Revised consensus document on compositional considerations for new
15 varieties of low erucic acid rapeseed (canola): Key food and feed nutrients, anti-
nutrients and toxicants. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation
and Development.
- OECD. 2011b. Revised consensus document on compositional considerations for new
varieties of low erucic acid rapeseed (canola): Key food and feed nutrients, anti-
20 nutrients and toxicants. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation
and Development.
- OECD. 2012. Consensus document on the biology of the Brassica crops (*Brassica*
spp.). OECD Environment, Health and Safety Publications.
- OGTR. 2008. The biology of *Brassica napus* L. (canola). eds. H. Department of & O. o.
25 t. G. T. R. Ageing. Canberra, ACT, Australia: Australian Government.
- OGTR. 2017. The Biology of *Brassica napus* L. (canola) and *Brassica juncea* (L.)
Czern. & Coss. (Indian mustard). ed. O. o. t. G. T. R. Department of Health.
Australian Government.
- Oura, T. & S. Kajiwara. 2008. Substrate specificity and regioselectivity of delta12 and
30 omega3 fatty acid desaturases from *Saccharomyces kluyveri*. *Biosci Biotechnol*
Biochem, 72, 3174-9.
- Petrie, J. R., Q. Liu, A. M. Mackenzie, P. Shrestha, M. P. Mansour, S. S. Robert, D. F.
Frampton, S. I. Blackburn, P. D. Nichols & S. P. Singh. 2010a. Isolation and
Characterisation of a High-Efficiency Desaturase and Elongases from
35 Microalgae for Transgenic LC-PUFA Production. *Marine Biotechnology*, 12,
430-438.

- Petrie, J. R., P. Shrestha, Q. Liu, M. P. Mansour, C. C. Wood, X. R. Zhou, P. D. Nichols, A. G. Green & S. P. Singh. 2010b. Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. *Plant Methods*, 6, 8.
- 5 Petrie, J. R., P. Shrestha, M. P. Mansour, P. D. Nichols, Q. Liu & S. P. Singh. 2010c. Metabolic engineering of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in plants using an acyl-CoA $\Delta 6$ -desaturase with $\omega 3$ -preference from the marine microalga *Micromonas pusilla*. *Metabolic Engineering*, 12, 233-240.
- 10 Petrie, J. R., P. Shrestha, X.-R. Zhou, M. P. Mansour, Q. Liu, S. Belide, P. D. Nichols & S. P. Singh. 2012. Metabolic Engineering Plant Seeds with Fish Oil-Like Levels of DHA. *PLOS ONE*, 7, e49165.
- 15 Petrie, J. R., X.-R. Zhou, A. Leonforte, J. McAllister, P. Shrestha, Y. Kennedy, S. Belide, G. Buzza, N. Gororo, W. Gao, G. Lester, M. P. Mansour, R. J. Mulder, Q. Liu, L. Tian, C. Silva, N. O. I. Cogan, P. D. Nichols, A. G. Green, R. de Feyter, M. D. Devine & S. P. Singh. 2020. Development of a Brassica napus (Canola) Crop Containing Fish Oil-Like Levels of DHA in the Seed Oil. *Frontiers in Plant Science*, 11.
- Rantio-Lehtimäki, A. 1995. Aerobiology of pollen and pollen antigens. In *Bioaerosols Handbook*, eds. C. S. Cox & C. M. Wathes, 387-407. Lewis Publishers.
- 20 Rieger, M. A., T. D. Potter, C. Preston & S. B. Powles. 2001. Hybridisation between Brassica napus L. and Raphanus raphanistrum L. under agronomic field conditions. *Theoretical and Applied Genetics*, 103, 555-560.
- Rogers, S. G., K. O'Connell, R. B. Horsch & R. T. Fraley. 1985. Investigation of factors involved in foreign protein expression in transformed plants. In *Biotechnology in Plant Science*, eds. M. Zaitlin, P. Day, A. Hollaender & C. A. Wilson, 219-226. New York: Academic Press.
- 25 Rossak, M., M. Smith & L. Kunst. 2001. Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 46, 717-725.
- 30 Saji, H., N. Nakajima, M. Aono, M. Tamaoki, A. Kubo, S. Wakiyama, Y. Hatase & M. Nagatsu. 2005. Monitoring the escape of transgenic oilseed rape around Japanese ports and roadsides. *Environmental Biosafety Research*, 4, 217-222.
- Salisbury, P. A. & N. Wratten. 1999. Brassica napus Breeding., 29-36.
- 35 Sanders, P. R., J. A. Winter, A. R. Barnason, S. G. Rogers & R. T. Fraley. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic acids research*, 15, 1543-1558.

- Schatzki, J., M. Allam, C. Klöppel, M. Nagel, A. Börner, C. Möllers & A. M. Chevre. 2013. Genetic variation for secondary seed dormancy and seed longevity in a set of black-seeded European winter oilseed rape cultivars. *Plant Breeding*, 132, 174-179.
- 5 Scheffler, J. A. & P. J. Dale. 1994. Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research*, 3, 263-278.
- Shanklin, J. & E. B. Cahoon. 1998. DESATURATION AND RELATED MODIFICATIONS OF FATTY ACIDS. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 611-641.
- 10 Shrestha, P., X. R. Zhou, S. Vibhakaran Pillai, J. Petrie, R. de Feyter & S. Singh. 2019. Comparison of the Substrate Preferences of omega3 Fatty Acid Desaturases for Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Int J Mol Sci*, 20.
- Snow, A. A., B. Andersen & R. B. Jørgensen. 1999. Costs of transgenic herbicide resistance introgressed from *Brassica napus* into weedy *B. rapa*. *Molecular Ecology*, 8, 605-615.
- 15 Stålberg, K., M. Ellerström, L.-G. Josefsson & L. Rask. 1993. Deletion analysis of a 2S seed storage protein promoter of *Brassica napus* in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 23, 671-683.
- 20 Stanley-Samuelson, D. W. & R. H. Dadd. 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids: Patterns of occurrence in insects. *Insect Biochemistry*, 13, 549-558.
- Stanley-Samuelson, D. W., R. A. Jurenka, C. Cripps, G. J. Blomquist & M. de Renobales. 1988. Fatty acids in insects: Composition, metabolism, and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 9, 1-33.
- 25 Swanson, D., R. Block & S. A. Mousa. 2012. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*, 3, 1-7.
- Takahata, Y., N. Konno & K. Hinata. 2008. Genotypic variation for floral characters in *Brassica* and allied genera with special reference to breeding system. *Breeding Science*, 58, 385-392.
- 30 Tonon, T., D. Harvey, T. R. Larson & I. A. Graham. 2003. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Δ^4 -desaturase from the microalga *Pavlova lutheri* 1. *FEBS Letters*, 553, 440-444.
- Trieu-Cuot, P. & P. Courvalin. 1983. Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5"-aminoglycoside phosphotransferase type III.
- 35 *Gene*, 23, 331-341.

- Tsuda, M., A. Okuzaki, Y. Kaneko & Y. Tabei. 2012. Relationship between hybridization frequency of *Brassica juncea* X *B. napus* and distance from pollen source *B. napus* to recipient *B. juncea* under field conditions in Japan. *Breeding Science*, 62, 274-281.
- 5 Turunen, S. 1974. Lipid utilization in adult *Pieris brassicae* with special reference to the rôle of linolenic acid. *Journal of Insect Physiology*, 20, 1257-1269.
- Twining, C. W., J. T. Brenna, N. G. Hairston Jr & A. S. Flecker. 2016a. Highly unsaturated fatty acids in nature: what we know and what we need to learn. *Oikos*, 125, 749-760.
- 10 Twining, C. W., J. T. Brenna, P. Lawrence, J. R. Shipley, T. N. Tollefson & D. W. Winkler. 2016b. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids support aerial insectivore performance more than food quantity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 10920.
- Tzompa-Sosa, D. A., L. Yi, H. J. F. van Valenberg, M. A. J. S. van Boekel & C. M. M. Lakemond. 2014. Insect lipid profile: aqueous versus organic solvent-based extraction methods. *Food Research International*, 62, 1087-1094.
- 15 Vodkin, L. O., P. R. Rhodes & R. B. Goldberg. 1983. Ca lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*, 34, 1023-1031.
- Warwick, S. I., M. J. Simard, A. Légère, H. J. Beckie, L. Braun, B. Zhu, P. Mason, G. Séguin-Swartz & C. N. Stewart. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 528-539.
- 20 Wehrmann, A., A. V. Vliet, C. Opsomer, J. Botterman & A. Schulz. 1996. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nature Biotechnology*, 14, 1274-1278.
- 25 Xiang, C., P. Han, I. Lutziger, K. Wang & D. J. Oliver. 1999. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 40, 711-717.
- Yamamori, M. 2011. Outcrossability of *Brassica napus* L. and *B. rapa* L. in an experimental field. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 45, 173-179.
- 30 Zhang, H. & S. Flottmann. 2016. Seed yield of canola (*Brassica napus* L.) is determined primarily by biomass in a high-yielding environment. *Crop and Pasture Science*, 67.
- Zhang, X., M. Li, D. Wei & L. Xing. 2008. Identification and characterization of a novel yeast ω 3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from *Pichia pastoris*. *Yeast*, 25, 21-27.
- 35

- Zheng, M., C. Peng, H. Liu, M. Tang, H. Yang, X. Li, J. Liu, X. Sun, X. Wang, J. Xu, W. Hua & H. Wang. 2017. Genome-Wide Association Study Reveals Candidate Genes for Control of Plant Height, Branch Initiation Height and Branch Number in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *Front Plant Sci*, 8, 1246.
- 5 Zhou, X.-R., S. S. Robert, J. R. Petrie, D. M. F. Frampton, M. P. Mansour, S. I. Blackburn, P. D. Nichols, A. G. Green & S. P. Singh. 2007. Isolation and characterization of genes from the marine microalga *Pavlova salina* encoding three front-end desaturases involved in docosahexaenoic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 68, 785-796.
- 10 財務省. 2020. 財務省貿易統計. <http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm>. [Accessed Jul 31, 2020]
- 志賀敏夫. 2001. ナタネ. 第三巻 雑穀 転作全書. 農山漁村文化協会. pp. 335-348
- 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.
- 15 杉山信太郎. 2001. 日本人とナタネ. 第三巻 雑穀 転作全書. 農山漁村文化協会. pp. 271-280
- 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. 農業環境技術研究所報告. 1-45
- 20 中井秀樹. 2003. アブラナ科 *Cruciferae*. 清水建美 (編) 日本の帰化植物. 平凡社. pp. 80-96
- 中村昇太. 2021. 次世代シーケンス技術の現状と今後—2020. 第99巻 242-245
- 25 日本油脂検査協会. 2020. 食用植物油の脂肪酸組成. <http://www.oil-kensa.or.jp/statistics/statistics.html>. [Accessed Aug 6, 2020]
- 農林水産省. 2018. 遺伝子組換え植物実態調査結果 (平成 29 年実施分) 対象植物: ナタネ類、ダイズ・ツルマメ. 消費・安全局農産安全管理課. <https://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouan/attach/pdf/181220-1.pdf>.
- 30 [Accessed Aug 11, 2020]
- 農林水産省. 2020a. 遺伝子組換え植物実態調査結果 (平成 30 年実施分) 対象植物: ナタネ類、ダイズ・ツルマメ. 消費・安全局農産安全管理課. <https://www.maff.go.jp/j/syouan/nouan/carta/torikumi/attach/pdf/index-226.pdf>. [Accessed Nov 16, 2020]

農林水産省. 2020b. 令和元年産なたね (子実用) の作付面積及び収穫量.

http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/index.html#y1

7. [Accessed Aug 11, 2020]

村上興正・鷺谷いずみ. 2002. 外来種ハンドブック. 地人書館.

- 5 文部科学省. 2020. 日本食品標準成分表 2020 年版 (八訂). 文部科学省 科学技術・学術審議会 資源調査分科会 報告.

https://www.mext.go.jp/content/20201225-mxt_kagsei-mext_01110_031.pdf.

緊急措置計画書

令和5年7月4日

5

氏名 ニューファム株式会社
代表取締役社長 陳 順得
住所 東京都千代田区内幸町二丁目2番2号

10

第一種使用規程の承認を申請している長鎖オメガ三系脂肪酸産生及び除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ (NS-B50027-4、OECD UI: NS-B50027-4 ; 以下、本組換えセイヨウナタネという) 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に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
(令和5年7月現在)

ニューファム株式会社	
○ 【個人情報につき非開示】	ニューファム株式会社 代表取締役社長
【個人情報につき非開示】	ニューファム株式会社 代表取締役副社長
【個人情報につき非開示】	ニューファム株式会社 開発部長

○： 管理責任者

2. 第一種使用等の状況の把握の方法

20

弊社は、Nuseed Nutritional US Inc.と連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子製造、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性のある関係各者から可能な限り情報収集を行う。

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

25

弊社は、Nuseed Nutritional US Inc.と連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの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取り、その使用等を継続するための具体的な措置の内容

生物多様性影響を生ずるおそれがあると認められた場合、弊社は、Nuseed Nutritional US Inc.の協力のもと、本組換えセイヨウナタネが環境中に放出されないように必要かつ適切な措置をとるとともに、環境中に放出された本組換えセイヨウナタネは、環境中で生存しないように不活化する。

5. 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

弊社は、信憑性のある証拠及びデータにより生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、そのことを直ちに農林水産省消費・安全局農産安全管理課及び環境省自然環境局野生生物課に報告する。

長鎖オメガ三系脂肪酸産生及び除草剤グルホシネート耐性セイヨウナタネ
(*Lackl-Δ12D*, *Picpa-ω3D*, *Micpu-Δ6D*, *Pyrco-Δ6E*, *Pavsa-Δ5D*, *Pyrco-Δ5E*, *Pavsa-
Δ4D*, *pat*, *Brassica napus* L.) (NS-B50027-4, OECD UI:NS-B50027-4) の
別添資料リスト

5

- | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 別添資料 1 | Nutrient Composition of Harvested Canola expressing Long-Chain Omega-3 Field-grown in Australia during 2015, Revised 2 (BNDHA-2016-021 Rev.2) (社外秘) |
| 10 別添資料 2 | SEQUENCE CHARACTERIZATION OF DHA CANOLA EVENT NS-B50027-4 (BNDHA-2022-013) (社外秘) |
| 別添資料 3 | Inheritance of the Omega 3 Trait – DHA Canola (OECD ID NS-B50027-4) (BNDHA-2016-019) (社外秘) |
| 15 別添資料 4 | Event-specific Method for the Quantification of Oilseed Rape NS-B50027-4 Using Real-time PCR System; European dossier (BNDHA-2019-005 Rev.1) (社外秘) |
| 20 別添資料 5 | 長鎖オメガ三系脂肪酸産生セイヨウナタネ (<i>Lackl-Δ12D</i> , <i>Picpa-ω3D</i> , <i>Micpu-Δ6D</i> , <i>Pyrco-Δ6E</i> , <i>Pavsa-Δ5D</i> , <i>Pyrco-Δ5E</i> , <i>Pavsa-Δ4D</i> , <i>pat</i> , <i>Brassica napus</i> L.) (NS-B50027-4, OECD UI:NS-B50027-4) の隔離ほ場における試験報告書 (社外秘) |
| 別添資料 6 | DHA Canola Pod Shattering Comparison (BNDHA-2022-007) (社外秘) |