

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）に係る食品健康影響評価（令和 3 年 5 月 17 日付け厚生労働省発生食 0517 第 2 号）については、令和 6 年 8 月 29 日に開催された第 254 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

2. DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）に係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

令和 7 年 3 月 11 日（火）開催の食品安全委員会（第 975 回会合）の翌日の令和 7 年 3 月 12 日（水）から令和 7 年 4 月 10 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

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

令和7年(2025年)3月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

＜審議の経緯＞	3
＜食品安全委員会委員名簿＞	3
＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞	4
要 約	5
Ⅰ. 評価対象食品の概要	6
Ⅱ. 食品健康影響評価	6
第 1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる既存品種の性質に関する事項	6
1. 既存品種の分類学上の位置付けに関する事項	6
2. 既存品種の食経験に関する事項	6
3. 既存品種の食品としての利用方法に関する事項	6
4. 既存品種の遺伝的先祖及び育種開発の経緯並びに近縁の植物種に関する事項	7
5. 既存品種由来の食品の構成成分等に関する事項	8
6. 既存品種のアレルギー誘発性等に関する事項	8
7. 既存品種の栽培および流通過程において、健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項	8
8. 既存品種の安全な摂取に関する事項	8
第 2. 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項	9
1. 新たに付加される形質又は改変される形質	9
2. 利用目的	9
3. 利用方法	9
4. 安全性において検討が必要とされる相違点	9
5. 既存品種以外のものを比較対象とする場合の理由	10
第 3. 挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項	10
1. ベクターの名称及び由来に関する事項	10
2. ベクターの性質に関する事項	10
3. 挿入 DNA の供与体に関する事項	10
4. 挿入 DNA 又は遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物（RNA 及びタンパク質）の性質に関する事項	12
5. そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項	15
6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項	15
7. 構築されたコンストラクトに関する事項	18
第 4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項	18
1. 遺伝子導入に関する事項	18

2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項	21
3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項	22
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合にはその遺伝子産物についても評価すること。）	23
5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項（既存品種及び既存品種に近縁な種に含まれる基質と反応する可能性に関する事項を含む。） .	27
6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項	28
7. 諸外国における認可、食用等に関する事項	32
第5. 第1から第4までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	32
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	32
<参照>	33

<審議の経緯>

- 2021年5月18日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0517第2号）、関係書類の接受
- 2021年5月25日 第817回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年6月21日 第212回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2022年8月26日 第227回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2024年8月29日 第254回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2025年3月11日 第975回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- | 2021年6月30日まで | 2024年6月30日まで |
|--------------|------------------|
| 佐藤 洋（委員長） | 山本 茂貴（委員長） |
| 山本 茂貴（委員長代理） | 浅野 哲（委員長代理 第一順位） |
| 川西 徹 | 川西 徹（委員長代理 第二順位） |
| 吉田 緑 | 脇 昌子（委員長代理 第三順位） |
| 香西 みどり | 香西 みどり |
| 堀口 逸子 | 松永 和紀 |
| 吉田 充 | 吉田 充 |

- 2024年7月1日から
- 山本 茂貴（委員長）
- 浅野 哲（委員長代理 第一順位）
- 祖父江 友孝（委員長代理 第二順位）
- 頭金 正博（委員長代理 第三順位）
- 小島 登貴子
- 杉山 久仁子
- 松永 和紀

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

2021年9月30日まで

中島 春紫 (座長)

児玉 浩明 (座長代理)

安達 玲子

近藤 一成

飯島 陽子

手島 玲子

岡田 由美子

樋口 恭子

小関 良宏

山川 隆

小野 竜一

吉川 信幸

橘田和美

2022年4月1日から2023年9月30日まで

中島 春紫 (座長)

山川 隆 (座長代理)

安達 玲子

佐々木 伸大

岡田 由美子

近藤 一成

小野 道之

樋口 恭子

小野 竜一

藤原 すみれ

2024年4月1日から

児玉 浩明 (座長)

佐々木 伸大 (座長代理)

伊藤 政博

手島 玲子

小野 道之

樋口 恭子

小野 竜一

藤原 すみれ

柴田 識人

百瀬 愛佳

爲廣 紀正

<第227回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明 (千葉大学大学院園芸学研究科教授)

要 約

「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ (NS-B50027-4)」について食品健康影響評価を実施した。

本系統は、セイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) のキャノーラ品種 AV Jade を既存品種とし、微細藻類又は酵母に由来する 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て作出されており、種子中でこれらの脂肪酸合成酵素が発現することにより種子内の内在性脂肪酸であるオレイン酸からドコサヘキサエン酸 (DHA) 等の脂肪酸を産生する。また、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子が導入され、PAT タンパク質が発現することで除草剤グルホシネート耐性が付与される。

5 種類のデサチュラーゼ及び 2 種類のエロンガーゼは、本系統における脂肪酸合成経路において脂肪酸不飽和化及び脂肪酸の鎖長を伸長すること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。

PAT タンパク質は、L-グルホシネートの遊離アミノ基をアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変換して無毒化することで、グルホシネートに対する耐性を植物体に付与する。

「遺伝子組換え食品 (種子植物) に関する食品健康影響評価指針」(平成 16 年 1 月 29 日食品安全委員会決定。以下「評価指針」という。)に基づき、導入遺伝子の供与体の安全性、導入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性、導入遺伝子の塩基配列等の解析、交配後の世代における導入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分及び有害成分の比較の結果等について確認した。

その結果、本系統については、人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理の情報が不十分であり、非組換えセイヨウナタネと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因がないと判断することができなかった。一方で本系統の種子から搾油・精製された油については、製造方法及び油中の総タンパク質含有量 (検出限界 (0.07%) 未満) 等の情報を踏まえ、評価指針の第 1 章第 4 の 2 及び 4 に基づき、食品として利用される形態を考慮し、WOE (weight of evidence) に基づく階層的なアプローチを適用して評価した結果、非組換えセイヨウナタネの種子から搾油・精製された油と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ (NS-B50027-4)」の種子から搾油・精製された油については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象食品の概要

(申請内容)

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

性質：DHA産生及び除草剤グルホシネート耐性

申請者：NUSEED Nutrition US Inc.

開発者：Nuseed Pty Ltd. (豪州)

「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ (NS-B50027-4)」(以下「キャノーラ NS-B50027-4」という。)は、微細藻類又は酵母に由来する長鎖多価不飽和脂肪酸生合成に関与する 7 種類の酵素の遺伝子を導入して作出されており、種子中でこれらの脂肪酸合成酵素が発現することによりドコサヘキサエン酸 (DHA) 等の脂肪酸を産生する。また、*Streptomyces viridochromogenes* に由来する *pat* 遺伝子が導入され、PAT タンパク質が発現することで除草剤グルホシネートを散布しても、その影響を受けずに生育できるとされている。

II. 食品健康影響評価

第 1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる既存品種の性質に関する事項

1. 既存品種の分類学上の位置付けに関する事項

既存品種は、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*Brassica napus* L.) のキャノーラ品種 AV Jade である。

2. 既存品種の食経験に関する事項

低エルカ酸及び低グルコシノレートのキャノーラ品種が育成され、種子から搾油・精製された油が食用として利用されている (参照 1)。

3. 既存品種の食品としての利用方法に関する事項

(1) 収穫時期 (成熟程度) と貯蔵方法

従来の手刈り収穫の適期は、主茎の上から 3 分の 1 の部分の莢において種子 5~6 粒が黒色となった時期であり、多くの莢がまだ裂開しにくい時期である。コンバイン収穫期は手刈り収穫期よりも 1 週間程度遅く、外見的には莢が退緑した時期がコンバイン収穫期になると考えられる。

セイヨウナタネ種子は 15%程度の水分であってもそのまま放置すると発熱するため、収穫した種子はすぐに乾燥させる必要がある (参照 2)。

セイヨウナタネ種子の寿命は、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凍保存した場合には、少なくとも 25 年を経過しても発芽する (参照 3)。

(2) 摂取 (可食) 部位

セイヨウナタネは、油糧原料として広く用いられており、可食部位は主として種子であり、種子から搾油・精製された油が食用油として利用される。

また、油糧用途のほかには若葉や花茎・花蕾が野菜として利用される。

(3) 摂取量

なたね油は、植物性油脂、マーガリン、マヨネーズ及びドレッシングに含まれる。これらの食品の日本人一人当たり一日平均摂取量は、「植物性油脂」^a、「マーガリン」^a、「マヨネーズ」^a及び「ドレッシング」^bについて、それぞれ 8.8 g、1.0 g、3.4 g 及び 2.3 g である。これらの摂取量とそれぞれの品目におけるなたね油の占める割合をもとに算出すると、わが国における一人一日当たりのなたね油の摂取量の合計は 4.9 g 程度と推計される。

(4) 調理及び加工方法

食用油の製造では、セイヨウナタネの種子を圧搾及び溶媒抽出することにより、食用油と搾油かすに分離する。このプロセスには、通常、種子洗浄、種子の前処理及び破碎、種子の加熱・調整、破碎物の押圧（油の一部を機械的に搾り出すため）、残渣の溶媒抽出（残った油を化学的に抽出するため）、粗油と残渣（搾油かす）の脱溶媒が含まれる。

機械的及び化学的に抽出された粗油は、脱ガム処理等によりリン脂質及びタンパク質等の不純物を取り除いた後、アルカリ精製法又はフィジカル精製法（蒸留脱酸法）により遊離脂肪酸が除かれ、脱色・脱臭工程を経て食用可能な精製油となる。低エルカ酸キャノーラ油では、タンパク質は極微量又は含まれない。（参照 1、4、5）。

また、若葉や花茎・花蕾は茹でてお浸しや和え物等として食べられる。

4. 既存品種の遺伝的先祖及び育種開発の経緯並びに近縁の植物種に関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus*) は、*Brassica oleracea* と *Brassica rapa* との交雑に由来すると考えられている。セイヨウナタネ種子から得られた油は、エルカ酸及びグルコシノレートといった有害物質を含むことが知られている。キャノーラ品種は、カナダにおける品種改良により、低エルカ酸及び低グルコシノレート品種として開発された（参照 6）。キャノーラ品種 AV Jade は、豪州で開発され黒脚病耐性を含む複数の形質を有している。

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 (*Brassica juncea*)、

^a 令和元年国民健康・栄養調査報告（厚生労働省令和 2 年 12 月）第 5 表の 1（食品群別摂取量－食品群、年齢階級別、平均値、標準偏差、中央値－総数、1 歳以上）油脂（マーガリン（食品群番号 77）、植物性油脂（食品群番号 78））、調味料・香辛料類（マヨネーズ（食品群番号 95））における一人一日当たり摂取量の平均値

^b 家計調査 家計収支編 表題：都市階級・地方・都道府県庁所在市別 1 世帯当たり支出金額、購入数量及び平均価格に記載された情報から次のとおり一人一日当たりのドレッシング摂取量を算出した。

2,436 g (ドレッシング全国・購入数量) / 2.95 人 (平均世帯人数) / 365 日 = 約 2.3 g

クロガラシ (*Brassica nigra*)、ダイコンモドキ (*Hirschfeldia incana*)、セイヨウノダイコン (*Raphanus raphanistrum*) 及びノハラガラシ (*Sinapis arvensis*) が知られている (参照 3、7、8)。

5. 既存品種由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 既存品種の可食部分の主要栄養素等 (タンパク質、脂質等) の種類及びその量の概要

セイヨウナタネの種子中の主要栄養組成 (対乾燥重量) は、粗タンパク質 24.7%、脂質 40.3%、粗繊維 9.1%、酸性デタージェント繊維 19.4%、中性デタージェント繊維 26.7%及び灰分 5.0%である (参照 1)。

(2) 既存品種に含まれる毒性物質・栄養阻害物質 (栄養素の消化・吸収等を阻害する物質。例えば、トリプシンインヒビター、フィチン酸等) 等の種類及びその量の概要

セイヨウナタネの種子中に含まれるエルカ酸 (C22:1 n-9) 及びグルコシノレートは毒性を持つことが知られているが、キャノーラ品種における油中のエルカ酸 (C22:1 n-9) 含量は 2%未満であり (参照 1)、また、キャノーラ品種の種子中のグルコシノレートの含量は平均で 6.70 $\mu\text{mol/g}$ である (参照 9)。キャノーラ品種の種子中の栄養阻害物質 (対乾燥重量) の含有量は、シナピン 0.19~1.36%、フィチン酸 0.94~3.88%、タンニン 0.14~1.27%である (参照 9)。

6. 既存品種のアレルギー誘発性等に関する事項

Brassica 属のアレルギー誘発性に関する報告は、職業上のばく露 (参照 10、11) 及びキャノーラ品種の大規模栽培地周辺の居住者における呼吸器症状である (参照 12)。また、*Brassica* 属が子供における食物アレルギーである可能性についての研究報告もある (参照 13、14)。

一方でキャノーラ品種から得られる油がアレルギー誘発性を持つという報告はない (参照 1)。

7. 既存品種の栽培及び流通過程において、健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

セイヨウナタネには、菌類、細菌及びウイルスによる各種病害が知られているが、これらがヒトに対して病原性を示すことは知られていない。

8. 既存品種の安全な摂取に関する事項

セイヨウナタネの種子から搾油・精製された油は、食用植物油及び食用加工油脂として用いられる。

以上 1~8 より、キャノーラ NS-B50027-4 の安全性評価においては、既存のセイヨウナタネが比較対象であると判断した。

第2. 遺伝子組換え体の利用目的、利用方法及び既存品種との相違に関する事項

1. 新たに付加される形質又は改変される形質

キャノーラ NS-B50027-4 は、微細藻類由来又は酵母由来の長鎖多価不飽和脂肪酸生合成に関与する7種の遺伝子を導入することで、 ω 3長鎖多価不飽和脂肪酸（以下「 ω 3脂肪酸」という。）であるDHA等の脂肪酸が産生される。主要な ω 3脂肪酸としては、 α -リノレン酸、エイコサペンタエン酸（EPA）及びDHAがある。

また、PATタンパク質が産生される。

2. 利用目的

キャノーラ NS-B50027-4 は、種子脂肪酸中のDHAを含む ω 3脂肪酸を産生させることで、ヒトへの ω 3脂肪酸の供給源となる。また、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができる。

3. 利用方法

(1) 栽培方法、収穫時期、種子の製法及び管理方法

キャノーラ NS-B50027-4 の栽培方法、収穫時期、種子の製法及び管理方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(2) 可食部位、調理及び加工方法

キャノーラ NS-B50027-4 の可食部位は、従来のセイヨウナタネと変わらない。搾油工程は、従来のキャノーラ油と同様であるが、品質劣化を防ぐため、低温処理が推奨される。

(3) 摂取量

キャノーラ NS-B50027-4 の種子から得られた油は、従来のキャノーラ油と同様に使用されるほか、DHAの摂取を目的としたサプリメント^cに使用される。サプリメントに使用される場合、DHAの一日当たり摂取量は、平均489.7 mg及び最大1,100 mgと推計された。

4. 安全性において検討が必要とされる相違点

キャノーラ NS-B50027-4 は、7種類のデサチュラーゼ及びエロンガーゼが発現することによって、種子脂肪酸中のDHAを含む ω 3脂肪酸等の割合が増加し、それに伴いオレイン酸、リノール酸及びリノレン酸の割合が変化する点、PATタンパク質を発現することで、除草剤グルホシネート耐性が付与される点が既存品種との相違点である。

^c 機能性表示食品の届出情報検索（消費者庁）によると、DHAを機能性関与成分とする届出食品224商品（2021年7月1日時点）。

5. 既存品種以外のものを比較対象とする場合の理由

主に既存品種を比較対象としたほか、脂肪酸組成の比較のため、DHA を含む ω 3 脂肪酸等を含有し、食経験のある食用油（アマニ油、イワシ油及びサケ油）を比較対象とした。

第3. 挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項

1. ベクターの名称及び由来に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 の作出に用いられた導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB は、バイナリーベクター pORE03（参照 15）に由来するプラスミド pJP3416 を基に作製された。

2. ベクターの性質に関する事項

(1) ベクターの塩基数及びその塩基配列を示す事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB のベクターバックボーンの塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 16）。

(2) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB のベクターバックボーンの塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB のベクターバックボーンには、カナマイシン及びネオマイシン耐性を付与するネオマイシンリン酸基転移酵素 III (*nptIII*) 遺伝子が含まれているが、キャノーラ NS-B50027-4 のゲノム中には挿入されていない。

(4) 伝達性等に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB のベクターバックボーンには、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

DNA の供与体に関する情報は表 1 に記載のとおりである。

表1 挿入 DNA、その供与体及び遺伝子産物

遺伝子名	供与体	本評価書における表記*	
		遺伝子	タンパク質
① Δ12-不飽和化酵素遺伝子	<i>Lachancea kluyveri</i> (酵母)	<i>Lack1-Δ12d</i> 遺伝子	Lack1-Δ12D
② Δ15-/ω3-不飽和化酵素遺伝子	<i>Pichia pastoris</i> (酵母)	<i>Picpa-ω3d</i> 遺伝子	Picpa-ω3D
③ Δ6-不飽和化酵素遺伝子	<i>Micromonas pusilla</i> (微細藻類)	<i>Micpu-Δ6d</i> 遺伝子	Micpu-Δ6D
④ Δ6-脂肪酸伸長酵素遺伝子	<i>Pyramimonas cordata</i> (微細藻類)	<i>Pyrco-Δ6e</i> 遺伝子	Pyrco-Δ6E
⑤ Δ5-不飽和化酵素遺伝子	<i>Pavlova salina</i> (微細藻類)	<i>Pavsa-Δ5d</i> 遺伝子	Pavsa-Δ5D
⑥ Δ5-脂肪酸伸長酵素遺伝子	<i>Pyramimonas cordata</i> (微細藻類)	<i>Pyrco-Δ5e</i> 遺伝子	Pyrco-Δ5E
⑦ Δ4-不飽和化酵素遺伝子	<i>Pavlova salina</i> (微細藻類)	<i>Pavsa-Δ4d</i> 遺伝子	Pavsa-Δ4D
⑧ ホスフィノスリシンN-アセチル基転移酵素遺伝子	<i>S. viridochromogenes</i> (放線菌)	<i>pat</i> 遺伝子	PATタンパク質

*: Δ (デルタ) + 数字 + アルファベット: 数字は、カルボニル基末端から数えた二重結合を導入する位置を示す。アルファベットは、D: Desaturase (不飽和化酵素)、E: Elongase (脂肪酸伸長酵素)を示す。ω (オメガ) + 数字 + アルファベットは、脂肪酸のメチル基末端から数えた二重結合を作る位置を示す。

(2) 安全性に関する事項 (アレルギー誘発性、毒素産生性を含む。)

Lack1-Δ12d 遺伝子の供与体である *L. kluyveri* はチーズ及び発酵乳の生産に使用され (参照 17)、環境中にも広く分布している (参照 18)。また、タンパク質の製造に用いられている (参照 19)。

Picpa-ω3d 遺伝子の供与体である *P. pastoris* は、メタノール資化性酵母で、食品用タンパク質及び酵素を産生する。また、遺伝子組換え技術を用いた添加物生産における宿主として用いられている (参照 20、21)。

Micpu-Δ6d 遺伝子の供与体である *M. pusilla* は、マミエラ藻綱 (*Mamiellophyceae*) に属し、海域に遍在し、水生生物の食料源となっている (参照 22)。

Pyrco-Δ6e 及び *Pyrco-Δ5e* 遺伝子の供与体である *P. cordata* は、プラシノ藻綱 (*Prasinophyceae*) に属する緑藻植物の一群で、カロテノイド組成を有する。

Pavsa-Δ5d 及び *Pavsa-Δ4d* 遺伝子の供与体である *P. salina* は、パプロバ藻綱 (*Pavlovaephyceae*) に属し、カキの養殖に用いられている (参照 23、24)。

なお、これらの微細藻類である、*M. pusilla*、*P. cordata*、*P. salina* は、IOC-UNESCO の有害微細藻類のリスト^dには登録されていない。

pat 遺伝子の供与体である *S. viridochromogenes* は、土壤中に広く存在し (参照 25)、ヒトに対する病原性は報告されていない。

上記の 8 つの遺伝子の供与体である *L. kluyveri*、*M. pusilla*、*P. salina*、*P.*

^d IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae
(<https://www.marinespecies.org/hab/>)

pastoris, *P. cordata*, *S. viridochromogenes* について文献検索^eを行った結果、全ての供与体について、アレルギー誘発性及び毒素産生性の報告はなかった(参照 26)。

4. 挿入 DNA 又は遺伝子 (遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。) 及びその遺伝子産物 (RNA 及びタンパク質) の性質に関する事項

(1) 導入遺伝子の機能に関する事項

① 遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能

a. 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

キャノーラ NS-B50027-4 では、導入遺伝子から発現する 5 種類のデサチュラーゼ (*Lackl-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 (C18:1 n-9) から DHA (C22:6 n-3) 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。

以下の文献調査及び脂肪酸分析の結果をもとにキャノーラ NS-B50027-4 における脂肪酸生合成経路を図にまとめた。

Lackl-Δ12d 遺伝子がコードする *Lackl-Δ12D* は、オレイン酸 (C18:1 n-9) を基質とする場合、高い変換効率でリノール酸 (C18:2 n-6) を生成することが報告されている (参照 27、28)。

Picpa-ω3d 遺伝子がコードする *Picpa-ω3D* は、ω3-不飽和化酵素であり、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)、*cis*-7,10,13,16-ドコサテトラエン酸 (DTA、C22:4 n-6) 及びω6 ドコサペンタエン酸 (C22:5 n-6) に対して、選好性なくω3-不飽和化することが報告されている (参照 29、30)。

Micpu-Δ6d 遺伝子がコードする *Micpu-Δ6D* は、リノール酸 (C18:2 n-6) 及びα-リノレン酸 (C18:3 n-3) をΔ6-不飽和化するが、α-リノレン酸を基質とするときの変換効率が高いことが報告されている (参照 31)。

Pyrco-Δ6e 遺伝子がコードする *Pyrco-Δ6E* は、Δ6-不飽和脂肪酸の鎖長を伸長する酵素であり、リノール酸 (C18:2 n-6)、γ-リノレン酸 (C18:3 n-6)、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 (参照 32、33)。

Pavsa-Δ5d 遺伝子がコードする *Pavsa-Δ5D* は、Δ5-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 (参照 34)、ETA (C20:4 n-3) から EPA (C20:5 n-3) を生成する反応を触媒すること、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6) をアラキドン酸 (C20:4 n-6) に変換することが報告されている (参照 35)。

^e PubMed データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

Pyrco-Δ5e 遺伝子がコードする *Pyrco-Δ5E* は、 $\Delta 5$ -不飽和脂肪酸の鎖長を伸長する酵素であり、アラキドン酸 (C20:4 n-6) 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) に変換することが報告されている (参照 33)。また、ETA (C20:4 n-3) を DTA (C22:4 n-6) に変換することが報告されている (参照 32)。

Pavsa-Δ4d 遺伝子がコードする *Pavsa-Δ4D* は、 $\Delta 4$ -不飽和化酵素であり、DTA (C22:4 n-6) 及び DPA (C22:5 n-3) に対して、同程度の $\Delta 4$ -不飽和化活性を有し、それぞれ、 $\omega 6$ ドコサペンタエン酸 (C22:5 n-6) 及び DHA (C22:6 n-3) に変換することが報告されている (参照 35、36)。

また、キャノーラ NS-B50027-4 では、①*Lackl-Δ12D* の働きによりリノール酸 (C18:2 n-6) が生成されるものの、②*Picpa-ω3D* 又は③*Micpu-Δ6D* の働きにより α -リノレン酸 (C18:3 n-3) 又は γ -リノレン酸 (C18:3 n-6) へと変換されることが確認された。その後、n-6 系脂肪酸を経由する経路と n-3 系脂肪酸を経由する経路から長鎖多価不飽和脂肪酸が生合成されると考えられた。キャノーラ NS-B50027-4 では、主に、n-3 系長鎖脂肪酸 (ステアリドン酸 (C18:4 n-3)、ETA (C20:4 n-3)、EPA (C20:5 n-3)、DPA (C22:5 n-3) 及び DHA (C22:6 n-3)) において増加が認められ、n-6 系長鎖脂肪酸 (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 DTA (C22:4 n-6)) は定量限界未満であった。したがって、キャノーラ NS-B50027-4 では、n-3 系脂肪酸を経由し、DHA (C22:6 n-3) が産生する経路が優位に働いていると考えられた。

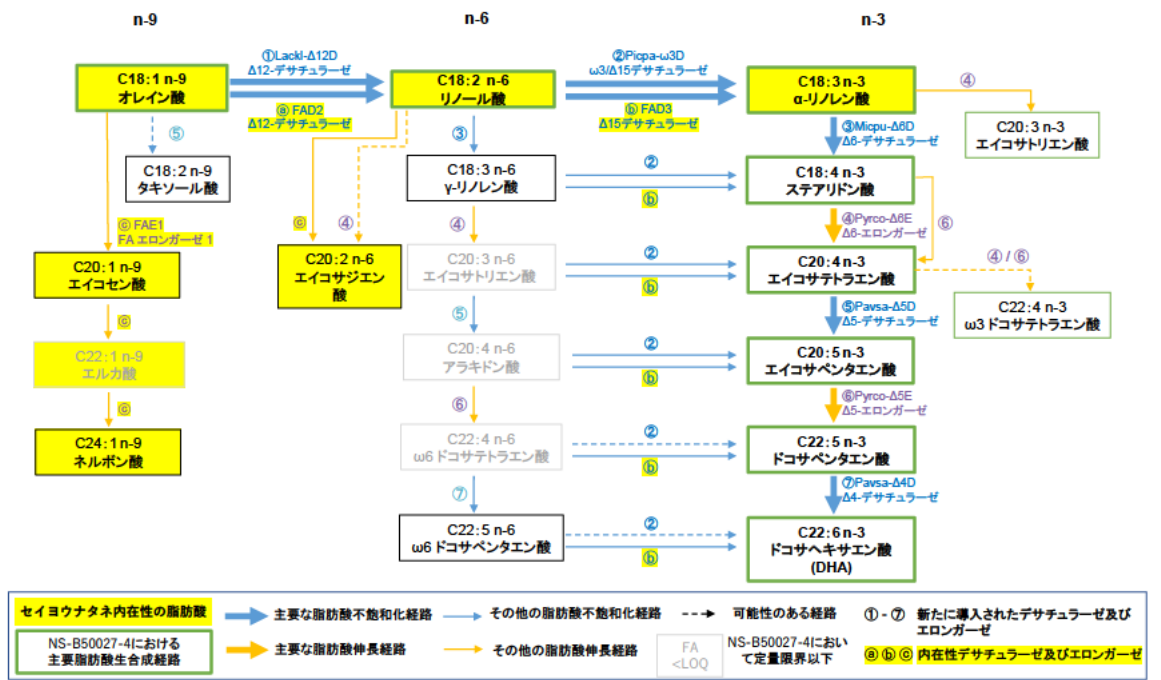


図 キャノーラ NS-B50027-4 における主要な脂肪酸合成経路

b. *pat* 遺伝子

pat 遺伝子がコードする PAT タンパク質は、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し、除草活性のない N-アセチル-L-グルホシネートを生成する。その結果、キャノーラ NS-B50027-4 は、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することが可能となる。

② 発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性

5 種類のデサチュラーゼ、2 種類のエロンガーゼ及び PAT タンパク質について、既知の毒性タンパク質と機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか確認するため、タンパク質データベース^fを用いて E-value 10^{-4} 以下を指標として BLASTP 検索を行った。その結果、PAT タンパク質が複数の種由来のアセチルトランスフェラーゼタンパク質と相同性を示した (参照 37)。しかしながら、当該アセチルトランスフェラーゼタンパク質は、細菌に一般的にみられるトキシン-アンチトキシンシステムとして働くものであり、細菌の細胞中で産生されたときにのみ毒性を示すことが知られている (参照 38)。

(2) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子のうち、抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB のベクターバックボーンにはカナマイシン耐性及びネオマイシン耐性を付与する *nptIII* 遺伝子が含まれているが、ベクターバックボーンはキャノーラ NS-B50027-4 中に導入されていない (参照 16)。

(3) 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

① プロモーターに関する事項

Lack1-Δ12d 遺伝子及び *Picpa-ω3d* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、アマ (*Linum usitatissimum*) 由来の *conlinin 1* 遺伝子 (*cnl1*) のプロモーター領域で種子特異的発現を誘導する (参照 39)。

Micpu-Δ6d 遺伝子及び *Pavsa-Δ4d* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、*L. usitatissimum* 由来の *conlinin 2* 遺伝子 (*cnl2*) のプロモーター領域で種子特異的発現を誘導する (参照 39)。

Pyrco-Δ6e 遺伝子及び *Pyrco-Δ5e* 遺伝子発現カセットのプロモーターは、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 由来の *fatty acid elongase 1* 遺伝子 (*FAE1*) のプロモーター領域で種子特異的発現を誘導する (参照 40)。

Pavsa-Δ5d 遺伝子発現カセットのプロモーターは、セイヨウナタネ (*B. napus*) 由来の *napin* 遺伝子のプロモーター領域で、種子特異的発現を誘導

^f UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されているタンパク質から、“toxin”及び“toxic”のキーワードを用いて抽出されたデータベース (検索日：2024 年 10 月)

する（参照 41）。

pat 遺伝子発現カセットのプロモーターは、カリフラワーモザイクウイルス由来の *35S RNA* 遺伝子のプロモーターのエンハンサー領域を二重に持つプロモーターであり、恒常的な発現を誘導する（参照 15、42）。

② ターミネーターに関する事項

Lack1-Δ12d 遺伝子及び *Picpa-ω3d* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*L. usitatissimum* の *conlinin 1* 遺伝子 (*cnl1*) のターミネーターである（参照 39）。

Micpu-Δ6d 遺伝子及び *Pavsa-Δ4d* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*L. usitatissimum* の *conlinin 2* 遺伝子 (*cnl2*) のターミネーターである（参照 39）。

Pyrco-Δ6e 遺伝子及び *Pyrco-Δ5e* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ダイズ (*Glycine max*) のレクチンをコードする *Lel* 遺伝子のターミネーターである（参照 43、44）。

Pavsa-Δ5d 遺伝子及び *pat* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、*Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) Ti 由来のノパリン合成酵素遺伝子のターミネーターである（参照 45）。

③ その他

デサチュラーゼ及びエロンガーゼ遺伝子発現カセットには、転写を高める目的でタバコモザイクウイルス由来の 5' 末端非翻訳領域（参照 46）が導入されている。

また、導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB には、転写を高める目的で、タバコ (*Nicotiana tabacum*) 由来の Rb7 マトリックス結合領域（参照 47、48）が組み込まれている。

5. そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項

既存品種の細胞に導入してもゲノムに導入されない遺伝子は用いられていない。

6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項

(1) 挿入 DNA のクローニング又は合成方法に関する事項

DHA 等の生合成に関わる 7 種類の遺伝子は、表 1 に示した供与体よりクローニングされた遺伝子情報に基づき、セイヨウナタネで発現させるためにコドン最適化し合成した。コドンの改変によるアミノ酸配列の変化はない。

pat 遺伝子は、野生型 *pat* 遺伝子配列をセイヨウナタネで発現させるためにコドン最適化し合成した。コドンの改変によるアミノ酸配列の変化はない（参照 49）。

(2) ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB は、プラスミド pJP3416 より構成されたベクターバックボーンと脂肪酸生合成に関わる 7 種類の遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセットを含む挿入 DNA 領域 (T-DNA 領域) より作製された。導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB の T-DNA 領域の構成要素、由来及び機能は表 2 のとおりである。

表 2 導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB の構成要素、由来及び機能 (一部省略)

構成要素	機能	由来
T-DNA 領域		
T-DNA right border	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む	<i>R. radiobacter</i>
<i>Micpu-Δ6D</i> 遺伝子発現カセット		
TER_ <i>Linus-Cnl2</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin2</i> 遺伝子
<i>Micpu-Δ6D</i>	Δ6-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列	<i>M. pusilla</i>
Tobacco mosaic virus (TMV) 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
PRO_ <i>Linus-Cnl2</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin2</i> 遺伝子
<i>Pyrco-Δ5E</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_ <i>Arath-FAE1</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>fatty acid elongase1</i> 遺伝子
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
<i>Pyrco-Δ5E</i>	Δ5-脂肪酸伸長酵素遺伝子のコード配列	<i>P. cordata</i>
TER_ <i>Glyma-Lectin</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>G. max</i> 由来のレクチンをコードする <i>Le1</i> 遺伝子
<i>Pavsa-Δ5D</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_ <i>Brana-FP1</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>B. napus</i> 由来の <i>napin</i> 遺伝子
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
<i>Pavsa-Δ5D</i>	Δ5-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列	<i>P. salina</i>
TER_ <i>Agrtu-NOS</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>R. radiobacter</i> Ti 由来のノパリン合成酵素遺伝子

構成要素	機能	由来
転写を高める発現制御領域		
MAR_ <i>Nicta-RB7</i>	Rb7 マトリックス結合領域	<i>N. tabacum</i>
<i>Picpa-ω3D</i> 遺伝子発現カセット		
TER_ <i>Linus-Cnl1</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin1</i> 遺伝子
<i>Picpa-ω3D</i>	Δ 15- ω 3-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列	<i>P. pastoris</i>
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
PRO_ <i>Linus-Cnl1</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin1</i> 遺伝子
<i>Pavsa-Δ4D</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_ <i>Linus-Cnl2</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin2</i> 遺伝子
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
<i>Pavsa-Δ4D</i>	Δ 4-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列	<i>P. salina</i>
TER_ <i>Linus-Cnl2</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin2</i> 遺伝子
<i>Lackl-Δ12D</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_ <i>Linus-Cnl1</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin1</i> 遺伝子
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
<i>Lackl-Δ12D</i>	Δ 12-脂肪酸不飽和化酵素遺伝子のコード配列	<i>L. kluveri</i>
TER_ <i>Linus-Cnl1</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin1</i> 遺伝子
転写を高める発現制御領域		
MAR_ <i>Nicta-RB7</i>	Rb7 マトリックス結合領域	<i>N. tabacum</i>
<i>Pyrco-Δ6E</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_ <i>Arath-FAE1</i>	プロモーター：種子特異的に転写を誘導する	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>fatty acid elongase 1</i> 遺伝子
TMV 5' UTR leader	エンハンサー：翻訳を高める	タバコモザイクウイルス
<i>Pyrco-Δ6E</i>	Δ 6-脂肪酸伸長酵素遺伝子のコード配列	<i>P. cordata</i>

構成要素	機能	由来
TER_ <i>Glyma-Lectin</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>G. max</i> 由来の レクチンをコードする <i>Le1</i> 遺伝子
<i>pat</i> 遺伝子発現カセット		
PRO_35S×2	プロモーター：転写を開始する	カリフラワーモザイクウイルス 由来の 35S RNA 遺伝子 エンハンサー領域を二重に持つ
<i>pat</i>	ホスフィノスリシン <i>N</i> -アセチル基転移 酵素遺伝子	<i>S. viridochromogenes</i>
TER_ <i>Agrtu-NOS</i>	ターミネーター：転写を終結する	<i>R. radiobacter</i> Ti 由来の ノパリン合成酵素遺伝子
T-DNA left border	T-DNA を伝達する際に利用される左側 境界配列を含む	<i>A. tumefaciens</i>

7. 構築されたコンストラクトに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列並びに制限酵素による切断地図に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 16）。

(2) 既存品種に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域がコンストラクト上で明らかであること

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB 上の意図する挿入領域は、T-DNA 領域の右側領域から左側領域までである。

(3) 導入しようとするコンストラクトは、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されていること

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB は、目的外の遺伝子の混入はないことがシーケンス解析により確認されている。なお、導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB には、T-DNA 領域以外のベクターバックボーンとして、*nptIII* 遺伝子、大腸菌における RK2 プラスミド由来の複製開始領域及び ColE1 プラスミド由来の複製開始領域を含む。

第4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) 遺伝子の既存品種への導入方法に関する事項

導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB を用いて、既存品種の子葉を外植片としてアグロバクテリウム法による形質転換を行った。

(2) 遺伝子組換え栽培系統に関する事項（系統の考え方に基づいた記述、育成図）

L-グルホシネートを含む培地で選抜を行い、グルホシネート耐性カルスから

再生個体を得た。得られた再生個体を自殖し、ホモ系統を確認後、DHA 等の長鎖多価不飽和脂肪酸産生性等の分析に基づいてキャノーラ NS-B50027-4 を選抜した。

(3) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 のゲノムに挿入された T-DNA のコピー数及びベクターバックボーンの有無を確認するため、キャノーラ NS-B50027-4 の T3 世代 (平均冗長度約 7.3)、T6 世代 (平均冗長度約 30) 及び T8 世代 (平均冗長度約 38) の葉から抽出したゲノム DNA を試料として次世代シーケンサーを用いたシーケンス解析を行った (参照 16)。

その結果、ゲノムに 2 つの挿入 DNA 領域の存在が確認され、A02 染色体及び A05 染色体上で、T-DNA の全長あるいはその一部が挿入されていることが確認された。

また、ベクターバックボーンと相同性のある配列は認められず、キャノーラ NS-B50027-4 にベクターバックボーンは導入されていないことが確認された (参照 16)。

① A02 染色体における導入遺伝子の構成 (T6 世代)

A02 染色体における導入遺伝子の構成を調べたところ、キャノーラ NS-B50027-4 の A02 染色体のゲノム配列を含むコンティグ (シーケンシングで得られたリードをアセンブリした配列) は、47 個のリードから構築され、導入遺伝子 5' 末端側の既存品種内在性配列、導入遺伝子配列、導入遺伝子 3' 末端側の既存品種内在性配列を含む合計 50,782bp の長さを持つ配列であった (参照 16)。このコンティグを解析した結果、キャノーラ NS-B50027-4 の A02 染色体に挿入された導入遺伝子配列は、*Micpu-Δ 6d*、*Pyrco-Δ 5e*、*Pavsa-Δ 5d* 及び *Picpa-ω 3d* の 4 つの遺伝子発現カセット並びに *Pavsa-Δ 4D* 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 (参照 16)。

A02 染色体における導入遺伝子の近傍配列を調べたところ、T-DNA 領域の導入により、機能未知の HPP (HyPothetical Protein) をコードする遺伝子の 3' 末端非翻訳領域にある 15 bp が欠失していることが確認された。T-DNA 領域は、HPP をコードする遺伝子の 3' 末端非翻訳領域に挿入されていることから、この HPP 遺伝子の機能が T-DNA の導入によって影響を受ける可能性は低いと考えられた。

② A05 染色体における導入遺伝子の構成 (T6 世代)

A05 染色体における導入遺伝子の構成を調べたところ、キャノーラ NS-B50027-4 の A05 染色体のゲノム配列を含むコンティグは、111 個のリードから構築され、導入遺伝子 5' 末端側の既存品種内在性配列、導入遺伝子配列、導入遺伝子 3' 末端側の既存品種内在性配列を含む合計 99,301 bp の長

さを持つ配列であった（参照 16）。このコンティグを解析した結果、キャノーラ NS-B50027-4 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。なお、この中のいくつかの遺伝子断片は部分配列であり、正常なタンパク質は発現しないと考えられる。

A05 染色体における導入遺伝子の近傍配列を調べたところ、T-DNA の導入により、Pto-Interacting (PTI) 遺伝子のエクソン 3 の 20 bp の配列が欠失していることが確認された。この PTI 遺伝子がコードする PTI タンパク質は、過敏感反応媒介シグナル伝達系に関与するセリン-スレオニンキナーゼであるが、セイヨウナタネにおける PTI タンパク質の機能は報告されていない。セイヨウナタネには、本 PTI 遺伝子の推定アミノ酸配列と 80%以上の相同性を有するタンパク質が少なくとも 10 個存在し、また、育成の過程において農業形質に非意図的な変化は認められなかったことから、T-DNA の導入によって影響を受ける可能性は低いと考えられた。

(4) 遺伝子組換え栽培系統における導入遺伝子の安定性に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 に挿入された遺伝子の後代における安定性を確認するために、複数世代のキャノーラ NS-B50027-4 の葉から抽出したゲノム DNA を用いて次世代シーケンシング解析（参照 16）を行った。その結果、キャノーラ NS-B50027-4 の T3 及び T8 世代を対象とした解析においても T6 世代を対象とした解析結果と同様の結果が得られていることから、導入遺伝子が世代間で安定していることが確認された（参照 16）。

(5) ORF の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 には、A02 染色体に T-DNA 領域の断片が、A05 染色体には完全な T-DNA 領域と T-DNA 領域の断片の両方を含む形の配列が導入されている。そのため、キャノーラ NS-B50027-4 の A02 染色体における導入遺伝子の 5' 及び 3' 末端側近傍配列の両境界、A05 染色体における 5' 及び 3' 末端側近傍配列の両境界及び挿入断片の境界の計 10 カ所の境界領域が存在する。

これらの 10 カ所の境界領域において、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と相同性のある新規オープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）が形成されていないことを確認するため、6 つの読み枠において、終止コドンから終止コドンで終結する 10 アミノ酸以上の ORF を検索した。その結果、合計 50 個の ORF が確認された（参照 50）。

確認された ORF について、アレルゲンデータベース^gを用いて E-value 10^{-5} 以下を指標とした FASTA アルゴリズムにより相同性検索を行った。その結果、アレルゲンデータベース中の配列と 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性及び

^g COMPARE 2023（検索日：2023 年 9 月）

連続する 8 アミノ酸の一致を示す配列は検出されなかった。

また、当該 ORF について、タンパク質データベース^hを用いて E-value 10^{-5} 以下を指標として BLASTP 検索を行った。その結果、既知の毒性タンパク質と相同性を示す配列は検出されなかった（参照 50）。

さらに、キャノーラ NS-B50027-4 の挿入 DNA 領域において、目的外の ORF から新規タンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン及び毒性タンパク質と構造相同性を有するかどうか確認するため、アレルゲンデータベース^g及びタンパク質データベース^hを用いて、上記と同様に相同性検索を行った。その結果、アレルゲンデータベース中の配列と 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す配列は検出されなかった。また、アレルゲンデータベース中の特定の連続する 8 アミノ酸配列 (KERERERE) と一致する配列を有する ORF が 5 個検出された。しかしながら、検出された ORF は、導入遺伝子のターミネーターの配列中に存在し、発現させるためのプロモーターはなく、また、導入遺伝子を発現させる読み枠とは異なることから、翻訳される可能性は低いと考えられた。また、タンパク質データベース^h中の複数種由来のアセチルトランスフェラーゼタンパク質と相同性を示す ORF が 2 個検出された（参照 50）。しかしながら、当該アセチルトランスフェラーゼタンパク質は、細菌に一般的にみられるトキシン-アンチトキシンシステムとして働くものであり、細菌の細胞中で産生されたときにのみ毒性を示すことが知られている（参照 38）。

2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 (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タンパク質の発現量を LC-MRM-MS (Liquid Chromatography-Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry) 法を用いて解析した。試験には豪州の 3 ヲ所のは場から採取したキャノーラ NS-B50027-4 の地上部、花、根、未熟種子及び成熟種子を供試した。結果は表 3 に記載のとおりである（参照 51）。7 種類のデサチュラーゼ及び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一方で、各生育段階における種子以外の組織（5 葉期の植物体、第 3 節伸長期の植物体、50%開花期の花及び根）では不検出であった。PAT タンパク質は、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。

結果は、表 3 及び表 4 に記載のとおりである（参照 51）。

^h UniProtKB/Swiss-Prot (<https://www.uniprot.org/>) に登録されているタンパク質から、“toxin”及び“toxic”のキーワードを用いて抽出されたデータベース（検索日：2023 年 9 月）

表3 豪州の3地点で栽培したキャノーラ NS-B50027-4 における導入した各タンパク質の発現量

発現 タンパク質	成熟種子 (ng/mg 総タンパク質*)			未熟種子 (ng/mg 総タンパク質*)		
	栽培地1	栽培地2	栽培地3	栽培地1	栽培地2	栽培地3
Lack1-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	<LOQ	<LOQ	<LOQ	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

*タンパク質の発現量は総タンパク質 1mg 当たりの ng で表されている。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されている（栽培地3の未熟種子はn=2、それ以外はn=3）

<LOQ: 定量限界未満

表4 キャノーラ NS-B50027-4 における PAT タンパク質の発現量

生育段階	5葉期	第3節伸長期	50%開花期		
組織	全植物体	全植物体	根	花	その他の植物組織
キャノーラ NS-B50027-4	46 ± 15	107 ± 66	173 ± 33	310 ± 180	130 ± 92
対照の非組換え セイヨウナタネ	ND	ND	ND	ND	ND

*タンパク質の発現量は総タンパク質 1mg 当たりの ng で表されている。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されている（n=3）

ND: 不検出

3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 の可食部位は主として種子であり、油糧用として種子から搾油・精製された油中の遺伝子産物（タンパク質）を含む総タンパク質含有量は検出限界（0.07%）未満であった（参照 52）。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合にはその遺伝子産物についても評価すること。）

- (1) 導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかであること

キャノーラ NS-B50027-4 に導入された 8 つの遺伝子の供与体である *L. kluyveri*、*M. pusilla*、*P. salina*、*P. pastoris*、*P. cordata*、*S. viridochromogenes* について文献検索^oを行った結果、全ての供与体について、アレルギー誘発性の報告はなかった。

- (2) 遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること

Lackl-Δ12d、*Picpa-ω3d*、*Micpu-Δ6d*、*Pyrco-Δ6e*、*Pavsa-Δ5d*、*Pyrco-Δ5e*、*Pavsa-Δ4d*、*pat* のそれぞれの遺伝子産物に関して、アレルギー誘発性を有するとの報告はなかった。

- (3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

キャノーラ NS-B50027-4 において発現する 5 種類のデサチュラーゼ及び 2 種類のエロンガーゼの物理化学的処理に対する感受性を調べるために、人工胃液による酸処理及び酵素（ペプシン）処理試験、加熱処理試験を実施した。なお、試験に供したデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、異種発現系において発現させたタグ等を結合させたタンパク質を用いた。

a. 人工胃液に対する感受性

キャノーラ NS-B50027-4 において発現するデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、その大部分が膜貫通タンパク質で、単離・精製が困難かつ種子中での発現量は非常に低いため、これらのタンパク質の人工胃液による消化性を評価する分析法として、下記（a）から（c）までの試験を実施した。

- (a) 質量分析に基づく LC-MRM-MS 法による定量（全てのデサチュラーゼ及びエロンガーゼを対象）

LC-MRM-MS 法による分析は 2 段階で行った。1 段階目は、各タンパク質について、ペプシン処理後の各時間において、タンパク質から生じることをあらかじめ明らかにしてあった 10 kDa 未満のペプシン標的ペプチドの存在量を質量分析計で分析することにより、ペプシンによる分解の経時変化を調べた。2 段階目は、1 段階目のペプシン処理後に 10 kDa フィルター上に残った未分解のタンパク質について、還元、アルキル化、

変性を行った後、トリプシン消化を行い、タンパク質から生じることをあらかじめ明らかにしてあったトリプシン標的ペプチドの量を分析した。これにより、ペプシンにより分解されなかった各タンパク質の量の経時変化を調べた。

ペプシン及びトリプシンに対する感受性を持つ対照タンパク質として BSA (Bovine Serum Albumin;ウシ血清アルブミン) を用いた (参照 53)。LC-MRM-MS 法による検出限界は 2.44~7.52 ng/mg であった。LC-MRM-MS 法における標的ペプチドのサイズは 3 kDa 未満であり、ペプシン又はトリプシン処理により生成される 3kDa 未満断片を検出していると考えられる (参照 53)。

トリプシン標的ペプチドの消失を指標とした分析の結果、試験開始 60 分後の平均消化率について、デサチュラーゼは 90%程度であり、エロンガーゼは 50%程度であった。

(b) SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析 (Picpa- ω 3D 及び Pyrco- Δ 6E を対象)

Picpa- ω 3D について、SDS-PAGE (CBB 染色) 分析においては、試験開始 3 秒後に完全長のバンドの 97.5%が消失したが、複数の低分子断片のバンドが試験開始 60 分後まで認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始 1 分後に完全長のバンドが消失し、低分子断片のバンドが試験開始 2 分後には消失した (参照 53)。

Pyrco- Δ 6E について、SDS-PAGE (CBB 染色) 分析においては、試験開始 30 秒後に完全長のバンドの 95%が消失したが、複数の低分子断片のバンドが試験開始 60 分後まで認められた。また、ウェスタンブロット分析では、試験開始 1 分後に完全長のバンドは消失した。(参照 53)。

(c) 追加の SDS-PAGE 分析 (Micpu- Δ 6D 以外のデサチュラーゼ及びエロンガーゼを対象)

完全長の各タンパク質のバンドは試験開始 5 分後に消失した。

各タンパク質の感受性に関する結果の要約を表 5 に示す。

表5 キャノーラ NS-B50027-4 における各タンパク質のペプシン処理に対する感受性

分析手法	LC-MRM-MS (a) (人工胃液処理 60 分後の平均消化率)	SDS-PAGE 分析 (b)	ウェスタンブ ロット分析(b)	SDS-PAGE 分析 (c)
Lackl- Δ12D	>92% (n=10)	-**	-**	5分後に完全長の タンパク質が消失
Picpa- ω3D	>97% (n=9)	0.05分後に完全長 のタンパク質の 97.5%が消失	1分後に完全 長のタンパク 質が消失***	5分後に完全長の タンパク質が消失
Micpu- Δ6D	約90% (n=10)	-**	-**	-*
Pyrc- Δ6E	>50% (n=4)	0.5分後に完全長 のタンパク質の95% が消失	1分後に完全 長のタンパク 質が消失****	5分後に完全長の タンパク質が消失
Pavsa- Δ5D	>95% (n=10)	-**	-**	5分後に完全長の タンパク質が消失
Pyrc- Δ5E	>50% (n=1)	-**	-**	5分後に完全長の タンパク質が消失
Pavsa- Δ4D	約90% (n=10)	-**	-**	5分後に完全長の タンパク質が消失

“n”はLC-MRM-MS法において定量したトリプシン標的ペプチドの数を示す。

*十分な量のタンパク質が得られなかったため、分析を行うことができなかった。

**SDS-PAGE分析を実施するために十分な量及び純度のタンパク質が得られず、また、ウェスタンブロット分析に必要な抗体を作製できなかったため、分析を行うことができなかった。

*** Picpa-ω3D (F7) 抗体を用いた。

**** HRPで標識したHis(ヒスチジン)タグに対する抗体を用いた。

b. 人工腸液に対する感受性

人工腸液試験については実施されていない。

c. 加熱処理に対する感受性

消化性試験に用いた各タンパク質を用いて、加熱処理後のサンプルを遠心分離により凝集タンパク質を除去後、SDS-PAGE (CBB染色) 分析及びウェスタンブロット分析を行い、バンドのシグナル強度を定量した(参照55)。その結果、95℃、30分間処理後の残存タンパク質量はLackl-Δ12Dでは36%、それ以外のタンパク質では15%以下であった。これは、95℃の加熱処理により変性して凝集を生じ、凝集が除去されるとタンパク質量が減じるためと考えられた。また、免疫反応性が低下することが示された。

② PAT タンパク質

キャノーラ NS-B50027-4 において発現する PAT タンパク質では、物理化学的処理に対する感受性評価試験に使用できる十分量を精製できない。このため、キャノーラ NS-B50027-4 の作出に用いられたものと同じの導入用プラスミド pJP3416_GA7-ModB を用いて形質転換を行ったタバコ (*Nicotiana benthamiana*) において発現させた PAT タンパク質を供試した(参照56)。

a. 人工胃液及び人工腸液に対する感受性

調製した PAT タンパク質について、37°Cで 0.5、2、5、10、20、30 及び 60 分間のペプシン処理を行い、SDS-PAGE (CBB 染色) 分析及びウェスタンブロット分析 (PAT タンパク質ポリクローナル抗体) を行った (参照 56)。SDS-PAGE 分析の結果、分解産物とみられる約 15 kDa のバンド及びペプシンに由来すると考えられる約 35 kDa のバンド (参照 57) が確認された。ウェスタンブロット分析の結果、完全長の PAT タンパク質は試験開始 0.5 分以内に消化されることが確認された。

また、調製した PAT タンパク質について、37°Cで 0.5、2、5、10、20、30 及び 60 分間のトリプシン処理を行い、SDS-PAGE (CBB 染色) 分析及びウェスタンブロット分析 (PAT タンパク質ポリクローナル抗体) を行った (参照 56)。SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析の結果、完全長の PAT タンパク質のバンド強度は試験開始 60 分後には減少するものの、薄いバンドが確認された。

b. 加熱処理に対する感受性

PAT タンパク質の加熱処理感受性を評価するため、調製した PAT タンパク質を、60°C、75°C及び 90°Cの各温度で、10 分、30 分及び 60 分間加熱処理し、ウェスタンブロット分析により評価した (参照 56)。なお、0°Cで 60 分間静置した PAT タンパク質を対照として用いた。

その結果、PAT タンパク質は 90°C、30 分間の処理においても対照区と同等のシグナル強度が認められた。PAT タンパク質は 90°C、60 分処理においても分解されないことが報告されている (参照 57)。また、55°C、10 分間の処理において完全に活性を失うものの (参照 58)、分解されないことが報告されており (参照 57)、本試験で得られた結果は、これらの報告と一致するものだった。

(4) 遺伝子産物 (タンパク質) と既知のアレルゲン (グルテン過敏性腸疾患に関与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。) との構造相同性に関する事項

5 種のデサチュラーゼ、2 種のエロンガーゼ及び PAT タンパク質と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースⁱを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列と 35% 以上のアミノ酸相同性を示す配列は検出されず、連続する 8 アミノ酸との一致も認められなかった (参照 26)。

上記 (1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的にアレルギー誘発性を判断した。また、キャノーラ NS-B50027-4 については、導入された 8 遺伝子がコードするタ

ⁱ Allergen Online version 21 (検索日: 2023 年 11 月)

ンパク質のうち、7種類のデサチュラーゼ及びエロンガーゼに関する人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理の情報が不足しており、遺伝子産物(タンパク質)のアレルギー誘発性を判断することができなかった。一方でキャノーラ NS-B50027-4 の種子から搾油・精製された油については、一般的なキャノーラ油と同様、機械的及び化学的に抽出された粗油を脱ガム処理し、アルカリ精製法又はフィジカル精製法(蒸留脱酸法)による精製等を行うことにより、タンパク質等の不純物が除去されている(参照 1、5)。また、キャノーラ NS-B50027-4 の種子から搾油・精製された油中の7種類のデサチュラーゼ及びエロンガーゼを含む総タンパク質含有量は、検出限界(0.07%)未満であった(参照 52)。

「遺伝子組換え食品(種子植物)に関する食品健康影響評価指針」(平成16年1月29日食品安全委員会決定。以下「評価指針」という。)第1章第4の2及び4に基づき、食品として利用される形態を考慮した結果、WOE(weight of evidence)に基づく階層的なアプローチを適用し、製造方法や油中のタンパク質含有量等を含め、現在提出されている情報から、キャノーラ NS-B50027-4 の種子から搾油・精製された油については、アレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項(既存品種及び既存品種に近縁な種に含まれる基質と反応する可能性に関する事項を含む。)

(1) デサチュラーゼ及びエロンガーゼ

キャノーラ NS-B50027-4 では、導入遺伝子から発現する5種類のデサチュラーゼ(Lackl- 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。

第3の4(1)①に記載のとおり、キャノーラ NS-B50027-4 では、①Lackl- Δ 12Dの働きによりリノール酸(C18:2 n-6)が生成されるものの、②Picpa- ω 3D又は③Micpu- Δ 6Dの働きにより α -リノレン酸(C18:3 n-3)又は γ -リノレン酸(C18:3 n-6)へと変換されることが確認された。

長鎖多価不飽和脂肪酸の生合成にはn-6系脂肪酸を経由する経路とn-3系脂肪酸を経由する経路が存在する。キャノーラ NS-B50027-4 では、主にn-3系長鎖脂肪酸(ステアリドン酸(C18:4 n-3)、ETA(C20:4 n-3)、EPA(C20:5 n-3)、DPA(C22:5 n-3)及びDHA(C22:6 n-3))において増加が認められ、n-6系長鎖脂肪酸(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DTA(C22:4 n-6))は定量限界未満であった。したがって、キャノーラ NS-B50027-4 では、n-3系脂肪酸を経由し、DHA(C22:6 n-3)が産生する経路が優位に働いていると考えられた。

よって、キャノーラ NS-B50027-4 において、上述した脂肪酸組成の変化以外に既存品種の代謝系が変化する可能性は低いと考えられる。

(2) PAT タンパク質

PAT タンパク質は、L-グルホシネートをアセチル化し、*N*-アセチル-L-グルホシネートに変換することによって、植物に対して毒性のない物質へと代謝させる酵素である。その反応はL-グルホシネートに特異的で、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に対する阻害は認められなかった。よって、キャノーラ NS-B50027-4において、PAT タンパク質が内在性化合物を代謝して、既存品種の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

したがって、キャノーラ NS-B50027-4 に導入された DHA 産生に関与する 7 遺伝子がコードする酵素及び PAT タンパク質が、意図した脂肪酸組成の変化以外に既存品種の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項

(1) 既存品種との差異に関する事項

豪州のほ場で栽培されたキャノーラ NS-B50027-4、既存品種である非組換えセイヨウナタネ AV Jade 及び比較対象品種 7 種類（商業品種）の種子を用いて、一般成分、無機物、脂肪酸、ビタミン類、アミノ酸組成、グルコシノレート、フィトステロール、及びその他の化合物の分析を行った。キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種の間における違いについて統計学的解析を行った（参照 60）。

① 一般成分

粗タンパク質、粗脂質、灰分、炭水化物、粗繊維、中性デタージェント繊維及び酸性デタージェント繊維の分析を行った。その結果、粗脂質、炭水化物及び灰分においてキャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった（参照 9）。

② 無機物

無機物 10 項目の分析を行った。その結果、カルシウム、カリウム、鉄及び亜鉛においてキャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった（参照 9）。

③ 脂肪酸

a. 種子中の脂肪酸含量

キャノーラ NS-B50027-4 には、10 種類の脂肪酸が新規に産生されていた。

脂肪酸 50 項目の分析に際し、25 項目^kの脂肪酸については、分析サンプルの 33%以上が定量限界未満のため、統計解析から除外した。

分析の結果、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミトレイン酸 (C16:1 n-7)、ステアリン酸 (C18:0) 及びリグノセリン酸 (C24:0) において、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差は認められなかった。

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) においては、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたものの、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった (参照 9)。

既存品種と比較して、オレイン酸 (C18:1 n-9)、C18:1 総量、リノール酸 (C18:2 n-6) 及び C18:2 総量が有意に減少し、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3)、C18:3 総量及び DHA (C22:6 n-3) が有意に増加した。

また、トランス脂肪酸の平均値は既存品種より高く、トランス脂肪酸 (C18:3) 及び総トランス脂肪酸の含量において統計学的有意差が認められた。

b. 摂取量に基づくキャノーラ NS-B50027-4 に含まれる脂肪酸の安全性

新規に産生されていた 10 種類の脂肪酸^jは、魚類及び海産物などの食経験のある食品に含まれており、その脂肪酸の割合も既存の食品を超えるものではない。

リノール酸 (C18:2 n-6) は、日本人が摂取する必須脂肪酸である n-6 系多価不飽和脂肪酸の 98%を占めている。従来のセイヨウナタネ由来の油がキャノーラ NS-B50027-4 由来の油に置き換わったと仮定して、日本人に

^j タキソール酸 (C18:2 n-9)、 γ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、ステアリドン酸 (C18:4 n-3)、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-3)、ETA (C20:4 n-3)、EPA (C20:5 n-3)、ドコサテトラエン酸 (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 DHA (C22:6 n-3)

^k C16:1 トランス、C16:3 n-3、トランスエライジン酸 (C18:1)、C18:2 n-9、トランスリノールエライジン酸 (C18:2)、 γ -リノレン酸 (C18:3 n-6)、ステアリドン酸 (C18:4 n-3)、C18 総量、C20:2 n-9、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-3)、エイコサトリエン酸 (C20:3 n-6)、C20:3 n-9、C20:3 総量、ETA (C20:4 n-3)、アラキドン酸 (C20:4 n-6)、C20:4 総量、EPA (C20:5 n-3)、エルカ酸 (C22:1 n-9)、C22:1 総量、ドコサジエン酸 (C22:2 n-6)、 ω 3 ドコサテトラエン酸 (C22:4 n-3)、DTA (C22:4 n-6)、DPA (C22:5 n-3)、 ω 6 ドコサペンタエン酸 (C22:5 n-6)、C22:5 総量

^l 植物油 (アマニ油)、魚油 (カタクチイワシ油、サケ油、タラ肝油、マグロ油、メンハーデン油)、藻類油 (*Schizochytrium sp.* (微細藻類) 油)、魚介類 (アオガニ身、アトランティックサーモン、ギルヘッド、コイの卵、スズキ、ナマズ、ムール貝)、動物組織、母乳

における n-6 系多価不飽和脂肪酸の摂取量^mから算出したリノール酸の摂取量推計は、日本人の食事摂取基準ⁿにおいて欠乏症が消失するとされている量を上回っていた。また、オレイン酸は、必須脂肪酸ではない。以上のことから、リノール酸及びオレイン酸の含有量の減少がヒトの健康に影響をおよぼすとは考えにくい。

キャノーラ NS-B50027-4 に由来する α -リノレン酸 (C18:3 n-3) の摂取量推計は、従来食品から摂取する α -リノレン酸 (C18:3 n-3) の摂取量と合計しても、アメリカ食品医薬品局 (FDA: Food and Drug Administration) においてヒトの健康に懸念がないことが報告されている摂取量を下回っている。キャノーラ NS-B50027-4 に由来する DHA (C22:6 n-3) 及び EPA (C20:5 n-3) の摂取量推計は、従来食品から摂取する DHA 及び EPA の摂取量と合計しても、FDA 及び欧州食品安全機関 (EFSA: European Food Safety Authority) において安全性上懸念がないと判断されている量を下回っており、また、豪州・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ: Food Standards Australia New Zealand) が摂取において影響はないとしている DHA の量を下回っている。さらに、EPA (C20:5 n-3) 及び γ -リノレン酸 (C18:3 n-6) の分析結果は供試サンプルの 33%以上が定量限界未満であった。以上のことから、 α -リノレン酸 (C18:3 n-3)、C18:3 総量及び DHA (C22:6 n-3) の含有量の増加がヒトの健康に影響をおよぼすとは考えにくい。

キャノーラ NS-B50027-4 に由来するトランス脂肪酸の平均値は、既存品種よりも高かったが、FAO/WHO の勧告基準である総エネルギー摂取量の 1%未満であると推定された (参照 61)。

④ ビタミン

ビタミン 14 項目の分析を行った。その結果、 α -トコフェロール、 β -トコフェロール、総トコフェロール、ビオチン、ナイアシン、パントテン酸、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、コリン及びビタミン K₁ において、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった (参照 9)。

⑤ アミノ酸

アミノ酸 18 項目の分析を行った。その結果、アラニン、アスパラギン酸、グリシン、リジン、メチオニン、プロリン、スレオニン及びチロシンにおい

^m 令和元年国民健康・栄養調査報告 (厚生労働省 令和 2 年 12 月) 第 1 部 栄養素等摂取状況調査 第 1 表の 1 (栄養素等摂取量-エネルギー・栄養素等, 年齢階級別, 平均値, 標準偏差, 中央値) 両性別全年齢の中央値

ⁿ 日本人の食事摂取基準 (2020 年版) 「日本人の食事摂取基準」策定検討会報告書 (厚生労働省 令和元年 12 月)

て、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった（参照 9）。

⑥ グルコシノレート

グルコシノレート 8 項目の分析を行った。その結果、グルコブラシシンにおいて、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は、商業品種の値及び文献値の範囲内であった（参照 9）。

⑦ フィトステロール類

フィトステロール類 10 項目の分析を行った。その結果、ブラシカステロール、カンペステロール、クレロステロール、 δ -5-アベナステロール、シトステロール、スチグマステロール、24-メチレンコレステロール、 δ -5-24-スチグマスタンジェノール及び総フィトステロールにおいて、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、 δ -5-アベナステロール及び総フィトステロールを除き、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は商業品種の値の範囲内であった。

δ -5-アベナステロールについては、 δ -5-アベナステロールが総フィトステロールに占める割合の最大値は、植物油の Codex 規格（CXS 210-1999）の範囲内であることが確認された。

また、総フィトステロールについては、植物油の Codex 規格（CXS 210-1999）における総フィトステロールの範囲内であることが確認された。

⑧ その他の化合物（有害生理活性物質等）

フェルラ酸等の化合物 5 項目の分析を行った。そのうち、2 項目については、分析サンプルの 33%以上が定量限界未満のため、統計解析から除外した。

その結果、シナピンにおいて、キャノーラ NS-B50027-4 と既存品種との間に統計学的有意差が認められたが、キャノーラ NS-B50027-4 の平均値は商業品種の値及び文献値の範囲内であった（参照 9）。

(2) 遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項

キャノーラ NS-B50027-4 は、評価指針の別添の 1 ③「導入された遺伝子によって、既存品種の代謝系における一部の代謝産物が利用され、既存品種が有していない新たな代謝産物を合成する形質が付与されるもの。」に分類される。

◦ 可溶性タンニン、*p*-クマル酸

7. 諸外国における認可、食用等に関する事項

豪州及びニュージーランドにおいては、食品として 2017 年 12 月、飼料として 2017 年 12 月（ニュージーランド）及び 2018 年 2 月（豪州）に承認された。

米国においては、2022 年 3 月に食品及び飼料としての安全性の確認がなされた。

カナダにおいては、食品（高度精製油）として 2020 年 7 月に安全性の確認がなされた。飼料として 2020 年 7 月に承認された。

中国において、食品及び飼料の安全性審査を申請中である。

第 5. 第 1 から第 4 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 1 から第 4 までの事項により、キャノーラ NS-B50027-4 の種子から搾油・精製された油については、安全性の知見が得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）」については、評価指針に基づき評価した結果、人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理の結果に関する情報が不十分であり、非組換えセイヨウナタネと比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因がないことを判断することができなかった。

一方で、キャノーラ NS-B50027-4 の種子から搾油・精製された油については、製造方法及び油中の総タンパク質含有量等の情報を踏まえ、評価指針第 1 章第 4 の 2 及び 4 に基づき、食品として利用される形態を考慮し、WOE (weight of evidence) に基づく階層的なアプローチを適用して評価した結果、非組換えセイヨウナタネの種子から搾油・精製された油と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「DHA 産生及び除草剤グルホシネート耐性キャノーラ（NS-B50027-4）」の種子から搾油・精製された油については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. OECD. ENV/JM/MONO(2011)55 Revised consensus document on compositional considerations for new varieties low erucic acid rapeseed (canola): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants, 2011
2. 松崎守夫, ナタネの安定多収栽培. 農業技術体系作物編, 2008; 7: 2-11
3. OECD. ENV/JM/MONO(2012)41 Consensus document on the biology of the Brassica crops (Brassica spp.), 2012
4. 加藤仁, 搾油法と搾油機械. 農業技術体系作物編, 2008; 7: 18-21
5. OECD. ENV/JM/MONO(2001)13 CONSENSUS DOCUMENT ON KEY NUTRIENTS AND KEY TOXICANTS IN LOW ERUCIC ACID RAPESEED (CANOLA), 2001
6. OGTR. The biology of Brassica napus L. (Canola) and Brassica juncea (L.) Czern. & Coss. (Indian mustard). Version 2.1. (Australian Government), 2017
7. OGTR. The biology of Brassica napus L. (canola). eds. H. Department of & O. o. t. G. T. R. Ageing. Canberra, ACT, Australia: Australian Government, 2008
8. 中井秀樹, アブラナ科 Cruciferae. 清水建美編) 日本の帰化植物.平凡社, 2003; 80-96
9. ILSI. ILSI Crop Composition Database Version 6.0 <https://www.cropcomposition.org/> (Accessed Mar 29), 2018
10. Alvarez M J, Estrada J L, Gozalo F, Fernandez-Rojo F and Barber D. Oilseed rape flour: another allergen causing occupational asthma among farmers. Allergy 2001; 56(2): 185-188
11. Suh C H, Park H S, Nahm D H and Kim H Y. Oilseed rape allergy presented as occupational asthma in the grain industry. Clin Exp Allergy 1998; 28(9): 1159-1163
12. Trinidad A, Kumar S, Haji M, Shakeel M and Leong P. The prevalence of oilseed rape hypersensitivity in a mixed cereal farming population. Clin Otolaryngol 2010; 35(1): 13-17
13. Poikonen S, Puumalainen T J, Kautiainen H, Burri P, Palosuo T, Reunala T, et al. Turnip rape and oilseed rape are new potential food allergens in children with atopic dermatitis. Allergy 2006; 61(1): 124-127
14. Poikonen S, Puumalainen T J, Kautiainen H, Palosuo T, Reunala T and Turjanmaa K. Sensitization to turnip rape and oilseed rape in children with atopic dermatitis: a case-control study. Pediatr Allergy Immunol 2008; 19(5): 408-411
15. Coutu C, Brandle J, Brown D, Brown K, Miki B, Simmonds J, Hegedus DD. pORE: a modular binary vector series suited for both monocot and dicot plant transformation. Transgenic Research 2007, 16: 771-781
16. SEQUENCE CHARACTERIZATION OF DHA CANOLA EVENT NS-B50027-4 (BNDHA-2022-013) (社内文書)

17. Spohner S C, Schaum V, Quitmann H and Czermak P. Kluyveromyces lactis: An emerging tool in biotechnology. *J Biotechnol* 2016; 222104-116
18. Wojtatowicz M, Chrzanowska J, Juszczak P, Skiba A and Gdula A. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int J Food Microbiol* 2001; 69(1-2): 135-140
19. Porter T J, Divol B and Setati M E. Lachancea yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res Int.* 2019b; 119378-389
20. Ahmad M, Hirz M, Pichler H and Schwab H. Protein expression in Pichia pastoris: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98(12): 5301-5317
21. Cregg J M, Cereghino J L, Shi J and Higgins D R. Recombinant protein expression in Pichia pastoris. *Mol Biotechnol* 2000; 16(1): 23-52
22. Knauer J and Southgate P C. A Review of the Nutritional Requirements of Bivalves and the Development of Alternative and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science* 1999; 7(3-4): 241-280
23. Martínez-Fernández E, Acosta-Salmón H and Southgate P C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (Pinctada margaritifera, L.) larvae. *Aquaculture* 2006; 257(1): 491-503
24. Martínez-Fernández E and Southgate P C. Use of tropical microalgae as food for larvae of the black-lip pearl oyster Pinctada margaritifera. *Aquaculture* 2007; 263(1): 220-226
25. Goodfellow M and Williams S T. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1983; 37:189-216
26. Bioinformatics Analysis of the Potential Allergenicity, Toxicity and Anti-nutritional Properties of Proteins Encoded by Genes Inserted in Canola (Brassica napus) for Production of Omega 3 Fatty Acids (BNDHA-2021-018). (社内文書)
27. Oura T and Kajiwara S. Substrate specificity and regioselectivity of delta12 and omega3 fatty acid desaturases from Saccharomyces kluyveri. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008; 72(12): 3174-3179
28. Petrie J R, Shrestha P, Zhou X R, Mansour M P, Liu Q, Belide S, et al. Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA. *PLoS One* 2012; 7(11): e49165
29. Shrestha P, Zhou X R, Vibhakaran Pillai S, Petrie J, de Feyter R and Singh S. Comparison of the Substrate Preferences of ω 3 Fatty Acid Desaturases for Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Int J Mol Sci* 2019; 20(12): 3058 .
30. Zhang X, Li M, Wei D and Xing L. Identification and characterization of a novel yeast omega3-fatty acid desaturase acting on long-chain n-6 fatty acid substrates from Pichia pastoris. *Yeast* 2008; 25(1): 21-27

31. Petrie J R, Shrestha P, Mansour M P, Nichols P D, Liu Q and Singh S P. Metabolic engineering of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in plants using an acyl-CoA Delta6-desaturase with omega3-preference from the marine microalga *Micromonas pusilla*. *Metab Eng* 2010c; 12(3): 233-240
32. Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadì A, Sperling P, Bauer J, et al. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J Lipid Res* 2004; 45(10): 1899-1909
33. Petrie J R, Liu Q, Mackenzie A M, Shrestha P, Mansour M P, Robert S S, et al. Isolation and characterisation of a high-efficiency desaturase and elongases from microalgae for transgenic LC-PUFA production. *Mar Biotechnol (NY)* 2010a; 12(4): 430-438
34. Knutzon D S, Thurmond J M, Huang Y S, Chaudhary S, Bobik E G, Jr., Chan G M, et al. Identification of Delta5-desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in Bakers' yeast and canola. *J Biol Chem* 1998; 273(45): 29360-29366
35. Petrie J R, Shrestha P, Liu Q, Mansour M P, Wood C C, Zhou X R, et al. Rapid expression of transgenes driven by seed-specific constructs in leaf tissue: DHA production. *Plant Methods* 2010b; 6: 8
36. Tonon T, Harvey D, Larson T R and Graham I A. Identification of a very long chain polyunsaturated fatty acid Delta4-desaturase from the microalga *Pavlova lutheri*. *FEBS Lett* 2003; 553(3): 440-444
37. Bioinformatics Analysis of eight proteins in DHA canola event, (OECD Unique Identifier NS-B50027-4): Sequence homology search with known toxins and anti-nutrients (BNDHA-2024-006) (社内文書)
38. Makarova, K. S., Y. I. Wolf & E. V. Koonin. 2009. Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes. *Biol Direct*, 4, 19.
39. Chaudhary, S., G. Van Rooijen, M. Moloney & S. S. 2001. Flax seed specific promoters.
40. Rossak, M., M. Smith & L. Kunst. 2001. Expression of the FAE1 gene and FAE1 promoter activity in developing seeds of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 46, 717-25.
41. 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.
42. 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.
43. Cho, M.-J., J. M. Widholm & L. O. Vodkin. 1995. Cassettes for Seed-Specific Expression Tested in Transformed Embryogenic Cultures of Soybean. *Plant*

- Molecular Biology Reporter, 13, 10 255-269.
44. Vodkin, L. O., P. R. Rhodes & R. B. Goldberg. 1983. cA lectin gene insertion has the structural features of a transposable element. *Cell*, 34, 1023-31.
 45. Sanders, P. R., J. A. Winter, A. R. Barnason, S. G. Rogers & R. T. Fraley. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S
 46. Gallie, D. R., D. E. Sleat, J. W. Watts, P. C. Turner & T. M. Wilson. 1987. A comparison of 5 eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression in vivo. *Nucleic acids research*, 15, 8693-8711.
 47. 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.
 48. Halweg, C., W. F. Thompson & S. Spiker. 2005. The rb7 matrix attachment region increases the 20 likelihood and magnitude of transgene expression in tobacco cells: a flow cytometric study. *The Plant cell*, 17, 418-429.
 49. OECD. ENV/JM/MONO(99)13 Consensus document on general information concerning the genes and their enzymes that confer tolerance to phosphinothricin herbicide, 1999
 50. Bioinformatics Analysis of Putative Open Reading Frames (ORF) in DHA canola event, (OECD Unique Identifier NS-B50027-4): Sequence homology search with known allergens and toxins (BNDHA-2023-008) (社内文書)
 51. Colgrave M L, Byrne K, Pillai S V, Dong B, Leonforte A, Caine J, et al. Quantitation of seven transmembrane proteins from the DHA biosynthesis pathway in genetically engineered canola by targeted mass spectrometry. *Food Chem Toxicol* 2019b; 126313-321
 52. CoA of protein content of DHA canola oil. (社内文書)
 53. Colgrave M L, Byrne K, Caine J, Kowalczyk L, Vibhakaran Pillai S, Dong B, et al. Proteomics reveals the in vitro protein digestibility of seven transmembrane enzymes from the docosahexaenoic acid biosynthesis pathway. *Food Chem Toxicol* 2019a; 13089-98
 54. Thomas, K., M. Aalbers, G. A. Bannon, M. Bartels, R. J. Dearman, D. J. Esdaile, T. J. Fu, C. M. Glatt, N. Hadfield, C. Hatzos, S. L. Hefle, J. R. Heylings, R. E. Goodman, B. Henry, C. Herouet, M. Holsapple, G. S. Ladics, T. D. Landry, S. C. MacIntosh, E. A. Rice, L. S. Privalle, H. Y. Steiner, R. Teshima, R. Van Ree, M. Woolhiser & J. Zawodny. 2004. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 39, 87-98.
 55. Thermal Stability of Enzymes Involved in DHA Biosynthesis Pathway in NS-B50027-4 (No. BNDHA-2018-007). (社内文書)
 56. Safety Evaluation of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Protein (BNDHA-2021-24). (社内文書)

57. Sun H-J, Kang H-G, Bae T-W, Cho T-G, Kim J, Lim P-O, et al. Assessment of Phosphinothricin Acetyltransferase (PAT) Degradation From Transgenic Zoysiagrass Digested with Simulated Gastric Fluid (SGF). *Journal of Plant Biology* 2010; 53(2): 113-120
58. Herouet C, Esdaile D J, Mallyon B A, Debruyne E, Schulz A, Currier T, et al. Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 41(2): 134-149
59. Wehrmann A, Van Vliet A, Opsomer C, Botterman J and Schulz A. The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers. *Nat Biotechnol* 1996; 14(10): 1274-1278
60. Nutrient Composition of Harvested Canola expressing Long-Chain Omega-3 Field-grown in Australia during 2015, Revised 3 (BNDHA-2016-021 Rev.3). (社内文書)
61. 厚生労働省. 2019. 「日本人の食事摂取基準 (2020 年版)」策定検討会報告書. pp. 127-151