

遺伝子組換え食品等評価書

長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダ
ゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ
LBFLFK
(食品)

令和4年(2022年)11月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<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>.....	3
要 約.....	4
I. 評価対象食品の概要.....	6
II. 食品健康影響評価.....	6
第1. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項.....	6
1. 宿主及び導入 DNA に関する事項.....	6
2. 宿主の食経験に関する事項.....	7
3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項.....	7
4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項.....	8
5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項.....	8
6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項.....	8
第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	8
第3. 宿主に関する事項.....	9
1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項.....	9
2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項.....	9
3. 有害生理活性物質の生産に関する事項.....	9
4. アレルギー誘発性に関する事項.....	9
5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	9
6. 安全な摂取に関する事項.....	9
7. 近縁の植物種に関する事項.....	9
第4. ベクターに関する事項.....	10
1. 名称及び由来に関する事項.....	10
2. 性質に関する事項.....	10
第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	10
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	10
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項.....	11
3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項.....	16
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	16
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	16
6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項.....	16
第6. 組換え体に関する事項.....	17
1. 遺伝子導入に関する事項.....	17
2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	19
3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項.....	20

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.....	20
5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項.....	21
6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項.....	22
7. 宿主との差異に関する事項.....	22
8. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	25
9. 栽培方法に関する事項.....	25
10. 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	25
第7. 第2から第6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.....	25
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	25
<参照>.....	26

<審議の経緯>

2020年10月20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1019第2号）、関係書類の接受

2020年10月27日 第795回食品安全委員会（要請事項説明）

2020年11月20日 第205回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年11月19日 第219回遺伝子組換え食品等専門調査会

2022年7月28日 第226回遺伝子組換え食品等専門調査会

2022年11月29日 第880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

佐藤 洋（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

2021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）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
吉田 充

<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

2021年10月1日から

中島 春紫（座長）
山川 隆（座長代理）
安達 玲子 小野 竜一
岡田 由美子 近藤 一成
小関 良宏 樋口 恭子
小野 道之 藤原 すみれ

2022年4月1日から

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 近藤 一成

岡田 由美子 佐々木 伸大

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

<第 219 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）

手島 玲子（岡山理科大学獣医学部教授）

<第 226 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

「長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK」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 Kumily を宿主とし、卵菌類、海洋微生物藻類、コケ等に由来する7種のデサチュラーゼ遺伝子及び3種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従来のセイヨウナタネでは産生されない種類の長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する。また、*Arabidopsis thaliana* に由来するアセトヒドロキシ酸合成酵素遺伝子が導入され、アセトヒドロキシ酸合成酵素が発現することでイミダゾリノン系除草剤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。

「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿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、遺伝子導入後の塩基配列等の解析、交配後の世代における挿入遺伝子の安定性、植物の代謝経路への影響、植物の栄養成分・有害成分等の比較等について確認した結果、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は認められなかった。

したがって、「長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK」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：長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK

性 質：長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性

申請者：BASF ジャパン株式会社

開発者：BASF Agricultural Solutions Seed US LLC (米国)

「長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK」(以下「セイヨウナタネ LBFLFK」という。)は、卵菌類、海洋微生物藻類、コケ等に由来する7種のデサチュラーゼ遺伝子及び3種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従来のセイヨウナタネでは産生されない種類の長鎖多価不飽和脂肪酸を産生する。また、*Arabidopsis thaliana* 由来のアセトヒドロキシ酸合成酵素(AHAS(*At*))遺伝子が導入され、アセトヒドロキシ酸合成酵素である AHAS(*At*)[A122TS653N]タンパク質(以下、「AHAS(*At*)タンパク質」という。)が発現することでイミダゾリノン系除草剤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. 安全性評価において比較対象として用いる宿主等の性質及び組換え体との相違に関する事項

1. 宿主及び導入DNAに関する事項

(1) 宿主の種名及び由来

宿主は、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 Kumily である。

(2) DNA 供与体の種名及び由来

挿入DNAの供与体に関する情報は表1に記載のとおりである。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法

挿入DNAの性質は表1に記載のとおりである。これら7種のデサチュラーゼ及び3種のエロンガーゼが発現することにより、種子中に長鎖多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸(EPA)及びドコサヘキサエン酸(DHA)を産生させる。AHAS(*At*)遺伝子は、AHAS(*At*)タンパク質をコードし、除草剤イミダゾリノン耐性を付与する。

これらの遺伝子は、アグロバクテリウム法を用いて宿主に導入された。

表1 挿入 DNA、その供与体及び遺伝子産物

遺伝子	供与体 (学名)	供与体・属 (和名)	遺伝子産物	酵素名
<i>D12D(Ps)</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	卵菌類 (ダイズ茎疫病菌)	<i>D12D(Ps)</i>	Δ -12 デサチュラーゼ(<i>Ps</i>)
<i>D6D(Ot)</i>	<i>Ostreococcus tauri</i>	海洋微生物緑藻	<i>D6D(Ot)</i>	Δ -6 デサチュラーゼ(<i>Ot</i>)
<i>D5E(Ot)</i>	<i>Ostreococcus tauri</i>	海洋微生物緑藻	<i>D5E(Ot)</i>	Δ -5 エロンガーゼ(<i>Ot</i>)
<i>D6E(Tp)</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	海洋性珪藻類	<i>D6E(Tp)</i>	Δ -6 エロンガーゼ(<i>Tp</i>)
<i>D6E(Pp)</i>	<i>Physcomitrella patens</i>	ヒメツリガネゴケ	<i>D6E(Pp)</i>	Δ -6 エロンガーゼ(<i>Pp</i>)
<i>D4D(Tc)</i>	<i>Thraustochytrium sp.</i>	海洋生物ラビリンチュラ類	<i>D4D(Tc)</i>	Δ -4 デサチュラーゼ(<i>Tc</i>)
<i>D5D(Tc)</i>	<i>Thraustochytrium sp.</i>	海洋生物ラビリンチュラ類	<i>D5D(Tc)</i>	Δ -5 デサチュラーゼ(<i>Tc</i>)
<i>O3D(Pir)</i>	<i>Pythium irregulare</i>	卵菌類	<i>O3D(Pir)</i>	ω -3 デサチュラーゼ(<i>Pir</i>)
<i>O3D(Pi)</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	卵菌類 (ジャガイモ疫病菌)	<i>O3D(Pi)</i>	ω -3 デサチュラーゼ(<i>Pi</i>)
<i>D4D(P)</i>	<i>Pavlova lutheri</i>	海洋微細藻類	<i>D4D(P)</i>	Δ -4 デサチュラーゼ(<i>P</i>)
<i>AHAS(At)</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	シロイヌナズナ	<i>AHAS(At)</i>	アセトヒドロキシ酸合成酵素

* : 各遺伝子名の括弧内は、供与体の菌名を示している。

2. 宿主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、種子から得られた油が食用として利用されている。

3. 宿主由来の食品の構成成分等に関する事項

(1) 宿主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

セイヨウナタネのキャノーラ品種の種子中における主要栄養組成 (対乾燥重量) は、タンパク質 22.53~31.24%、粗脂質 31.29~44.23%、粗繊維 7.57~10.95%、酸性デタージェント繊維 9.14~11.95%、中性デタージェント繊維 12.45~15.70%、灰分 3.92~5.53%である (参照 1)。

(2) 宿主に含まれる毒性物質・栄養阻害物質等の種類及びその量の概要

セイヨウナタネのキャノーラ品種の種子中におけるエルカ酸及び総グルコシノレートの含有量は、それぞれ<2.0% (全脂肪酸) (参照 2) 及び 4.21~25.57 μ mol/g (対乾燥重量) である。その他の栄養阻害物質 (対乾燥重量) は、フィチン酸 1.99~3.24%、シナピン 0.79~1.09%である (参照 1)。

4. 宿主と組換え体との食品としての利用方法及びその相違に関する事項

(1) 収穫時期（成熟程度）と貯蔵方法

セイヨウナタネ LBFLFK の収穫時期及び貯蔵方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(2) 摂取（可食）部位

セイヨウナタネ LBFLFK の摂取部位は、従来のセイヨウナタネと変わらない。

(3) 摂取量

セイヨウナタネ LBFLFK 由来の油は、EPA 及び DHA の摂取の目的で利用されるため、摂取量は、従来のセイヨウナタネと異なる。

(4) 調理及び加工方法

セイヨウナタネ LBFLFK の製油方法は、従来のセイヨウナタネと変わらない。セイヨウナタネ LBFLFK 由来の油は、脂肪酸組成を変化させており、EPA 及び DHA を従来品より多く含むことから、加熱調理用としての販売はないとしている。

5. 宿主以外のものを比較対象に追加して用いる場合、その根拠及び食品としての性質に関する事項

宿主と宿主以外の従来品種のほかは、脂肪酸組成の比較のため、EPA 及び DHA を含有する魚油、藻類油及び油脂生産糸状菌 (*Mortierella alpina*) 由来油並びに食経験のある種々の動物性油脂を比較対象とした。

6. 安全性評価において検討が必要とされる相違点に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK は、7つのデサチュラーゼ及び3つのエロンガーゼが発現することによって、種子脂肪酸中の EPA 及び DHA を含む長鎖多価不飽和脂肪酸の割合が増加し、それに伴ってオレイン酸、リノール酸及びトランス脂肪酸の割合が変化すること、AHAS(*At*)タンパク質を発現することで、除草剤イミダゾリノン耐性が付与される点が宿主との相違点である。

以上1～6により、セイヨウナタネ LBFLFK の安全性評価においては、既存のセイヨウナタネ、EPA 及び DHA を含有する魚油、藻類油及び *M. alpina* 由来油並びに食経験のある種々の動物性油脂との比較が可能であると判断した。

第2. 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK は、導入された7つのデサチュラーゼ及び3つのエロンガーゼによって、従来のセイヨウナタネでは産生されない EPA 及び DHA を産生する。これら ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸（以下「 ω -3 脂肪酸」という。）は、健康の保持・増進にとって重要であり、セイヨウナタネ LBFLFK はその供給源としての利用が考えられている。

セイヨウナタネ LBFLFK 精製油の想定される用途は、魚油の代替として養殖魚へ与える飼料としての使用が主であり、その他、食品としてドレッシング等への使用が想定される。

また、AHAS(*At*)タンパク質により、イミダゾリノン系除草剤を散布しても、その影響を受けずに生育することができる。

第3. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け等（学名、品種名及び系統名等）に関する事項

宿主は、アブラナ科アブラナ属に属するセイヨウナタネ (*B. napus*L.) のキャノーラ品種 Kumily である。

2. 遺伝的先祖並びに育種開発の経緯に関する事項

セイヨウナタネ (*B. napus*) は、キャベツ類 (*B. oleracea*) とアブラナ (*B. rapa*) との交雑に由来すると考えられている。従来のセイヨウナタネには、ヒトやその他の動物に有害なエルカ酸とグルコシノレートが含まれるため、これらの含量の低い品種の育種が行われた。すなわち、カナダにおける品種改良により開発された低エルカ酸及び低グルコシノレートのキャノーラ品種である（参照 3）。

3. 有害生理活性物質の生産に関する事項

セイヨウナタネに含まれる有害生理活性物質として、エルカ酸、グルコシノレート、フィチン酸、シナピン及びタンニンがある。エルカ酸含量の多い油を多量に摂取すると心機能障害を起こす可能性があるため、コーデックス委員会では、全脂肪酸のエルカ酸含量は2%未満と規定されている（参照 2）。

グルコシノレートは含硫配糖体であり、それ自体は無害であるが、セイヨウナタネに含まれる酵素により加水分解されることで甲状腺腫誘発性作用等をもたらす可能性がある。このため、OECD のコンセンサス文書では油粕中のグルコシノレート含量を 30 $\mu\text{mol/g}$ 未満（対乾燥重量）とすることが示されている（参照 3、4）。

フィチン酸は、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛等のミネラル吸収量を減少させる。シナピンは、腸内でトリメチルアミンに代謝され、さらに排泄しやすいトリメチルアミンオキシドに代謝されるが、これを速やかに異化できない動物が知られている。タンニンは、必須金属をキレート化しこれらの栄養素の吸収を妨げる（参照 3）。

4. アレルギー誘発性に関する事項

セイヨウナタネのキャノーラ品種から得られるナタネ油がアレルギー誘発性を持つという報告はない（参照 3）。

5. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

セイヨウナタネには、糸状菌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。

6. 安全な摂取に関する事項

セイヨウナタネのキャノーラ品種から得られるナタネ油が食用に用いられる。

7. 近縁の植物種に関する事項

アブラナ属植物にはこれまで安全に摂取されてきた野菜が含まれる。主要な油糧作物であるアブラナには、セイヨウナタネと同様にエルカ酸及びグルコシノレ

ートが含まれることが知られている。

第4. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK の作出に用いられた導入用プラスミド LTM593 はプラスミド LTM586 に基づき作製された。

2. 性質に関する事項

(1) DNA 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 LTM593 の外骨格領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

サザンブロット解析を行っていないため、制限酵素切断部位は示していない。なお、LTM593 の塩基配列は明らかになっている。

(3) 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 LTM593 の外骨格領域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。

(4) 薬剤耐性遺伝子に関する事項

導入用プラスミド LTM593 の外骨格領域には、カナマイシン耐性を付与する *KanR* 遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

導入用プラスミド LTM593 の外骨格領域には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

第5. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 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

第1-1 表1に記載のとおりである。

(2) 安全性に関する事項

D12D(Ps) 遺伝子の供与体である *Phytophthora sojae*、*O3D(Pir)* 遺伝子の供与体である *Pythium irregulare*、*O3D(Pi)* 遺伝子の供与体である *Phytophthora infestans* はいずれも真核生物である卵菌類に属し、*D4D(P)* 遺伝子の供与体である *Pavlova lutheri* は海洋微細藻類である。いずれも ATCC におけるバイオセーフティレベル (BSL) 1 に分類されており、文献検索^aの結果、ヒトに影響を与える毒素産生に関連する報告はなかった。

D6D(O) 遺伝子及び *D5E(O)* 遺伝子の供与体である *O. tauri* は、海洋で一般的に存在する海洋微生物緑藻であり、文献検索^aの結果、ヒトに影響を与える毒素産生に関連する報告はなかった。

D6E(Tp) 遺伝子の供与体である *Thalassiosira pseudonana* は、海洋珪藻で、

^a Web of Science (検索日: 2016年7及び8月) 及び Scopus (検索日: 2021年2及び3月)

神経毒を産生することが知られている（参照 5）が、この生合成過程に脂肪酸合成酵素は含まれない。

D6E(Pp) 遺伝子の供与体である *Physcomitrella patens* は、コケの一種であり、文献検索^aの結果、ヒトに影響を与える毒素産生に関連する報告はなかった。

D4D(Tc) 遺伝子及び *D5D(Tc)* 遺伝子の供与体である *Thraustochytrium sp.* は、海洋生物ラビリンチュラ類に属する海洋原生生物であり、DHA の供給源として使用されている（参照 6）。*Thraustochytrium sp.* が、毒素及び栄養阻害物質を含有すること及びそれを生産すること並びにヒトや動物に病気を引き起こすことは報告されていない。

AHAS(At) 遺伝子の供与体であるシロイヌナズナ (*A. thaliana*) は、アブラナ科植物であり、グルコシノレート含有することが報告されている（参照 7）。また、*A. thaliana* 花粉暴露による職業性喘息の事例などの報告がある（参照 8、9）。*A. thaliana* に、ヒトに対して病原性及び有毒性を有するとの報告はない。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

7 つのデサチュラーゼ及び 3 つのエロンガーゼ遺伝子は、セイヨウナタネにおける発現に適するようにコドンが最適化され、また、翻訳効率を上げるための改変を行っているがアミノ酸配列は供与体の配列と変わらない。

AHAS(At) 遺伝子については、アミノ酸配列の 2 つのアミノ酸を置換する塩基配列の改変を行った（参照 10）。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

T-DNA 領域の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 10）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

Δ -デサチュラーゼは、脂肪酸のカルボニル基から一定の位置に二重結合を導入し、 ω -デサチュラーゼは、メチル基から一定の位置に二重結合を導入する。エロンガーゼは、C18 及びそれ以上の長鎖脂肪酸を 2 炭素単位で伸長させる。デサチュラーゼ及びエロンガーゼは脂肪酸合成系のみに関与し、実際、セイヨウナタネ LBFLFK に導入された各遺伝子は数種の脂肪酸合成を触媒することを酵母の系にて確認している（参照 11）。

11 種類の遺伝子がそれぞれコードするタンパク質の機能は表 2 に記載のとおりである。

AHAS(At) 遺伝子がコードする *AHAS(At)* タンパク質は、多くの植物が生存するために必要な酵素で、分岐鎖アミノ酸生合成の第一段階を触媒する（参照 12）*AHAS* タンパク質の 2 か所のアミノ酸を置換したものである。このアミノ酸変異により、イミダゾリノン系除草剤の *AHAS* 酵素阻害が阻止され、除草剤耐性が付与される（参照 13）。

導入した 11 種類の遺伝子の遺伝子産物（タンパク質）と既知の毒性タンパク質との相同性を解析するために、タンパク質データベース^bを用いて *E*

^b NCBI non-redundant protein database. (検索日：2017 年 2 月) internal toxin database (検

value<1 を指標として相同性検索を行った結果、既知の毒性タンパク質と相同性を示すタンパク質はなかった（参照 14、15、16）。

また、NCBI データベース^cを用いて各タンパク質と食品及び飼料に存在する同じ機能を有する酵素との相同性検索を行い、検出された配列中のデサチュラーゼ及びエロンガーゼ活性部位の有無を確認^dし、活性部位の配列において 90%以上の相同性を示すものを検出した。その結果、新たに発現させたデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、その配列において様々であるが、活性部位は保存され、ヒト及び動物に摂取されてきた食品及び飼料に含まれていることが示された（参照 17、18）。

(4) 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 LTM593 は、T-DNA 領域外に、カナマイシン耐性を付与する *KanR* 遺伝子を有するが、セイヨウナタネ LBFLFK に挿入されていないことがシーケンス解析により確認されている（参照 19）。

表 2 挿入 DNA 構成要素

構成要素	由来及び機能
RB	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界配列を含む <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 由来の DNA 領域
<i>D6E(Pp)</i> 遺伝子発現カセット：1 *	
<i>P-USP(Vf)</i>	<i>Vicia faba</i> 由来の種子タンパク質遺伝子 USP (unknown seed protein) の種子特異的プロモーター領域
<i>i-At1g01170</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> 由来の <i>At1g01170</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D6E(Pp)</i>	<i>Physcomitrella patens</i> 由来の Δ -6 エロンガーゼをコードする。γ-リノレン酸のカルボキシル末端に 2 つの炭化水素基を追加しジホモ-γ-リノレン酸への変換を触媒する。
<i>t-CaMV35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の CaMV35S ターミネーター
<i>D5D(Tc)1</i> 遺伝子発現カセット：2	
<i>p-CNL(Lu)</i>	<i>Linum usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター
<i>i-At5g63190</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At5g63190</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D5D(Tc)1</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -5 デサチュラーゼをコードする。ジホモ-γ-リノレン酸のカルボキシル末端から数えて 5 番目の位置に二重結合を導入してアラキドン酸への変換を触媒する。

索日：2021 年 2 月)

^c NCBI non-redundant protein database. (検索日：2017 年 2 月及び 2021 年 4 月)

^d Pfam domain database (PfamA, release 26, 検索日：2017 年 2 月)

t- <i>OCS</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のオクトピン合成遺伝子のターミネーター
<i>D6D(Ot)</i> 遺伝子発現カセット : 3	
p- <i>SBP(Vf)</i>	<i>V. faba</i> 由来のスクロース結合タンパク質関連遺伝子のプロモーター。種子成熟段階の後期に遺伝子発現を活性化させる。
i- <i>At1g65090</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g65090</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D6D(Ot)</i>	<i>Ostreococcus tauri</i> 由来の Δ -6 デサチュラーゼをコードする。リノール酸のカルボキシル末端から数えて 6 番目の位置に二重結合を導入して γ -リノレン酸への変換を触媒する。
t- <i>CATHD(St)</i>	<i>Solanum tuberosum</i> 由来のカテプシン D 阻害遺伝子のターミネーター
<i>D6E(Tp)</i> 遺伝子発現カセット : 4	
p- <i>PXR(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来のペルオキシレドキシシン様タンパク質の遺伝子である <i>PXR</i> の種子特異的プロモーター
i- <i>At1g62290</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g62290</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D6E(Tp)</i>	<i>Thalassiosira pseudonana</i> 由来の Δ -6 エロンガーゼをコードする。 γ -リノレン酸のカルボキシル末端に 2 つの炭化水素基を追加しジホモ- γ -リノレン酸への変換を触媒する。
t- <i>PXR(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のペルオキシレドキシシン様タンパク質の遺伝子 <i>PER1</i> のターミネーター
<i>D12D(Ps)</i> 遺伝子発現カセット : 5	
p- <i>napA(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の種子貯蔵タンパク質ナピン A/B 遺伝子の種子特異的プロモーター
i- <i>At5g63190</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At5g63190</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D12D(Ps)</i>	<i>Phytophthora sojae</i> 由来の Δ -12 デサチュラーゼをコードする。オレイン酸のカルボキシル末端から数えて 12 番目の位置に二重結合を導入してリノール酸への変換を触媒する。
t- <i>rbcS(Ps)</i>	<i>Pisum sativum</i> 由来の RuBisCO 小サブユニット遺伝子 (<i>rbcS</i>) E9 のターミネーター。
<i>O3D(Pir)1</i> 遺伝子発現カセット : 6	
p- <i>SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター
<i>O3D(Pir)1</i>	<i>Pythium irregulare</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼをコードする。アラキドン酸の ω (メチル) 末端から数えて 3 番目の位

	置に二重結合を導入し、エイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
t- <i>SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子のターミネーター
<i>O3D(Pi)</i> 遺伝子発現カセット : 7	
p- <i>USP(Vf)</i>	<i>V. faba</i> 由来の種子タンパク質遺伝子 <i>USP</i> の種子特異的プロモーター
i- <i>At1g01170</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g01170</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>O3D(Pi)</i>	<i>Phytophthora infestans</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼをコードする。アラキドン酸の ω 末端から数えて 3 番目の位置に二重結合を導入してエイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
t- <i>CaMV35S</i>	カリフラワーモザイクウイルス由来の <i>CaMV35S</i> ターミネーター
<i>D5D(Tc)2</i> 遺伝子発現カセット : 8	
p- <i>SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター。
<i>D5D(Tc)2</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -5 デサチュラーゼをコードする。ジホモ- γ -リノレン酸のカルボキシル末端から数えて 5 番目の位置に二重結合を導入して、アラキドン酸への変換を触媒する。
t- <i>SETL(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来の <i>SETL</i> 遺伝子のターミネーター
<i>D4D(Tc)</i> 遺伝子発現カセット : 9	
p- <i>ARC5(Pv)</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> 由来の種子特異的 <i>Arcelin-5</i> 遺伝子プロモーター
<i>D4D(Tc)</i>	<i>Thraustochytrium</i> sp. 由来の Δ -4 デサチュラーゼをコードする。クルパノドン酸のカルボキシル末端から数えて 4 番目の位置に二重結合を導入してドコサヘキサエン酸への変換を触媒する。
t- <i>ARC(Pv)</i>	<i>P. vulgaris</i> 由来の <i>Arc5</i> 遺伝子のターミネーター
<i>O3D(Pir)2</i> 遺伝子発現カセット : 10	
p- <i>PXR(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来のペルオキシレドキシシリン様タンパク質の遺伝子 <i>PXR</i> の種子特異的プロモーター。
i- <i>AGO4(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>AGO4(At)</i> 遺伝子の 5' UTR を含むイントロン
<i>O3D(Pir)2</i>	<i>P. irregulare</i> 由来の ω -3 デサチュラーゼをコードする。アラキドン酸の ω 末端から数えて 3 番目の位置に二重結合を導入してエイコサペンタエン酸への変換を触媒する。
t- <i>PXR(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 、ペルオキシレドキシシリン様タンパク質の遺伝子 <i>PER1</i> の終結因子

<i>D4D(Pl)</i> 遺伝子発現カセット : 1 1	
p- <i>CNL(Lu)</i>	<i>L. usitatissimum</i> 由来の <i>conlinin</i> 遺伝子の種子特異的プロモーター
i- <i>At1g65090</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g65090</i> 座の 5'UTR を含むイントロン
<i>D4D(Pl)</i>	<i>Pavlova lutheri</i> 由来の Δ -4 デサチュラーゼをコードする。クルパノドン酸のカルボキシル末端から数えて 4 番目の位置に二重結合を導入してドコサヘキサエン酸への変換を触媒する。
t- <i>OCS</i>	<i>A. tumefaciens</i> のオクトピン系 Ti プラスミド pTi15955 由来のオクトピン合成遺伝子のターミネーター
<i>D5E(Ot)</i> 遺伝子発現カセット : 1 2	
p- <i>FAE1(Bn)</i>	<i>B. napus</i> 由来のエロンガーゼ (<i>FAE1.1</i>) 遺伝子のプロモーター。
i- <i>At1g62290</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>At1g62290</i> 座の 5'UTR を含むイントロン (アスパラチルプロテアーゼタンパク質)
<i>D5E(Ot)</i>	<i>O. tauri</i> 由来の Δ -5 エロンガーゼをコードする。エイコサペンタエン酸のカルボキシル末端に 2 つの炭化水素基を追加し、クルパノドン酸への変換を触媒する。
t- <i>FAE1(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のエロンガーゼ遺伝子 (<i>FAE1</i>) のターミネーター
<i>AHAS(At)</i> 遺伝子発現カセット : 1 3	
p- <i>Ubi4(Pc)</i>	<i>Petroselinum crispum</i> 由来のユビキチン (<i>Pcubi4-2</i>) プロモーター。
i- <i>Ubi4(Pc)</i>	<i>P. crispum</i> 由来の 5'UTR のユビキチン遺伝子イントロン
<i>AHAS(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来のアセトヒドロキシ酸合成酵素の S653N 及び A122T 置換を伴う <i>AHAS</i> の大サブユニットをコードし、イミダゾリノン系除草剤への耐性を与える。
t- <i>AHAS(At)</i>	<i>A. thaliana</i> 由来の <i>AHAS(At)</i> 遺伝子のターミネーター
LB	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> 由来の DNA 領域

* : 数字は図 1 における発現カセット番号を示す。

D5D(Tc) 及び *O3D(Pir)* 遺伝子発現カセットは、各々 2 個、セイヨウナタネ LBFLFK に挿入されている。

3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性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

第5-2 表2に記載のとおりである。

(2) ターミネーターに関する事項

第5-2 表2に記載のとおりである。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

セイヨウナタネ LBFLFK に挿入されているイントロンは第5-2 表2に記載のとおりである。

4. 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 LTM593 は、プラスミド LTM586 を基に作製した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と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 LTM593 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照10）。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

第6-1-(2)に記載したとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

導入用プラスミド LTM593 の T-DNA 領域の右側領域 (RB) から左側領域 (LB) までである。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

導入用プラスミド LTM593 は、抗生物質耐性マーカーを用いた選抜により純化され、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（参照19）。

6. DNA の宿主への導入方法及び交配に関する事項

導入用プラスミド LTM593 を用いて、アグロバクテリウム法により形質転換を行った後、カルベニシリン及びイマゼタピル（イミダゾール化合物）を含む培地で選抜を行い、イマゼタピル耐性カルスから再生個体を得た。得られた再生個体の自殖によりセイヨウナタネ LBFLFK が得られた。

第6. 組換え体に関する事項

1. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK のゲノムに挿入された T-DNA のコピー数を確認するため、シーケンス解析を行った結果、セイヨウナタネ LBFLFK 及び宿主ゲノムから読まれたそれぞれのリードの平均冗長度は 160 以上であり、セイヨウナタネ LBFLFK ゲノムでは、4 か所に T-DNA 配列とゲノムとの接合領域が特定された。一方、宿主ではこれらの接合領域は確認されず、したがって、セイヨウナタネ LBFLFK ゲノム中 2 か所にそれぞれ 1 コピー挿入されていることが確認された (参照 19)。

Insert1 (図 1, 上段) では、*D12D(Ps)* 遺伝子の翻訳領域において 1 塩基置換が生じ、その結果 1 アミノ酸が置換された。また *O3D(Pir)* 遺伝子のプロモーター領域に 1 塩基置換が認められた。Insert2 (図 1, 下段) では、*D4D(PI)* 遺伝子の翻訳領域において 1 塩基置換が生じ、その結果 1 アミノ酸が置換された。また、図 1 に示した T-DNA とゲノムとの接合領域の塩基の欠失及び再配列を除き、導入用プラスミド LTM593 の T-DNA 領域の配列と一致していた。

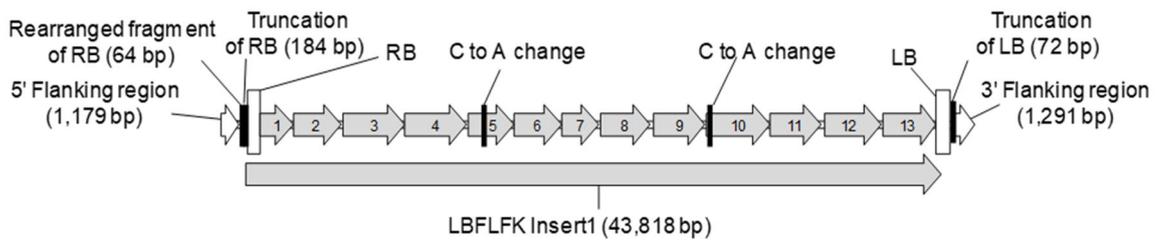
次に、セイヨウナタネ LBFLFK に挿入された T-DNA の近傍配列が宿主ゲノム由来であることを PCR 産物の塩基配列を解析して確認した。Insert1 の 5' 末端 (1,179 bp) 及び 3' 末端 (1,291 bp) 近傍配列、並びに Insert2 の 5' 末端 (1,180 bp) 及び 3' 末端 (1,009 bp) 近傍配列は、宿主の内在性配列と一致した。また、Insert1 の挿入位置に、8 bp 欠失が、Insert2 の挿入位置に 31 bp の欠失が確認された。

セイヨウナタネ LBFLFK のゲノム中に導入用プラスミド LTM593 の外骨格領域が挿入されていないことを確認するため、セイヨウナタネ LBFLFK から得られた DNA 断片と導入用プラスミド LTM593 との相同性がある配列を比較した結果、導入用プラスミドの外骨格領域は挿入されていないことが確認された。

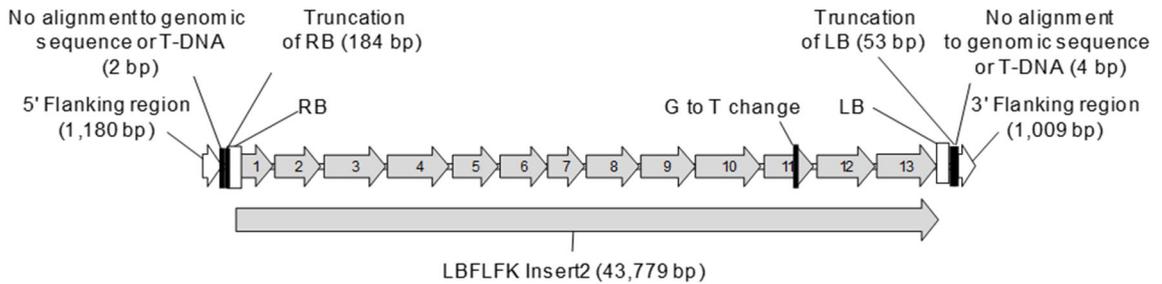
また、セイヨウナタネ LBFLFK のゲノムに T-DNA を挿入することにより宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、Insert1 及び Insert2 の両端の近傍配列についてデータベース^eを用いて BLASTN 及び BLAST 検索にて既知のタンパク質との相同性の有無を調査した。その結果、T-DNA の挿入によりセイヨウナタネの内在性遺伝子は影響を受けていないことが確認された (参照 20、21) 。

^e NCBI Nucleotide collection 及び Non-redundant protein sequences、ナタネデータベース Brassica DB、Genoscope、NCBI *Brassica napus* annotation、NCBI EST、NCBI RefSeq Genome-*Brassica napus* (検索日：2018 年 12 月及び 2021 年 2 月)

Insert1



Insert2



発現カセット番号の構成要素は表2に対応する。

図1 セイヨウナタネ LBFLFK の挿入 DNA (模式図)

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK の挿入 DNA 領域と 5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列との接合部において、意図しないオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）が生じていないことを確認するため、6つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する 30 アミノ酸以上の ORF が Insert1 及び Insert2 において、それぞれ 725 個及び 724 個見いだされた。

検出された ORF と既知のアレルゲンとの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^fを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、青花ルピナス及び大麻のアレルゲンが検出された。青花ルピナスのアレルゲンと相同性を示した ORF は、宿主セイヨウナタネに内在する *p-FAE1 (Bn)* プロモーター内の既存の配列であった。大麻のアレルゲンに該当する ORF は、イントロンと *D6D (Ot)* 遺伝子間の接合部に位置するマイナス鎖であり、上流に転写開始部位は存在しなかった。したがって、これらの ORF によりアレルギーが誘発される可能性は低いと考えられた。

連続する 8 アミノ酸配列と一致する既知のアレルゲンとして、ミツバチ毒アレルゲンであるピテロゲニンとカシューナッツのアレルゲンが検出された。ピテロゲニンの 8 アミノ酸と一致した ORF は、マイナス鎖にあり、上流に転写開始部位は存在しなかった。また、アレルゲンとして知られていない多くの植物に存在する配列であった。カシューナッツのアレルゲンであるビシリン様タンパク質中の 8 アミノ酸と一致した ORF は、宿主セイヨウナタネに内在する

^f Allergen online (FARRP version 16 検索日: 2017 年 5 月) 及び COMprehensive Protein Allergen Resource version 2019 (検索日: 2019 年 8 月)

配列であった。したがって、これらの ORF によりアレルギーが誘発される可能性は低いと考えられた。

また、既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、NCBI タンパク質データベース^bを用いて $E\text{-Value}<1$ を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は検出されなかった（参照 14）。

2. 遺伝子産物の組換え体内における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK の植物体、根、葉及び種子における導入したタンパク質の発現量を ELISA 法又は定量的ウェスタンブロット法によって分析した（参照 22）。この両手法で検出できなかった D6E(*Pp*)及び O3D(*Pi*)タンパク質は、膜タンパク質画分を精製・濃縮後、ウェスタンブロット法及び LC-MS/MS にて検出・同定された（参照 23）。

結果は表 3 に記載のとおりである。

表 3 セイヨウナタネ LBFLFK における各タンパク質の発現量

(単位は $\mu\text{g/g}$ 乾燥重)

分析組織 タンパク質	植物体 (ロゼッタ期、開花期)	葉 (成熟初期)	根 (成熟初期)	種子 (未成熟種子、成熟種子)
D12D(<i>Ps</i>)	<LOD (1.22, 1.11)	<LOD (8.93)	<LOD (0.15)	3.72, 0.83 (0.70, 0.13)
D6D(<i>Ot</i>)	<LOD (36.94, 33.70)	<LOD (33.77)	<LOD (18.18)	30.89, 41.80 (5.26, 3.92)
D6E(<i>Tp</i>)	<LOD (163.27, 148.95)	<LOD (149.26)	<LOD (40.18)	626.21, 915.86 (232.33, 242.83)
D6E(<i>Pp</i>)	<LOD (4.88, 4.45)	<LOD (8.91)	<LOD (2.40)	<LOD (2.78, 1.04)
D5D(<i>Tc</i>)	<LOD (39.40, 35.94)	<LOD (72.04)	<LOD (9.70)	<LOD, 1.53 (11.21, 0.52)
O3D(<i>Pir</i>)	<LOD (117.26, 106.97)	<LOD (142.93)	<LOD (224.44)	169.26, 561.61 (33.37, 37.37)
O3D(<i>Pi</i>)	<LOD (101.97, 186.06)	<LOD (310.76)	<LOD (50.19)	<LOD (7.26, 27.08)
D5E(<i>Ot</i>)	<LOD (4.99, 4.55)	<LOD (9.13)	<LOD (2.05)	<LOD, 15.36 (2.84, 1.06)
D4D(<i>Tc</i>)	<LOD (6.83, 24.83)	<LOD (24.89)	<LOD (6.70)	22.53, 10.88 (4.84, 3.80)
D4D(<i>Pi</i>)	<LOD (18.86, 25.80)	<LOD (17.24)	<LOD (13.92)	13.28, 4.03 (2.68, 2.00)
AHAS(<i>At</i>)	16.27, <LOD (1.88, 1.72)	7.41 (1.38)	0.49 (0.25)	14.12, <LOD (1.28, 0.64)

LOD：検出限界、()内の数字は検出限界値。

3. 遺伝子産物（タンパク質）が一日蛋白摂取量の有意な量を占めるか否かに関する事項

組換え由来のタンパク質は、セイヨウナタネの植物性油脂加工過程で除去及び分離されるため、植物油からは検出されない（参照 24）。したがって、一日タンパク質摂取量に影響を及ぼすとは考えられない。

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

(1) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性

セイヨウナタネ LBFLFK に導入された 7 つのデチュラーゼ及び 3 つのエロンガーゼ遺伝子の供与体である *Phytophthora sojae*, *O. tauri*, *Thalassiosira pseudonana*, *Physcomitrella patens*, *Thraustochytrium* sp., *Phytophthora infestans*, *Pythium irregulare* 及び *Pavlova lutheri* がアレルギーを誘発するという報告はない。*A. thaliana* のアレルギー誘発性に関しては第 5-1-(2) に記載のとおりである。

(2) 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性

7 つのデサチュラーゼ、3 つのエロンガーゼ及び AHAS(*Ah*)タンパク質に、アレルギー誘発性の報告はない^g。

(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

7 つのデサチュラーゼ及び 3 つのエロンガーゼは、膜タンパク質であり、当該分析に必要なタンパク質量を大腸菌にて発現させることが困難であった（参照 25）ため、セイヨウナタネ LBFLFK の未成熟種子胚の粗抽出物から精製した膜タンパク質画分を用いて分析を行った（参照 26）。導入したデサチュラーゼ、エロンガーゼ及び AHAS(*Ah*) タンパク質が含まれることを確認した膜タンパク質画分を用いて、人工胃液、人工腸液、又は加熱処理を行った後、各々のタンパク質抗体を用いたウェスタンブロット分析にて、バンドの消失で判定した。また、加熱による酵素活性の変化は、膜タンパク質画分中に存在する各酵素の基質をアイソトープラベルし、*in vitro* アッセイにて定量した（参照 27、28、29）。

結果は表 4 に記載のとおりである。

^g COMprehensive Protein Allergen Resource version 2019（検索日：2019年1月）

表4 セイヨウナタネ LBFLFK における各タンパク質の物理化学的処理に対する感受性

タンパク質	人工胃液に対する感受性 ウェスタンブロット分析	人工腸液に対する感受性 ウェスタンブロット分析	加熱に対する感受性	
			ウェスタンブロット分析	酵素活性 <i>in vitro</i> アッセイ
D12D(<i>Ps</i>)	0.5 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	50°Cで失活
D6D(<i>Ob</i>)	60 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	活性示さず
D6E(<i>Tp</i>)	60 分以上で残存	60 分以内に消失	70°Cで変性	50°Cで失活**
D6E(<i>Pp</i>)	—*	—*	—*	50°Cで失活**
D5D(<i>Tc</i>)	0.5 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	活性示さず
O3D(<i>Pir</i>)	0.5 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	活性示さず
O3D(<i>Pi</i>)	—*	—*	—*	活性示さず
D5E(<i>Ob</i>)	60 分以上で残存	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	50°Cで失活
D4D(<i>Tc</i>)	0.5 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	50°Cで失活**
D4D(<i>Pi</i>)	0.5 分以内に消失	0.5 分以内に消失	50°Cで変性	50°Cで失活**
AHAS(<i>Ad</i>)	0.5 分以内に消失	60 分以上で残存	70°Cで変性	50°Cで失活

* : 分析を行うことができなかった (第 6-2 に記載のとおり)。

** : D6E(*Tp*)及び D6E(*Pp*)並びに D4D(*Tc*)及び D4D(*Pi*)の酵素活性をそれぞれ区別できなかったため合わせて活性を測定した

- (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するタンパク質を含む。以下、アレルゲン等。) との構造相同性に関する事項
7 種のデサチュラーゼ、3 種のエロンガーゼ及び AHAS(*Ad*)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、アレルゲンデータベース^hを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列以上について 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは見出されなかった。また、連続する 8 アミノ酸配列と一致する配列も見出されなかった (参照 14)。

上記 (1) ~ (4) 及び前項 3 から総合的に判断し、7 種のデサチュラーゼ、3 種のエロンガーゼ及び AHAS(*Ad*)タンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考えられた。

5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK 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、3 世代のセイヨウナタネ LBFLFK についてゲノムを抽出してシーケンス解析を行った。その結果、Insert1 及び Insert2 が各世代ゲノムの同位置に挿入されており、挿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 19)。

^h Allergen online (FARRP version 16 検索日 : 2017 年 5 月) 及び COMprehensive Protein Allergen Resource version 2021 (検索日 : 2021 年 2 月)

6. 遺伝子産物（タンパク質）の代謝経路への影響に関する事項

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き（参照 30）、本系統では、オレイン酸を基に、複数の脂肪酸合成経路ネットワークにより EPA 及び DHA が産生されると考えられる。

セイヨウナタネ LBFLFK 及び宿主の種子に共通する脂肪酸のうち、オレイン酸及びリノール酸を除いた脂肪酸を比較した結果、それらの値は従来のセイヨウナタネの値の範囲内であった。セイヨウナタネ LBFLFK では非組換えセイヨウナタネと比較してオレイン酸の減少とリノール酸の増加が認められたが、それらの値は植物由来の食用油における含有量の範囲内であった（参照 31）。セイヨウナタネ LBFLFK において、EPA 及び DHA の合成過程で新たに産生された脂肪酸は、ヒトの食経験のある魚油中に含まれる脂肪酸であった。

また、セイヨウナタネ LBFLFK と非組換えセイヨウナタネの葉においては、統計学的有意差は認められなかった。

したがって、導入したデサチュラーゼ及びエロンガーゼは、脂肪酸組成及び脂肪酸量に意図した変化を及ぼすが、それ以外で宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

AHAS タンパク質は、植物及び細菌に普遍的に存在する分岐鎖アミノ酸合成において特異的に働く代謝酵素であり（参照 32、33）、最終生成物であるそれぞれのアミノ酸によってフィードバック抑制を受けることが知られている。AHAS(Ah)タンパク質は、この負のフィードバック抑制を維持しつつイミダゾリノン系除草剤への耐性が付与されている。セイヨウナタネ LBFLFK の種子における分岐鎖アミノ酸の含有量は、非組換えセイヨウナタネと比較して有意な差が認められていない又は商業品種の値の範囲内であった。

したがって、AHAS(Ah)タンパク質は、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

7. 宿主との差異に関する事項

米国のほ場で栽培されたセイヨウナタネ LBFLFK 及び宿主である非組換えセイヨウナタネについて、主要構成成分、アミノ酸組成、脂肪酸組成、ビタミン類、ミネラル類及び有害生理活性物質の分析を行った。セイヨウナタネ LBFLFK については、除草剤イミダゾリノンの散布を行った処理区及び散布を行わなかった無処理区を設定した。統計学的有意差については、非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区及び非組換えセイヨウナタネとセイヨウナタネ LBFLFK 処理区についてそれぞれ検討が行われた（参照 1）。

(1) 主要構成成分

水分、灰分、粗脂質、粗繊維、タンパク質、酸性デタージェント繊維及び中性デタージェント繊維の分析を行った。その結果、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった、又は認められた場合にも商業品種の範囲内ⁱであった。

ⁱ 同時に栽培した 6 系統の商業品種の測定値の最小値から最大値

(2) アミノ酸組成

アミノ酸 19 種類の分析を行った。その結果、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった、又は認められた場合にも商業品種の範囲内であった。

(3) 脂肪酸組成

① 種子中の脂肪酸含量

セイヨウナタネ LBFLFK 及び宿主の種子に共通する脂肪酸 18 種類の分析を行った結果、オレイン酸とリノール酸以外の脂肪酸について、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった、又は認められた場合にも商業品種の範囲内若しくは ILSI データベース (参照 34) の変動の範囲内であった。非組換えセイヨウナタネと比較して、含有量が統計学的に有意に低かったオレイン酸及び有意に高かったリノール酸においては、植物由来の食用油 (大豆油及び食用ひまわり油) の含有量の範囲であった。また、セイヨウナタネ LBFLFK には、EPA 及び DHA 以外に、従来のセイヨウナタネでは LOD 未満であった 15 種類の脂肪酸^kが新規に産生されていた。これらの脂肪酸は魚類及び海産物などの食品中に含まれていることが知られている (参照 35、36)。セイヨウナタネ LBFLFK の総トランス脂肪酸の平均値は、商業品種の変動範囲を超えていたが、肉、卵及び魚油に含まれるトランス脂肪酸量と比較すると少量であった。また、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。

② セイヨウナタネ LBFLFK 精製油の脂肪酸含量

従来品種の精製油と比較し、セイヨウナタネ LBFLFK 精製油は、総 ω -6 長鎖多価不飽和脂肪酸及び総 ω -3 長鎖多価不飽和脂肪酸の含有量が約 2 倍高く、総一価不飽和脂肪酸が減少していた。また、EPA 及び DHA 生合成における中間体として、複数の脂肪酸が新たに含有されており、EPA 及び DHA に変換されない脂肪酸は 4 種類 (C20:2n-9、C20:3n-9、C20:3n-3 及び C22:4n-3) であった。これらの脂肪酸は魚油及び *M. alpina* 由来油に含まれていることが確認されている (参照 37)。

セイヨウナタネ LBFLFK 精製油における各種脂肪酸の含有量について、文献調査を行い検討した結果、そのほとんどが食経験のある食品^lの範囲内であ

^j ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、cis-7-ヘキサデセン酸、マルガリン酸、マルガロレイン酸、ステアリン酸、cis-バクセン酸、オレイン酸、リノール酸、 α -リノレン酸、アラキジン酸、ゴンド酸、エイコサジエン酸、ベヘン酸、リグノセリン酸、ネルボン酸及び総トランス脂肪酸

^k 16:1-trans、18:1-trans、C18:2 n-9、 γ -リノレン酸、ステアリドン酸、C20:2 n-9、エイコサトリエン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、ミード酸、ビスホモステアリン酸、アラキドン酸、C22:4 n-3、アドレン酸、クルパノドン酸及びクルパノドン酸

^l 油サンプル (従来のカノーラ精製油、*M. alpina* 由来油)、魚油サンプル (藻類油、ニシン油、サケ油等)、魚類・頭足類サンプル (サバ、イカ、カタクチイワシ等)、乳製品サンプル (バター、チーズ等)、卵サンプル (一般的な卵、長鎖多価不飽和脂肪酸高含有卵)、食肉サンプル (牛肉、牛レバー、長鎖多価不飽和脂肪酸高含有鶏レバー等)

った。C18:2n-6、C18:2n-9、C18:3n-6、C20:2n-9、C20:4n-3 及び C22:4n-3 は、食経験のある食品の最大値を超えていたが、いずれもこれまでに食経験のある魚介類に含まれている脂肪酸であり、含有量も文献値の範囲だった（参照 38）。

③ 摂取量に基づくセイヨウナタネ LBFLFK に含まれる脂肪酸の安全性

日本人が一日に摂取している「植物性油脂 8.8 g/人/日」（ドレッシングの油を含む）^m を全て LBFLFK 精製油から摂取したと仮定した場合の EPA, DHA, ω -3 脂肪酸、 ω -6 長鎖多価不飽和脂肪酸（以下「 ω -6 脂肪酸」という。）及び総長鎖多価不飽和脂肪酸の最大摂取量を推計している。その結果、 ω -3 脂肪酸（EPA 及び DHA を含む。）は、国立健康・栄養研究所の報告書に記載されている安全性上特に問題のないと思われる量と同程度（参照 39）、 ω -6 脂肪酸は、日本人の食事摂取基準に定められた摂取不足回避のための目安量ⁿを超えたが、 ω -3 脂肪酸、 ω -6 脂肪酸及び総長鎖多価不飽和脂肪酸の推定最大摂取量はいずれも FAO が定めた参考一日摂取量^oの範囲内であると申請者により考察されている。

また、ラットを用いた *in vivo* 試験においても毒性影響は認められなかった。

④ セイヨウナタネ LBFLFK 葉における脂肪酸含量

一般に葉の脂肪酸含量は低く、多くの脂肪酸は定量限界値未満であったが、統計解析が可能であった脂肪酸含量に、セイヨウナタネ LBFLFK と非組換えセイヨウナタネの間に統計学的有意差は認められなかった。

(4) ビタミン類

ビタミン類 5 種類の分析を行った。その結果、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった又は認められた場合にも商業品種の範囲内であった。

(5) ミネラル類

ミネラル 9 種類の分析を行った。その結果、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった又は認められた場合にも商業品種の範囲内であった。

^m 国民健康・栄養調査報告（厚生労働省, 2020）

ⁿ 日本人の食事摂取基準において、現在の日本人の摂取量の中央値に基づいて設定された、 ω -3 脂肪酸及び ω -6 脂肪酸の摂取不足回避のための目安量（厚生労働省, 2019）。 ω -3 脂肪酸（EPA 及び DHA を含む。）及び ω -6 脂肪酸に対して、0.7~2.2 及び 4~13（g/人/日）。

^o AMDR（acceptable macronutrient distribution range）：慢性疾患のリスク低減に関連するエネルギー源の摂取範囲。AMDR を日本人成人で換算した値は、 ω -3 脂肪酸（EPA 及び DHA を含む。）、 ω -6 脂肪酸及び総長鎖多価不飽和脂肪酸に対して、1.6~6.2、7.8~28 及び 19~34（g/人/日）。

(6) 有害生理活性物質

グルコシノレート類、フィチン酸、シナピン、タンニンの分析を行った。その結果、非組換えセイヨウナタネ及びセイヨウナタネ LBFLFK 無処理区とセイヨウナタネ LBFLFK 処理区との間に統計学的有意差は認められなかった又は認められた場合にも商業品種の範囲内であった。

8. 諸外国における認可、食用等に関する事項

米国においては、米国農務省（USDA）に対して無規制裁培の申請が行われ、2019年8月に承認され、米国食品医薬品庁（FDA）に対して食品及び飼料としての安全性審査の申請が行われ、2022年3月に承認された。

カナダにおいては、カナダ保健省（Health Canada）に対して食品としての安全性審査の申請及びカナダ食品検査庁（CFIA）に対して飼料・環境としての安全性審査の申請が行われ、2019年12月に承認された。

韓国においては、2018年9月に韓国食品医薬安全省（MFDS）に対して食品としての安全性審査の申請及び韓国農村振興庁（RDA）に対して飼料・環境としての安全性審査の申請が行われた。

9. 栽培方法に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK の栽培方法は、イミダゾリノン系除草剤が散布可能である点を除き、従来のセイヨウナタネと同じである。

10. 種子の製法及び管理方法に関する事項

セイヨウナタネ LBFLFK の種子の製法及び管理方法は、従来のセイヨウナタネと同じである。

第7. 第2から第6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2から第6までの事項により安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「長鎖多価不飽和脂肪酸含有及びイミダゾリノン系除草剤耐性セイヨウナタネ LBFLFK」については、「遺伝子組換え食品（種子植物）の安全性評価基準」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

なお、本系統は、宿主の代謝系における一部の代謝産物が利用され、宿主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ていることから、セイヨウナタネ LBFLFK を用いた掛け合わせ品種は、「遺伝子組換え植物の掛け合わせについての安全性評価の考え方」（平成16年1月29日食品安全委員会決定）に従い、食品健康影響評価を実施することとする。

<参照>

1. Agronomic and Phenotypic Characteristics of EPA+DHA Canola Field-grown in the United States during 2015 and Nutrient Composition of the Harvested Seed (社内文書)
2. Codex. SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources (in Fats, Oils and Related Products), vol. 8, 2015
3. OECD. ENV/JM/MONO(2011)55; Revised Consensus Document on Compositional Considerations for New Varieties of LOW ERUCIC ACID RAPESEED (CANOLA) Key Food and Feed Nutrients, Anti-nutrients and Toxicants, 2011a
4. OGTR. The Biology of *Brassica napus* L. (canola), 2011
5. Jiang L., Eriksson J., Lage S., Jonasson S., Shams S., Mehine M., 他: Diatoms: a novel source for the neurotoxin BMAA in aquatic environments. PLoS One 2014; 9: e84578
6. Berge J. P., Barnathan G.: Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects. Adv Biochem Eng Biotechnol 2005; 96: 49-125
7. Kliebenstein D. J., Kroymann J., Brown P., Figuth A., Pedersen D., Gershenzon J., 他: Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. Plant physiology 2001; 126: 811-25
8. Chardin H., Mayer C., Senechal H., Wal J. M., Poncet P., Desvaux F. X., 他: Lipid transfer protein 1 is a possible allergen in Arabidopsis thaliana. Int Arch Allergy Immunol 2003; 131: 85-90
9. Yates B., De Soya A., Harkawat R., Stenton C.: Occupational asthma caused by Arabidopsis thaliana: a case of laboratory plant allergy. Eur Respir J 2008; 32: 1111-2
10. Vector Construction and Transformation for the Generation of the EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
11. Yilmaz J. L., Lim Z. L., Beganovic M., Breazeale S., Andre C., Stymne S., 他: Determination of Substrate Preferences for Desaturases and Elongases for Production of Docosahexaenoic Acid from Oleic Acid in Engineered Canola. Lipids 2017; 52: 207-22
12. Stidham Mark A.; , Singh Bijay K.; . Chapter6; Imidazolinone-Acetoxyacid Synthase Interactions. Shaner Dale L.;, O'Connor Susan L.; 編, The Imidazolinone Herbicides. CRC Press 1991
13. Newhouse K. E., Smith W. A., Starrett M. A., Schaefer T. J., Singh B. K.: Tolerance to imidazolinone herbicides in wheat. Plant physiology 1992; 100: 882-86
14. Bioinformatic Analysis of EPA+DHA Canola Event LBFLFK for Similarity to Allergens and Toxins (社内文書)
15. EPA + DHA canola event LBFLFK newly expressed membrane proteins: Bioinformatics assessment of amino acid sequence identity to known allergens and toxins (社内文書)
16. Bioinformatics assessment of amino acid sequence identity to known allergens and toxins (社内文書)
17. Regarding E-values for Regulatory Research Report No. 201703-010R -

- Alignment of Elongases and Desaturases Contained in LBFLFK with Proteins in Food or Feed (社内文書)
18. Evaluation of sequence similarity of proteins newly expressed in LBFLFK to proteins in Food or Feed species having a history of safe consumption (社内文書)
 19. Molecular Characterization of the EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
 20. Bioinformatic Analysis of Open Reading Frames Created as a Result of the Genetic Modification in EPA+DHA Canola Event LBFLFK and their Similarity to Known Toxins and Allergens; and Bioinformatic Analysis to Identify Interruptions of Known Genes at the Insertion Sites (社内文書)
 21. Bioinformatics analysis of the LBFLFK *Brassica napus* insertion loci (社内文書)
 22. Determination of the Levels of Newly Expressed Proteins in EPA+DHA Canola Field-grown Plants in the United States during 2015 (社内文書)
 23. Detection of O3D(*Pi*) and D6E(*Pp*) in Immature Seed of Canola Event LBFLFK (社内文書)
 24. Sample Analysis: Levels of Newly Expressed Proteins in Processed Fractions of EPA+DHA Canola from 2016 Field Production (社内文書)
 25. Bushey D. F., Bannon G. A., Delaney B. F., Graser G., Hefford M., Jiang X., 他: Characteristics and safety assessment of intractable proteins in genetically modified crops. Regul Toxicol Pharmacol 2014; 69: 154-70
 26. Production of Plant-Produced Proteins (PPP) from LBFLFK and Kumily Immature Seeds (社内文書)
 27. Digestive Fate of Newly Expressed Proteins Produced in Immature Seed of EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
 28. Heat Stability of Newly Expressed Proteins Produced in Immature Seed of EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
 29. Characterization of Plant-Produced Proteins from Immature Seed of EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
 30. Leonard Amanda E., Pereira Suzette L., Sprecher Howard, Huang Yung-Sheng: Elongation of long-chain fatty acids. Progress in Lipid Research 2004; 43: 36-54
 31. 公益財団法人日本油脂検査協会. 食用植物油脂の脂肪酸組成 3-3.最近1ヶ年間の脂肪酸組成, 2017
 32. Mazur B. J., Chui C. F., Smith J. K.: Isolation and characterization of plant genes coding for acetolactate synthase, the target enzyme for two classes of herbicides. Plant physiology 1987; 85: 1110-17
 33. Delfourne Evelyne , Bastide Jean , Badon Robert , Rachon Alain , Genix Pierre Specificity of plant acetohydroxyacid synthase: formation of products and inhibition by herbicides. Plant Physiol Biochem 1994; 32: 473-77
 34. ILSI. Canola (Search Results), 2019
 35. Kitessa S. M., Abeywardena M., Wijesundera C., Nichols P. D.: DHA-containing oilseed: a timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils.

- Nutrients 2014; 6: 2035-58
36. FAO. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation., 2010
 37. Andre C., Buesen R., Riffle B., Wandelt C., Sottosanto J. B., Marxfeld H., 他: Safety assessment of EPA+DHA canola oil by fatty acid profile comparison to various edible oils and fat-containing foods and a 28-day repeated dose toxicity study in rats。 Food Chem Toxicol 2019; 124: 168-81
 38. History of Safe Use for the Fatty Acids in EPA+DHA Canola Event LBFLFK (社内文書)
 39. 斎藤衛郎: *n*-3 系多価不飽和脂肪酸の生理的有効性と栄養学的側面から見た安全性評価。 栄養学雑誌 2001; 59: 1-18