

低リグニンアルファルファ (*CCOMT, Medicago sativa L.*)
(KK179, OECD UI: MON-00179-5) 申請書等の概要

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 第一種使用規程承認申請書 | 1 |
| 生物多様性影響評価書 | 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 |
| (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 |
| ① 和名、英名及び学名 | 3 |
| ② 宿主の品種名又は系統名 | 3 |
| ③ 国内及び国外の自然環境における自生地域 | 3 |
| (2) 使用等の歴史及び現状 | 5 |
| ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史 | 5 |
| ② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途 | 6 |
| (3) 生理学的及び生態学的特性 | 7 |
| イ 基本的特性 | 7 |
| ロ 生息又は生育可能な環境の条件 | 8 |
| ハ 捕食性又は寄生性 | 9 |
| ニ 繁殖又は増殖の様式 | 9 |
| ① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命 | 9 |
| 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 | 9 |
| 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じる特性を有する場合はその程度 | 9 |
| ④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命 | 12 |
| ホ 病原性 | 15 |
| ヘ 有害物質の産生性 | 15 |
| ト その他の情報 | 16 |
| 2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報 | 16 |
| (1) 供与核酸に関する情報 | 18 |
| イ 構成及び構成要素の由来 | 18 |
| ロ 構成要素の機能 | 18 |
| 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 | 18 |
| ② 目的遺伝子及び選抜マーカーの発現により産生される蛋白質の機 能及び当該蛋白質がアレルギー性を有することが明らかとなっ | |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------|----|
| 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 | 46 |
| a | 形態及び生育の特性 | 46 |
| b | 生育初期における低温又は高温耐性 | 47 |
| c | 成体の越冬性 | 48 |
| d | 花粉の稔性及びサイズ | 48 |
| e | 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率 | 48 |
| f | 交雑率 | 49 |
| g | 有害物質の産生性 | 49 |
| h | 病害虫に対する抵抗性 | 50 |
| 3 | 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報 | 50 |
| (1) | 使用等の内容 | 50 |
| (2) | 使用等の方法 | 50 |
| (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 | 50 |
| (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 | 51 |
| (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 | 51 |
| (6) | 国外における使用等に関する情報 | 52 |
| 第二 | 項目ごとの生物多様性影響の評価 | 53 |
| 1 | 競合における優位性 | 53 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 53 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価 | 55 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価 | 55 |
| (4) | 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 55 |
| 2 | 有害物質の産生性 | 56 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 56 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価 | 57 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価 | 57 |
| (4) | 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 57 |
| 3 | 交雑性 | 57 |
| (1) | 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定 | 57 |
| (2) | 影響の具体的内容の評価 | 58 |
| (3) | 影響の生じやすさの評価 | 58 |
| (4) | 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断 | 58 |

| | | |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4 | その他の性質 | 58 |
| 第三 | 生物多様性影響の総合的評価 | 59 |
| | 参考文献 | 62 |
| | 緊急措置計画書 | 76 |
| | 低リグニンアルファルファ(<i>CCOMT, Medicago sativa</i> L) (KK179, OECD UI: MON-00179-5)の別添資料リスト | 78 |

本評価書に掲載されている情報を無断で複製・転載することを禁ずる。

第一種使用規程承認申請書

平成 26 年 2 月 24 日

5 農林水産大臣 林 芳正 殿
環境大臣 石原 伸晃 殿

10 氏名 日本モンサント株式会社
申請者 代表取締役社長 山根 精一郎 印
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

15 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 | 低リグニンアルファルファ (<i>CCOMT, Medicago sativa</i> L.) (KK179, OECD UI: MON-00179-5) |
| 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

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：ムラサキウマゴヤシ (別名：アルファルファ)

英名：alfalfa, lucerne

学名：*Medicago sativa* 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は従来品種 R2336 系統である。R2336 系統は商業栽培品種ではなく、栄養繁殖 (挿し芽) によって均一な遺伝子型を保持している育種母本群の 1 系統である。

20

③ 国内及び国外の自然環境における自生地域

25

アルファルファはマメ科 *Medicago* 属に属する。アルファルファの起源はイランであると考えられているが、起源に関連する種は中央アジアからシベリアに至る範囲で認められる (OECD, 2005)。農業の普及につれ、アルファルファは地中海地域、北アフリカ、中東、ヨーロッパのほとんど、シベリア、北インド及び中国で自生するようになった (Michaud et al., 1988; Quiros and Bauchan, 1988)。米国では 1850 年よりアルファルファが牧草として移入され、大規模な栽培が行われており、栽培ほ場からの逃げ出しやほ場内において牧草の収穫後に再生した個体や種子生産ほ場において収穫を逃れた種子から発芽した個体が存在する。USDA-NRCS によると、米国の全 50 州においてアルファルファの自生が確認されている (USDA-APHIS, 2010)。しかしながら、米国においてアルファルファは雑草とみなされておらず、有害雑草リストにはアルファルファの記載はない (USDA-AMS, 2011)。

35

わが国では、アルファルファは明治初年に牧草として導入され、全国に

5 広く野生化したといわれている (大橋, 1999)。実際にその生育が観察された
地域としては、北海道旭川市、秋田県、静岡県、三重県、兵庫県神戸市、徳
島県、佐賀県、大分県、岡山県が挙げられる (浅沼ら, 1987; 清水ら, 2001)。
北海道では、アルファルファは定着しており、植生などへの影響、競合・駆
10 逐の可能性、在来生物への病気・寄生虫の媒介等の生態系への影響が報告又
は懸念されている外来種として報告されている (北海道, 2010)。また、静岡
県では、1975 年ごろから宅地造成及び道路の新設などの大規模工事にと
もな、法面緑化の目的で盛んに外国の牧草が使われており、1990 年代には
緑化に使用される外来植物の種子やそれらに混入する種子などからの外来
15 植物の広がりが問題とされてきた (杉野, 2008)。しかし、静岡県で観察され
たアルファルファは、個体数は少なく、侵入状況が不安定で今後の広がりも
未定である「偶出逸出植物」と分類されている (杉野, 2008)。三重県では、
港の埠頭、港の緑地公園及び埋立地、紡績工場のごみ捨て場並びに茶畑、果
樹園及び苗木園のための肥料用ロックス (紡績用の原毛に付着したごみや
15 羊の糞・脂肪) の格納庫付近などでアルファルファの自生が観察されている
が、その分布域は局地的で生育量は少ない帰化植物として分類されている
(太田, 1999; 太田, 2010)。

また同県鈴鹿市の帰化植物の調査では、1951 年から 1998 年でアルファル
ファは個体数が減少して分布がせばまったと報告されている (太田, 1999)。
20 神戸港周辺では、フェリーセンター、食品工場及び製粉工場などがある埋立
地の幹線道路の中央分離帯、また港の臨港線周辺で生育が観察され、港に限
った調査ではその分布域が広範囲だが分布量は少ない帰化植物として分類
されている(水田, 1998)。一方で、港周辺以外での生育は観察されていない
(横山, 1991)。大分県では、低地の路傍や空き地でアルファルファの生育が
25 確認されているが、その分布の量は少ない帰化植物として分類されている
(大分県植物誌刊行会, 1989)。また岡山県においては、詳細な生育地域は記
載されていないものの、その分布域は局所的で生育量は少ない種として分類
されている (浅沼ら, 1987)。

30 また、わが国においてアルファルファは、日本固有の在来種を駆逐して
生物多様性に影響を及ぼす外来種タンポポ種群 (*Taraxacum* spp.) やセイタ
カアワダチソウ (*Solidago altissima*) などのような侵略的外来種としては掲
載されていない (日本生態学会(編), 2002)。

35 以上のことより、アルファルファの生育は日本各地で報告されており、北
海道では定着しているという報告があるものの、分布域は局所的で生育量は
少ないとされている報告が多いことから、その生育地は散発的であり、各集

団のサイズもそれほど大きなものではないと考えられた。

(2) 使用等の歴史及び現状

5 ① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

10 アルファルファは、蛋白質含量が高く、カルシウムなどのミネラルも豊富で、牛の嗜好性も高いことから、「牧草の女王」と呼ばれている。また、最も栽培の歴史が古い牧草であり、紀元前 1400～1200 年のトルコの遺跡で家畜の飼料として利用されていたことが発見されており、紀元前 400 年にギリシヤに、紀元前 200 年にローマに伝播し、中国へは紀元前 126 年にロシアのトルキスタン地方から伝播したと考えられている。その後、18 世紀までにヨーロッパや北アフリカへと普及するとともに、18 世紀以降にヨーロッパから南北アメリカ、オーストラリア及びニュージーランドへと伝播した。

15 現在最も栽培の多い北アメリカで栽培が本格化したのは、19 世紀の後半になってからである。生育に適した条件である、カリフォルニア周辺を中心とする西海岸地域で栽培が拡大した。その後、東部への拡大には、耐寒性、耐湿性、酸性土壌への適応性などの改良に時間を要したが、1958 年には中部～東部での栽培面積が西海岸地域を上回るまでに拡大した (松村, 2010)。

20 わが国へは享保～文久年間 (1716～1861) に中国から入ったといわれるが、実質的な栽培は明治 7 年 (1874) にアメリカから北海道に導入されたのが始まりで、普及したのは戦後 (1945～) のことである (上野, 1987; 鈴木, 1992)。

25 アルファルファ (*M. sativa* L.) の属する *Medicago* 属は 80 以上の種によって構成され、他殖性で多年生の種と自殖性で一年生の種が存在する。また、遺伝的には異数性の種と倍数体の種が存在する (Small and Jomphe, 1989; Steele et al., 2010)。

30 アルファルファは多年生の種で、複数の亜種で構成されている。これらの亜種は同じ核型を有し、それぞれで容易に交雑が可能である (Quiros and Bauchan, 1988)。*M. sativa* L. に属する亜種としては亜種 *sativa*、亜種 *falcata*、亜種 *coerulea* 及び亜種 *glomerata* がある (Michaud et al., 1988; Quiros and Bauchan, 1988; USDA-GRIN, 2007)。加えて、上述した亜種の交配により生じた交配種である亜種×*varia*、亜種×*hemicycla* 及び亜種×*tunetana* も *M. sativa* L. に属している (Quiros and Bauchan, 1988)。亜種の分類基準は花色、莢の形態による。世界中で広く栽培されるアルファルファはほとんどが 4 倍体の *M.*

sativa L. subsp. *sativa* (ムラサキウマゴヤシ、紫花アルファルファ) に分類される。黄花種である2倍体若しくは4倍体の *M. sativa* L. subsp. *falcata* L. (コガネウマゴヤシ、黄花アルファルファ) は耐寒性、耐干性及び耐病性の遺伝資源として *M. sativa* L. subsp. *sativa* の品種改良に利用されている (Quiros and Bauchan, 1988)。

5

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

アルファルファは世界中で広く栽培されており、その栽培面積は3,200万ヘクタールである。地域別では、北米で1,190万ヘクタール(41%)、ヨーロッパで710万ヘクタール(25%)、南米で700万ヘクタール(23%)、アジアで220万ヘクタール(8%)と続き、以下アフリカ(2%)、オセアニア(1%)となっている (FAO, 2009)。

10

米国のほぼ全ての州で栽培されており、その栽培方法は気候、降水量、土壌の肥沃度、雑草及び病害、播種時期、用途等により大きく異なる (USDA, 2007; USDA-NASS, 2010)。

15

現在の北海道での栽培面積は約12,000ha程度となっている。本州以南での栽培は、酪農家1戸当たりの飼料生産面積が少ないこともあって大きくは進展せず、種子の需要量から推して合計2,000ha程度とみられる (松村, 2010)。

20

わが国でのアルファルファの慣行栽培法は以下のとおりである。播種は秋播きと春播きがあり、寒冷地である北海道では春播き、暖地である府県では秋播きである。播種量は一般的に単播で1.5~2.5kg/10a、イネ科牧草との混播で1.0~1.5kg/10aである。施肥は10aあたり窒素5kg、リン酸20~30kg、カリ10kgを基肥としている。アルファルファの栽培においては雑草対策が大きな問題であり、雑草の少ない畑を用い、前作物のうちから除草を徹底することが必要である。刈り取り回数は北海道では年2~3回、関東以西では4~8回である。刈り取りは従来開花10%期前とされていたが、最近はそれよりも早く刈取る事が推奨されている (鈴木, 1992)。

25

30

2012年のわが国における飼料用栽培種子の輸入量は約69トンであり、その内訳は、米国が約35.5トン、イタリアが約33.0トン、フランスが約0.8トンとなっている (財務省, 2013)。また、2012年のわが国におけるアルファルファミール及びペレットの輸入量は約10.7万トンであり、その内訳はカナダが約5.8万トン、フランスが約1.8万トン、イタリアが約1.2万トン、米国が約1.2万トン、スペインが約0.7万トン、オランダが約0.1万トン、

35

となっている (財務省, 2013)。

アルファルファの茎葉は蛋白質、ビタミン及びカルシウムに富み、乳牛用の飼料として乾草、キューブ、ミール (乾草を粉砕したもの) の形で利用されている (亀岡, 1998)。

また、アルファルファは、主要な用途ではないが、食料、栄養補助食品及び薬草療法としてヒトに利用されてきた (Bora and Sharma, 2011)。ヒトによる消費量の 95%以上が、スプラウト (発芽もやし) と呼ばれるアルファルファの幼苗の形である。北米では、アルファルファやその他の植物種のスプラウトが食品雑貨店と自然・健康食品専門店で入手可能である。これらの食品のヒトによる消費量は 1 回に 8~20 g の範囲のごく少量と想定される (OECD, 2005)。

(3) 生理学的及び生態学的特性

イ 基本的特性

アルファルファは種子繁殖する多年生の双子葉作物であり、葉は茎に互生し、多くの場合 3 小葉からなる。複葉も一般的であり、最大で 11 葉のものも存在する (Teuber and Brick, 1988)。草丈は平均で 50~150cm に達し、茎は多い場合で 50 本以上生じ、これらは株元の株冠 (crown) から直立する (Fick et al., 1988)。

栽培品種により休眠性や越冬性はさまざまである。株の休眠性は短日・低温条件下でエネルギーが栄養成長へ向かうかわりに株冠や根へ蓄えられることによりもたらされる (Sheaffer et al., 1988)。

休眠性の高い栽培品種は、秋の短日・低温条件下で生育が速やかに休止する。一方で休眠性を持たない栽培品種は秋でも成長を続ける。耐寒性は低温耐性と関連しており、植物の越冬性を示唆するものである。秋期における高い休眠性と耐寒性には強い相関がある (Smith, 1961)。近年開発された品種では休眠性と耐寒性が分離されており、短日・低温条件下でも生長することが可能であり、かつ耐寒性を持っているため高い収量が得られている (Weishaar et al., 2005)。なお、米国及びカナダにおいては、アルファルファの商業栽培品種は秋季休眠性 (fall dormancy) 及び耐寒性によって評価されている。秋季休眠性は 1 から 11 までの 11 段階で評価しており、1 は秋季休眠性が強いことを示し、11 は秋季休眠性が弱いことを示す。耐寒性は 1 から 6

までの 6 段階で評価しており、1 は優れた耐寒性を示し、6 は耐寒性がないことを示す (Putnam et al., 2007; Hancock et al., 2009)。

5 アルファルファは 4 倍体であり、8 つの染色体を 4 セット持っている (2n=4x=32)。ほとんどのアルファルファは自家不和合性であり、近交弱勢及び雑種強勢を示す (Cooper and Brink, 1940; Wilsie, 1958; Hill, 1983)。商業品種の種子はハチを花粉媒介昆虫として必要とする形質を持つ複数の親系統を自然交配することにより作られる。この方法により作出された品種は合成品種と呼ばれる。合成品種は、複数の遺伝的優良系統の多交雑により作出しているため、合成品種内の個体は異なる遺伝子型を持ち、多様な表現形質を示し、一般的に栽培種は遺伝的に固定されていない (Rumbaught et al., 1988)。

ロ 生息又は生育可能な環境の条件

15 現在、アルファルファの分布・栽培は亜熱帯から温帯地域にほぼ限定され、北緯 30° ~60°、南緯 20° ~45° の範囲、平均気温が冬の等温線で-12 ~10°C、夏は 16°C~27°C の範囲である (鈴木, 1992)。アルファルファ主要栽培地帯の降水量は 250~1,000mm の範囲にある。わが国は緯度・気温から見てアルファルファの分布範囲に入るが、わが国の平均降水量は 1,000~
20 2,000mm であり、世界的にみてアルファルファの栽培地帯ではわが国のような雨の多い地帯は見当たらない (鈴木, 1992)。アルファルファは深根性の作物であるため、湿地など停滞水のあるところには適さず、排水の良い土地を好む (鈴木, 1992)。また、アルファルファは雑草との競合に弱いため、雑草が
25 少ない土地を選択する必要がある。牧草の中では最も肥沃な土壌を好み、最適土壌 pH は中性に近い 6.5~7.0 であり、酸性土壌を嫌う (上野, 1987; 鈴木, 1992)。播種適期は、春播きの場合は旬間平均気温 9~11°C で、秋播きの場合は 20°C 前後とされる (鈴木, 1992)。

アルファルファの幼苗は雑草との競合に対して極めて影響を受けやすく、幼苗の生長及び発育に障害をきたす。初期の生長段階における雑草圧は幼苗
30 を弱体化させ、枯死させることさえある (Canevari et al., 2008)。初期生育の定着期間は雑草防除にとって重要な時期だが、栽培 2 年目以降でも雑草が増えると収量が減少する (Fischer et al., 1988; Dillehay et al., 2011)。

また、アルファルファは降水量が極めて少ない地域を起源とすることから耐干性は高いが耐湿性が低く、かつ酸性土壌を嫌うことから、わが国の湿
35 潤気候と酸性土壌には適さない (上野, 1987; 鈴木, 1992; 廣井, 2004)。

したがって、わが国において、アルファルファを効率的に生産するため

には、適切なほ場選択、水はけの良い苗床の準備、適切な土壌改良及び施肥、適切な品種選択等の方法を用いた上で、長期的な雑草防除が必要となる (鈴木, 1992 ; Canevari et al., 2008; UC-IPM, 2010)。

5 ハ 捕食性又は寄生性

—

ニ 繁殖又は増殖の様式

10

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

15

アルファルファの莢は 2~5 回渦巻状に巻いており、一莢あたり 3~5 粒の種子をもつ (Viands et al., 1988)。莢は硬く、裂莢性の程度は低い (Quiros and Bauchan, 1988; Viands et al., 1988)。自然環境下におけるアルファルファの種子散布は限定的である。アルファルファの種子は密度が高く、種皮はなめらかであるため風で散布されることはない (Van Deynze et al., 2008)。成熟種子を含むアルファルファが飼料として動物に給与されることにより種子散布される可能性はあるが、サイロでの貯蔵や動物による消化により腐敗するため種子が拡散される可能性は低下する (Van Deynze et al., 2008)。

20

成熟種子にはしばしば水分吸収を防ぐ不浸透性の種皮が形成され、その場合は土壌中で数年間生存可能となる (Bass et al., 1988)。

25

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

30

アルファルファには、ほふく茎・地下茎はほとんど見られず、これらによって株が増える事はない (鈴木, 1992)。アルファルファは株の越冬性を担う株冠 (crown)を早ければ発芽後 1 週間程度で形成する (Undersander et al., 2011)。株冠や根に蓄えられた炭水化物が越冬や、翌年の新たな分茎 (shoot)の再生に利用される (Sheaffer et al., 1988)。

35

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じる特性を有する場合はその程度

アルファルファは自家不和合性であり、受精及び結実には他殖による交

配が必要である。自家受粉では、花粉の発芽率が低下し、正常な花粉管伸長が起こらず、胚の生育停止により他家受粉と比較して種子数が減少する (Cooper and Brink, 1940; Campbell and He, 1997)。

5 アルファルファと交雑可能であると考えられる近縁種は、多年生の *Medicago* 属の *M. prostrata*, *M. cancellata* 及び *M. saxatilis* の3種である (Lesins, 1961; Lesins, 1962; Lesins, 1970; Quiros and Bauchan, 1988)。しかし、それら3種のいずれもわが国には自生していない (大橋, 1999; 大橋, 2003)。

10 わが国に自生する *Medicago* 属はすべて帰化植物であり、以下の8種の自生が報告されている (表 1, p10)。

これらの8種はいずれも一年生であるが、コメツブウマゴヤシに関しては文献によって一年生又は多年生との記載もある (Small and Jomphe, 1989)。

15 なお、この中で明治以前に持ちこまれた種はウマゴヤシ及びコメツブウマゴヤシの2種であり、その他6種は明治以降に持ち込まれた。

表 1 わが国に自生する *Medicago* 属 (大橋, 1999; 大橋, 2003)

| 種名 (学名) | 主な自生地、採集地 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| ウマゴヤシ (<i>M. polymorpha</i>) | 全国の海岸や平地の道端に生育 |
| キレハウマゴヤシ (<i>M. laciniata</i> L. 別名 <i>M. polymorpha</i> L. var. <i>laciniata</i>) | 平地の空き地に生える |
| トゲミノウマゴヤシ (<i>M. ciliaris</i> L. 別名 <i>M. polymorpha</i> L. var. <i>ciliaris</i> L.) | 神奈川県藤沢市で採集された |
| ウズマキウマゴヤシ (<i>M. orbicularis</i> 別名 <i>M. polymorpha</i> L. var. <i>orbicularis</i> L.) | 海岸近くの空き地に生える |
| コメツブウマゴヤシ (<i>M. lupulina</i>) | 全国の海岸や平地の道端、芝生に生育する |
| モンツキウマゴヤシ (<i>M. arabica</i>) | 西日本に稀に見られる |
| コウマゴヤシ (<i>M. minima</i>) | ややまれに本州に生育 |
| タルウマゴヤシ (<i>M. truncatula</i>) | 1995年に始めてわが国で確認された |

20 *Medicago* 属の多年生の種と一年生の種との間には、交雑を妨げる大きな生物学的障壁が存在しており、多年生の *Medicago* 属のアルファルファと一年生の *Medicago* 属との間で自然交雑が起きないことは、多くの研究により

裏付けられている。

まず、一年生の *Medicago* 属が自殖性であるのに対し、多年生の *Medicago* 属は他殖性で、かつ受粉の際にはハチなどの花粉媒介昆虫を必要とする。

5 また、アルファルファに関しては、倍数性及び核型が一年生の *Medicago* 属と違うことが交雑の妨げになっている。アルファルファは 4 倍体で、32 本の染色体を持っている。しかし、一年生の *Medicago* 属の中でカギウソウや *M. rugosa* は 4 倍体で、30 本の染色体を持ち、その他の一年生の *Medicago* 属は全て 2 倍体で、16 又は 14 本の染色体を持っている (Fryer, 1930; Fridriksson and Bolton, 1963; Bauchan and J. H. Elgin, 1984; McCoy and Bingham, 10 1988; Quiros and Bauchan, 1988)。

さらに、*Medicago* 属の多年生の種と一年生の種との間の交雑では、受精前後に異常が起こる。一年生の *Medicago* 属の *M. arabica*、*M. orbicularis* 及び *M. lupulina* を用いて、アルファルファとの交雑が試みられたが、受精は観察されなかった (Oldemeyer, 1956; Fridriksson and Bolton, 1963)。アルファルファとウマゴヤシの間の交雑については、アルファルファの花粉がウマゴヤシの柱頭に受粉しても花粉管伸長がみられないことが確認されている(水上ら, 2005)。カギウソウ及び *M. disciformis* の花粉は、アルファルファの柱頭において、花粉管伸長異常を示した (Sangduen et al., 1983b)。

アルファルファと *M. rigidula* 又は *M. blanchiana* の間の交雑では、受精後に胚の生育停止が観察され (Fridriksson and Bolton, 1963)、アルファルファとカギウソウの交雑実験でも受精後の種子形成の失敗が観察されている (Oldemeyer, 1956; Fridriksson and Bolton, 1963; Sangduen et al., 1983a; Sangduen et al., 1983b)。これら胚の生育停止は、内胚乳胚及び胚の生育の間に不均衡が生じ、胚への栄養分の供給が限られることにより引き起こされる (Cooper and Brink, 1940; Fridriksson and Bolton, 1963; Sangduen et al., 1983a)。

多年生のアルファルファと一年生の *Medicago* 属の交配の唯一の成功例として、アルファルファとカギウソウとの交配が報告されている。しかしながら、その雑種は不稔であり、得られた交雑種の染色体数は 30 本から 64 本と不安定であった。 (Sangduen et al., 1982; Sangduen et al., 1983b)。

また、アルファルファとコメツブウマゴヤシの交雑に関して、交雑種を得たとする 2 つの報告がある (Southworth, 1928; Fryer, 1930)。このうち、Fryer は、試験で得られたと考えられていた交雑種子は、実際は各種が自家受粉してできた種子の可能性があることを認めていた (Fryer, 1930)。その後の研究においてアルファルファとコメツブウマゴヤシの交雑が試みられ、全てが失敗に終わっている (Oldemeyer, 1956; Fridriksson and Bolton, 1963)。最近の知

見として、アイソザイム分析、プラスチド及び染色体ゲノム解析により、アルファルファとコメツブウマゴヤシの間には遺伝的類似性がないことが確認されている (Steele et al., 2010; Chandra et al., 2011)。これらのことから、アルファルファとコメツブウマゴヤシの交雑種を得たとする 2 つの試験結果は否定され、アルファルファとコメツブウマゴヤシの間で交雑は起こらないと考えられる。

以上のことから、わが国において、アルファルファの近縁種として 8 種の *Medicago* 属の自生が確認されているが、このうち 7 種は一年生の *Medicago* 属であるために多年生のアルファルファと交雑するとは考えられず、これ以外の 1 種 (コメツブウマゴヤシ) についてもアルファルファとの交雑が生じたとの結論には至っていない。よってこれら 8 種の *Medicago* 属とアルファルファが自然条件下において交雑することはないと考えられた。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

花粉は球状で直径約 32 μ m であり、1 花あたり約 2,500 粒の花粉が産生される (Viands et al., 1988)。花の中の花粉の寿命はおよそ 2 週間である (Hanson, 1961; Viands et al., 1988)。

アルファルファは自家不和合性を示す他殖性植物であり、主にハナバチ、ハキリバチやミツバチ等を花粉媒介昆虫として虫媒受粉によって種子形成される (Lesins and Lesins, 1979; Quiros and Bauchan, 1988; Barnes and Sheaffer, 1995)。開花始は 5~6 月である。昆虫の訪花・吸蜜行動によって竜骨弁内に納められた花柱が反転・露出し、柱頭が旗弁や虫体を強く打つ (図 1, p13)。この刺激で柱頭は受粉能力を持つに至る。これは他家受精を確実にするための機構で、トリッピングと呼ばれる (Vansell and Todd, 1946; 上野, 1987)。トリッピング後、柱頭は花卉にある溝に隠れ、露出されなくなる。したがって、最初に訪花した昆虫以外による受粉は起こらない (Vansell and Todd, 1946; Bohart, 1957)。種子を生産する場合はアルファルファハキリバチなどの受粉効率の高い昆虫を人為的にほ場に放すことで種子を得ている。なお、アルファルファでは風媒は起こらないとされている (Viands et al., 1988)。

5

10

15

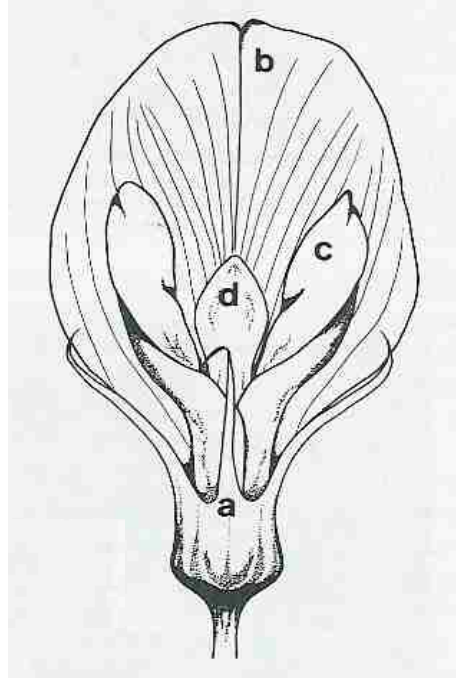


図 1 アルファルファ花きの略図

20 図中には a-萼片、b-旗弁、c-翼弁、d-竜骨弁が示してある。この図では花柱は竜骨弁内に納められており、表示されていない (Teuber and Brick, 1988)。

虫媒による花粉の飛散距離に関しては、米国で遺伝子マーカーを利用して試験が行われている。大規模ほ場、大規模牧草生産ほ場及び小規模ほ場を花粉源とし、花粉源からの距離が 0、20、40、60、80、100、200、300、400、
5 500、750 及び 1000m の地点に種子親を栽培し、GS (グルタミン合成酵素遺伝子) マーカーの有無により花粉の飛散距離を評価した。その結果、大規模ほ場を花粉源とした場合には、花粉源から 1000m においても交雑が確認された。また、交雑率は牧草生産ほ場より採種ほ場で高く、小規模ほ場よりは
10 大規模ほ場の方が高い値であった。また、小規模ほ場では花粉源からの距離が 200m までで交雑が認められ、200m を超えた場合は交雑は認められなかった (St. Amand et al., 2000)。

商業用の種子生産ほ場と牧草生産ほ場からの花粉の飛散について、評価が行われている。

15 2000 年から 2002 年に 3 つの商業用の種子生産ほ場からの花粉飛散について調査が行われた (Fitzpatrick et al., 2003)。花粉源は 2000 年の調査では 1 エーカー (約 0.4ha)、2001 年の調査では 1.6 エーカー (約 0.64ha)、2002 年の調査では 1 エーカー (約 0.4ha) であった。種子親から花粉源までの距離は 500、
20 1000、1500、2000、2640、3960 及び 5280 フィート (約 150~1600m) であった。調査の結果、花粉源からの距離が 2000 フィート (約 600m) までは交雑が認められたが、3960 フィート (約 1200m) 及び 5280 フィート (約 1600m) における交雑は認められなかった (Fitzpatrick et al., 2003)。

また、牧草生産ほ場を花粉親、165 フィート (50m) 離れた種子生産ほ場を種子親とした場合の交雑率についても調査されている (Teuber et al.,
25 2007)。花粉源からの距離が 165 フィート (50m) から 615 (190m) フィートまで、50 フィート毎に種子を採種し、交雑率を調査した。その結果、365 フィート (約 110m) の距離における交雑率は 0.1%以下であった (Teuber et al., 2007)。

30 St. Amand らは RAPD マーカーを用いた試験で、こぼれ落ちから発生したアルファルファ又は自生アルファルファからの花粉の飛散が最大 230m であったと報告している (St. Amand et al., 2000)。こぼれ落ち種子から生育した植物は栽培作物と比較して弱いことが考えられる。さらに、こぼれ落ち種子から生育した植物の生育密度は低いことから花粉源としての影響は少ないと
35 考えられる (Hammon et al., 2006)。

上述したように、これまでにさまざまな条件における花粉の最大飛散距

離が報告されている。

ホ 病原性

5 —

へ 有害物質の産生性

10 アルファルファはアルファルファ自体が自家中毒を起こす他感物質を産生することが知られており、自家中毒の程度は品種により様々である (Chung and Miller, 1995a; Xuan and Tsuzuki, 2002)。アルファルファの組織を含む土壌あるいは水溶性抽出物において、アルファルファの発芽率及び根の生長の低下ならびに根の形態の変化が認められている (Hegde and Miller, 15 1990; Chung and Miller, 1995a)。アルファルファの周辺 20~25cm の範囲ではアルファルファ自体及び他の植物種の成長が抑制される (Jennings and Nelson, 2002b)。自家中毒による主な影響は水と栄養素の吸収難を特徴とする初期生育阻害による牧草生産量の減少である (Jennings and Nelson, 2002a; Undersander et al., 2011)。自家中毒の持続期間は様々であるが、鋤込み後 2 20 週間 (Tesar, 1993) から 6 ヶ月 (Jennings and Nelson, 2002a) との報告がある。アルファルファを栽培した土地へ再度アルファルファを播種した際の自家中毒の程度には一貫性はなく、環境要因と管理体制が自家中毒の程度に影響する可能性があるとされている (Seguin et al., 2002)。

25 また、アルファルファの他感作用については、キュウリ、レタス、ソルガム及びオオムギにおいて報告されている (Hegde and Miller, 1990; Ells and McSay, 1991; Xuan and Tsuzuki, 2002; Ferreira and Reinhardt, 2010)。アルファルファの他感作用の強さは組織によって異なり、組織そのものと水溶性抽出物の間でも異なることが報告されている (Hegde and Miller, 1990; Ells and McSay, 1991; Chung and Miller, 1995b; Chung and Miller, 1995a)。葉、生殖組織 30 及びそれらの抽出物の他感作用は、根組織、根からの抽出物及び土壌滲出物の他感作用よりも強いことが報告されている (Chung and Miller, 1995b)。

アルファルファに含まれる複数の水溶性物質が自家中毒及び他感作用に関係している可能性が示唆されている (Dornbos et al., 1990; Chon et al., 2006)。そのうちメディカルピン (medicarpin) は成熟したアルファルファ中 35 で生成される物質であり、アルファルファの株数の減少が認められた土壌中に存在することが確認されている。また、メディカルピンの土壌への添加が

アルファルファの苗の生育阻害を起こすことが示されており、アルファルファの自家中毒及び他感作用の原因物質として考えられている (Dornbos et al., 1990)。また、アルファルファの苗に対する生育阻害効果を調査した試験結果から、様々なフェノール化合物が自家中毒及び他感作用の原因物質として挙げられている (Hegde and Miller, 1990)。しかしながら、これまでにアルファルファの自家中毒及び他感作用の原因物質に関する結論は出ていない (Dornbos et al., 1990; Chon et al., 2006)。

ト その他の情報

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

モンサント・カンパニーと Forage Genetics International (FGI) 社はリグニン生合成経路の主要な酵素であるカフェオイル CoA 3-O-メチルトランスフェラーゼ (以下「CCOMT 蛋白質」という。) の発現を抑制することにより植物体中のリグニン含量を低下させた「低リグニンアルファルファ (CCOMT, *Medicago sativa* L.) (KK179, OECD UI: MON-00179-5) (以下「本組換えアルファルファ」という。)」を開発した。

本組換えアルファルファは、アルファルファの内在性遺伝子である *CCOMT* 遺伝子の部分的な配列 (以下「*CCOMT* 遺伝子断片」という。) を逆方向反復の形で導入することにより作出された。この逆方向反復配列の転写産物は二本鎖 RNA (dsRNA) を形成し、RNAi¹によりアルファルファ内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する。*CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されることにより植物体中のリグニン含量が減少する (図 4, p28)。

リグニンは反芻動物の飼料の消化率に対して負の影響を及ぼす (Chen et al., 2006)。これは、リグニンが細胞壁を構成する炭水化物に結合することにより、反芻動物の消化管内微生物が炭水化物を分解できなくなるためである (Akin, 1988)。消化率が低い牧草は飼料としての品質が低いとみなされ、そ

¹ RNAi は真核生物において遺伝子発現調節のために一般的に起こる機構である。RNAi は、二本鎖 RNA (dsRNA) が Dicer と呼ばれる酵素により切断され 21~25 塩基の siRNA が形成されることにより引き起こされる。siRNA は RNAi-induced silencing complex (RISC) と結合した後、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する (Siomi and Siomi, 2009)。RISC により、siRNA と結合した mRNA は分解され、タンパク質の産生が阻害される。RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制効果も高いことから、特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている (Kusaba, 2004)。

の価値に影響する。また、刈り取り時期が適期より遅れた場合、植物体においてリグニンの蓄積が進むため牧草としての品質が低下することになる。

5 本組換えアルファルファ由来の地上部における総リグニン含量は、同様の生産条件下で数日早く収穫した従来品種由来の飼料における含量と同等である。したがって、従来品種では目立って飼料品質が低下し始めるような生育時期になっても、本組換えアルファルファでは飼料品質が低下しないことから、生産者は本組換えアルファルファを従来品種と比較して数日遅らせて収穫することができる。このような収穫期間の拡大は、具体的に以下に示すような利益を生産者にもたらす。

- 15 ● 高品質な飼料生産を目的とする場合：一般的な刈り取り時期に収穫する本組換えアルファルファは、同じ時期に収穫する従来品種と比較して、リグニン含量が少なく、飼料としての品質は生産者が目標とする品質基準と同等以上となる可能性が高い。収量は従来品種と同等に維持される。
- 20 ● 高収量を目的とする本組換えアルファルファの場合：生産者は収穫を数日遅らせることにより、品質を大幅に損なうことなく高い収量を確保することができる。アルファルファの再生生育期には、アルファルファの乾物重量は1日に1ヘクタール当たり 225 kg の割合で増加させることができる (Undersander et al., 2009)。したがって、収穫のタイミングをわずかに遅らせることによって、収量は大きく増加する。本組換えアルファルファは数日遅れて収穫した場合でも、リグニンの蓄積が少ないことから従来品種を数日早めに収穫した場合と同等の品質が得られる。従来品種で収穫が同様に数日遅れた場合には、収量は KK179 系統と同等であるが、
- 25 ● 予期しない収穫の遅れによる品質劣化の軽減：雨などの季節外れの天気事象や機器の故障などにより、予期しない収穫の遅れが生じる場合がある。このような遅れの間リグニンが蓄積することにより飼料としての品質が急速に低下して、経済的損失に至る場合が少なくない。本組換えアルファルファの場合、収穫遅延の間のリグニンの蓄積が少ないことから、
- 30 収穫までの飼料としての品質低下が少なく、収穫の短期遅延にも耐えられるため、生産者は栽培管理の柔軟性を高めることができる。

35

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

5 本組換えアルファルファの作出に用いられた供与核酸の構成及び構成要素の由来は図 2 (p19) 及び表 2 (p20~22) に示した。

10 ロ 構成要素の機能

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

15 本組換えアルファルファの作出に用いられた供与核酸の構成要素の機能は表 2 (p20~22)に示したとおりである。

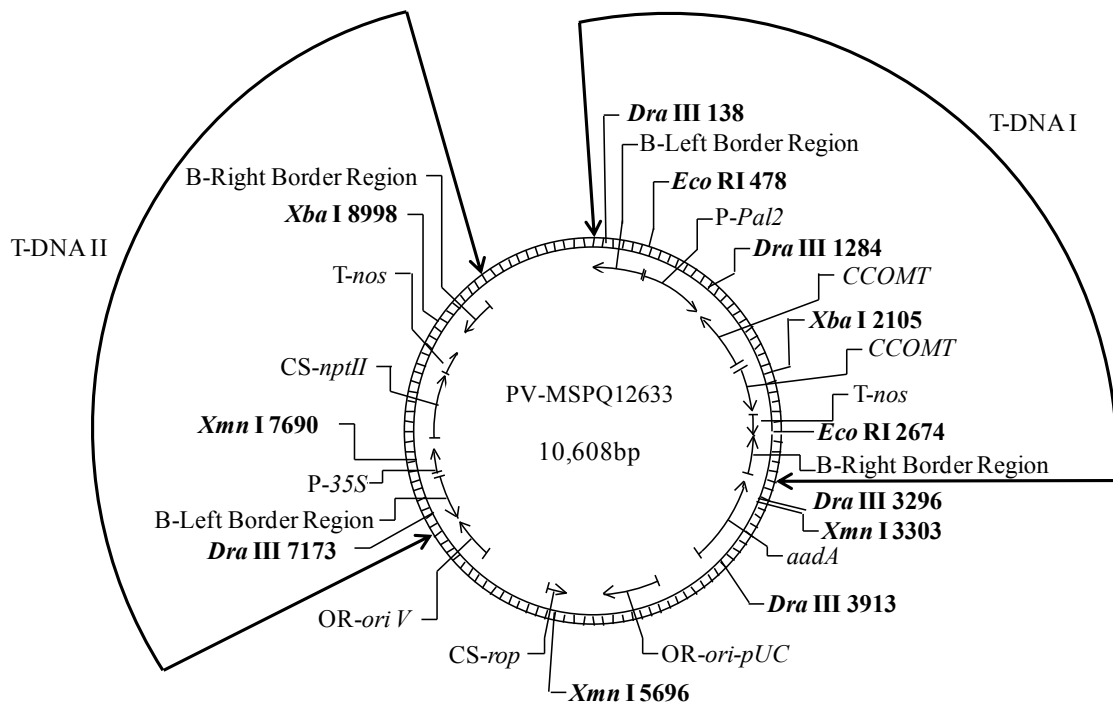


図 2 本組換えアルファファの作出に用いられた PV-MSPQ12633 のプラスミドマップ²

5

制限酵素切断部位の相対的位置を酵素名の右に記載した。

本組換えアルファファの作出過程で、上図の T-DNA I 領域は持つが、T-DNA II 領域は持たない個体を選抜した。

²本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 2 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能³

| 構成要素 | プラスミド 中の位置 | 由来及び機能 |
|-------------------------------------|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA I 領域 | | |
| B ^{注1} -Left Border Region | 1-442 | <i>Agrobacterium 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 (Barker et al., 1983)。 |
| Intervening Sequence | 443-490 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P ^{注2} - <i>Pal2</i> | 491-1,567 | インゲンマメ (<i>Phaseolus vulgaris</i>) 由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼをコードする <i>Pal2</i> 遺伝子のプロモーター (Cramer et al., 1989)。維管束形成を促す内在性のシグナルに呼応し、成熟植物内のリグニン沈着部位において特異的に発現する (Leyva et al., 1992; Guo et al., 2001)。 |
| Intervening Sequence | 1,568-1,584 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>CCOMT</i> [*] | 1,585-2,103 | アルファルファ (<i>Medicago sativa</i>) 由来のカフェオイル CoA 3-O-メチルトランスフェラーゼをコードする <i>CCOMT</i> 遺伝子の部分配列 (Inoue et al., 1998)。遺伝子抑制カセットを構成する。 |
| Intervening Sequence | 2,104-2,110 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>CCOMT</i> | 2,111-2,410 | アルファルファ (<i>M. sativa</i>) 由来のカフェオイル CoA 3-O-メチルトランスフェラーゼをコードする <i>CCOMT</i> 遺伝子の部分配列 (Inoue et al., 1998)。遺伝子抑制カセットを構成する。 |
| Intervening Sequence | 2,411-2,418 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T ^{注3} - <i>nos</i> | 2,419-2,671 | <i>A. tumefaciens</i> pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素遺伝子 (<i>nos</i>) の 3'末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Bevan et al., 1983; Fraley et al., 1983b)。 |
| Intervening Sequence | 2,672-2,727 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| B-Right Border Region | 2,728-3,084 | <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右側境界配列を含む (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。 |

³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 1(つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

| 構成要素 | プラスミド 中の位置 | 由来及び機能 |
|-----------------------------------|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 外側骨格領域 (本組換えアルファルファには存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 3,085-3,199 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| <i>aadA</i> | 3,200-4,088 | トランスポゾン <i>Tn7</i> の 3" (9) -O-ヌクレオチジルトランスフェラーゼ (アミノグリコシド改変酵素) の細菌プロモーター、コード配列及び 3'末端非翻訳領域 (Fling et al., 1985)。スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する。 |
| Intervening Sequence | 4,089-4,618 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR ^{注4} - <i>ori-pUC</i> | 4,619-5,196 | pUC プラスミドに由来する複製開始領域であり、 <i>Escherichia coli</i> においてベクターに自律増殖能を付与する(Vieira and Messing, 1987)。 |
| Intervening Sequence | 5,197-5,623 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS ^{注5} - <i>rop</i> | 5,624-5,815 | ColE1 プラスミドに由来するプライマー蛋白質のリプレッサー (Repressor of primer (<i>rop</i>)) のコード配列で <i>E. coli</i> 中においてプラスミドのコピー数を維持する (Giza and Huang, 1989)。 |
| Intervening Sequence | 5,816-6,552 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| OR- <i>ori V</i> | 6,553-6,949 | 広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域であり、 <i>Agrobacterium</i> においてベクターに自律増殖能を付与する (Stalker et al., 1981)。 |
| Intervening Sequence | 6,950-7,035 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T-DNA II 領域 (本組換えアルファルファには存在しない) | | |
| B-Left Border Region | 7,036-7,477 | <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 (Barker et al., 1983)。 |
| Intervening Sequence | 7,478-7,527 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| P-35S | 7,528-7,851 | カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の 35S プロモーター領域 (Odell et al., 1985)。植物細胞で恒常的に転写を誘導する。 |

表 1(つづき) 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能

| 構成要素 | プラスミド 中の位置 | 由来及び機能 |
|----------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T-DNA II 領域 (本組換えアルファルファには存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 7,852-7,884 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| CS- <i>nptII</i> | 7,885-8,679 | <i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 に由来し、ネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードする遺伝子 (Beck et al., 1982)。ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983a)。 |
| Intervening Sequence | 8,680-8,710 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| T- <i>nos</i> | 8,711-8,963 | <i>A. tumefaciens</i> pTi 由来の NOS をコードしているノパリン合成酵素 (nos) 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で、ポリアデニル化を誘導する (Fraley et al., 1983a; Bevan, 1984)。 |
| Intervening Sequence | 8,964-9,048 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |
| B-Right Border Region | 9,049-9,405 | <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右側境界配列を含む配列 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。 |
| 外側骨格領域 (本組換えアルファルファには存在しない) | | |
| Intervening Sequence | 9,406-10,608 | DNA クローニングの際に利用された配列。 |

注¹B, Border (境界配列)

注²P, Promoter (プロモーター)

注³T, Transcription Termination Sequence (翻訳終了配列)

5 注⁴OR, Origin of Replication (複製開始領域)

注⁵CS, Coding Sequence (コーディング配列)

* T-DNAI 領域には 2 つの *CCOMT* 遺伝子断片が存在し、1 つ目の *CCOMT* における 1,654 から 1,953 番目の配列 (センス鎖) は、2 つ目の *CCOMT* における 2,111 から 2,410 番目の配列 (アンチセンス鎖) の逆相補的配列である。センス鎖とアンチセンス鎖の間の配列は dsRNA 形成時にループ構造となる。

10

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

5 本組換えアルファルファに導入された*CCOMT*遺伝子断片は、アルファルファの内在性遺伝子である*CCOMT*遺伝子の一部であり (表 2, p20~22)、その遺伝子断片の逆方向反復配列からの転写産物からdsRNAが産生され、RNAiにより内在性の*CCOMT*遺伝子の発現が特異的に抑制される。

10 RNAのような核酸は動植物中には普遍的に存在している。ヒトや家畜の遺伝子と高い相同性を有するRNAがイネ子実中には何千と存在することが報告されており、イネ子実中に存在する21bpの短いRNAの一部はヒトの重要な遺伝子配列と100%の相同性を示している (Ivashuta et al., 2009)。また、多くの真核生物中ではRNAiを誘導するsiRNAの前駆体であるdsRNAも存在している (Ivashuta et al., 2009; Parrott et al., 2010)。さらに、植物細胞には多数の内在性dsRNA、miRNA及びsiRNAなどが存在すると同時に、細胞中に蓄積された外来ウイルス由来のdsRNAも存在する (Gould and Francki, 1981; Fukuhara et al., 1993; Cock et al., 1997; Heisel et al., 2008; Ivashuta et al., 2009; Jensen et al., 2013; Petrick et al., 2013)。これらのことは脊椎動物が様々なRNAを安全に食してきた長い歴史があることを示している。

20 なお、RNAがアレルギー性や毒性を持つという報告はなく、核酸にはこれまでに安全に食されてきた長い歴史があり、米国食品医薬品庁 (FDA) によりGRAS (generally recognized as safe)⁴ の認定を受けている (FAO-WHO, 1991; U.S. FDA, 1992)。

25

- ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

まず、植物体におけるリグニンの組成や役割、さらにアルファルファのリグニン生合成経路について以下に記載する。

30

植物の細胞壁には、細胞の生長過程において細胞間に形成される一次細胞壁と、生長の停止後に一次細胞壁の内側に形成される強固な二次細胞壁の2種類が存在する。リグニンは、セルロースやヘミセルロースとともに二次細胞壁の主要構成成分のひとつである。植物体におけるリグニンの機能は細

⁴ FDAにより、一般に安全とみなされていると認められた食品。

胞壁構造の維持であり、植物内の物質輸送や病害への抵抗性にも関わりがある (Vance et al., 1980)。

5 リグニンの生合成経路では、主に3種類のリグニンサブユニットが合成され、これらが重合することによりリグニンが産生される。リグニンサブユニットは3種類あり、グアヤシルリグニン (以下、「Gリグニン」という。)、シリギルリグニン (以下、「Sリグニン」という。) 及び*p*-ヒドロキシフェニル (H) リグニン (以下、「Hリグニン」という。) (図 3, p25) である (Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2010)。各リグニンサブユニットのリグニン中における比率は植物の種類や組織により異なる (Boerjan et al., 2003)。アルファルファでは、GリグニンとSリグニンのリグニン中における比率は最大で95%を占める (Chen et al., 2006)。

15 リグニンの生合成経路におけるGリグニン及びSリグニンの産生には、CCOMT蛋白質 とカフェイン酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ (以下「COMT蛋白質」という。) の2つの*O*-メチルトランスフェラーゼが必要である。*O*-メチルトランスフェラーゼは、フェニルプロパノイド、フラボノイド及びアルカロイドなどの二次代謝産物の酸素原子をメチル化する酵素群である (Lam et al., 2007)。CCOMT蛋白質は、リグニンの生合成経路でカフェオイルCoAをメチル化してフェルロイルCoAを産生し、COMT蛋白質はカフェオイルアルデヒドをメチル化してコニフェリルアルデヒドを、5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドをメチル化してシナピルアルデヒドをそれぞれ産生する (図 3, p25)。アルファルファにおけるリグニン産生に関して、COMT蛋白質はSリグニンの形成に特異的に関与しているが、CCOMT蛋白質はGリグニンの形成にも関与することが知られている (図 3, p25) (Guo et al., 2001; Zhou et al., 2010)。この2つの酵素のうちCCOMT蛋白質を抑制することでGリグニンの産生が低下することが報告されている (Guo et al., 2001; Chen et al., 2006)。

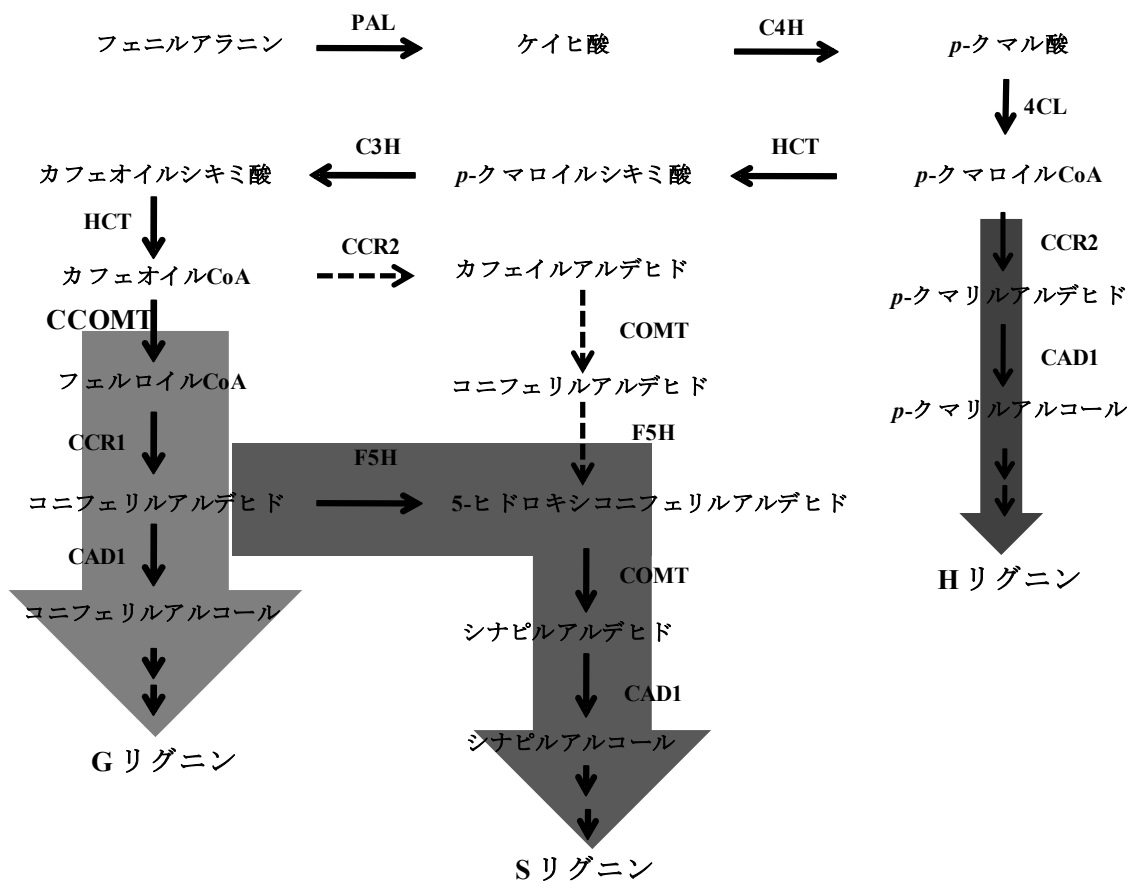


図 3 アルファルファにおけるリグニンの生合成経路⁵

PAL: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

C4H: ケイヒ酸 4-ヒドロキシラーゼ

4CL: 4-ヒドロキシケイヒ酸 : CoA リガーゼ

HCT: ヒドロキシケイヒ酸 CoA:シキミ酸ヒドロキシケイヒ酸トランスフェラーゼ

C3H: *p*-クマル酸 3-ヒドロキシラーゼ

CCOMT: カフェオイル CoA 3-*O*-メチルトランスフェラーゼ

COMT: カフェイン酸 *O*-メチルトランスフェラーゼ

CCR1, CCR2: シンナモイル CoA レダクターゼ

F5H: フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ

CAD1: シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ

非組換えアルファルファにおいて、カフェオイル CoA から CCOMT 及び CCR1 により触媒される経路が抑制された場合、破線で示す経路 (カフェオイル CoA→カフェオイルアルデヒド→コニフェリルアルデヒド)が働く (Zhou et al., 2010)。灰色の網掛けは各リグニン・サブユニットの生合成段階を示す。

⁵本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

次に本組換えアルファルファにおける *CCOMT* 遺伝子断片の働きについて記載する。

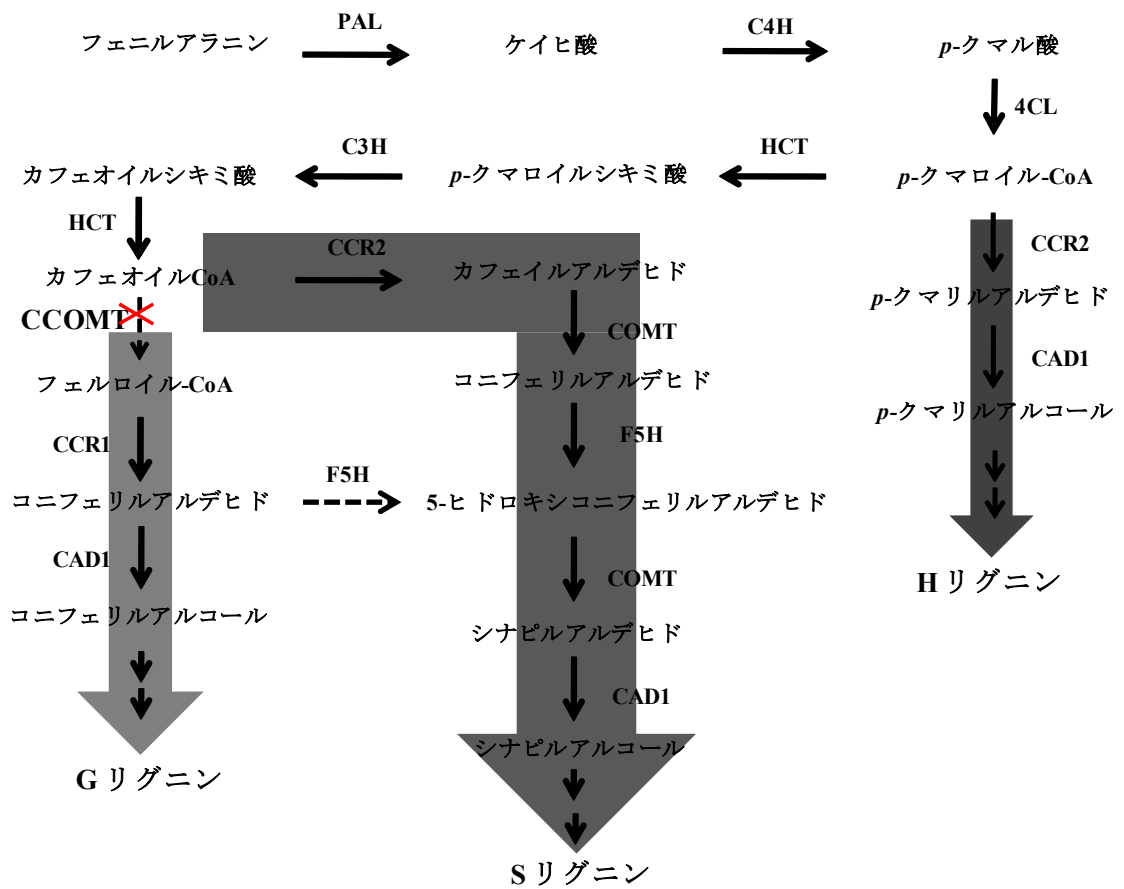
- 5 本組換えアルファルファにおける遺伝子発現抑制カセットは、内在性の *CCOMT* 遺伝子断片の逆方向反復配列から産生される転写産物が二本鎖 RNA (dsRNA) となるようにデザインされている。この dsRNA の、RNAi 機能によりアルファルファ内在性 *CCOMT* 遺伝子由来の mRNA が分解されることで、標的である *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。
- 10 なお、導入した *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットは、インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (*PAL*) 遺伝子由来の *Pal2* プロモーターにより制御されている。*PAL* 遺伝子は維管束形成を促す内在性のシグナルに呼応し、植物内のリグニン沈着部位において特異的に発現する (Leyva et al., 1992; Guo et al., 2001)。したがって、本組換えアルファルファの *CCOMT* 遺伝子断片はリグニン沈着が多く認められる組織において発現する (Leyva et al., 1992; Guo et al., 2001)。
- 15

次に本組換えアルファルファにおいて、アルファルファ内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されることにより生じる代謝系の変化について記載する。

20

- CCOMT* 遺伝子を欠損させたアルファルファと同属の *M. truncatula* において、*CCOMT* 蛋白質の酵素活性が低下してもリグニン生合成経路内の別の経路により S リグニンの生合成が継続されることが報告されている。この生合成は、*CCR2* によるカフェオイル CoA からカフェオイルアルデヒドへの変換を介して行われる (図 4, p28) (Zhou et al., 2010)。また、RNAi により *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制させたアルファルファにおいて、*CCOMT* 蛋白質の発現を抑制したことによる効果は G リグニン産生の低下に限定されることが報告されている (Chen et al., 2006)。この G リグニンの減少により、リグニンに含まれる G リグニンの相対比率が低下する。G リグニンの減少は、S リグニンの相対比率の増加を招くが、S リグニンの絶対量は増加しないことが確認されている (Chen et al., 2006)。結果として、G リグニンの割合が低下し他の主要なリグニン・サブユニットである S リグニンの全サブユニットに占める割合が増大する。リグニン・サブユニットの割合の変化は S リグニンと G リグニンの比、すなわち S:G 比の変化として確認することができ、S:G リグニン比の上昇はアルファルファにおける *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制させた際にみられる特性である (Chen et al., 2006)。
- 25
- 30
- 35

5 実際には本組換えアルファルファにおいて *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットが *CCOMT* 遺伝子に特異的に働くことは、S リグニン及びH リグニンを変化させることなく G リグニンのみが減少することが確認されている (表 3, p31 及び表 4, p32)。また、G リグニン含量が減少することにより、総リグニン含量が減少することも確認されている (表 5, p33)。以下にそれぞれの分析結果の詳細を記載した。



5 図 4 本組換えアルファルファにおけるリグニンの生合成経路⁶

図中のリグニン生合成経路内の酵素の正式名称は図 3 (p25) に記載した。

✕ は、本組換えアルファルファにおいて内在性酵素 (CCOMT 蛋白質) 遺伝子の発現が抑制されることを示す。

破線で示す経路は、CCOMT 蛋白質の発現が抑制された系統では働きが弱まる (Zhou et al., 2010)。

⁶本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

本組換えアルファルファの地上部におけるリグニン・サブユニットの変化
(別添資料 1)

5 本組換えアルファルファ内で *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されることで G
リグニンが減少することを確認するため、リグニン・サブユニットの分析を行
った。2011 年に米国の 6 カ所のほ場 (カリフォルニア州、アイオワ州、イリノ
イ州、カンザス州、テキサス州及びウィスコンシン州) で生育した本組換えア
ルファルファ、対照の非組換えアルファルファ (C0-Syn1 世代⁷) 及び従来商業
10 品種の一番刈りからサンプルを採取した (別添資料 1, p12~14)。

採取した地上部について、リグニン・サブユニットである H リグニン、G リ
グニン及び S リグニンカフェイルリグニン (カフェイルアルデヒド由来、図 4,
p28) 及び 5-ヒドロキシグアヤシルリグニン (5-ヒドロキシコニフェリルアル
15 デヒド由来、図 4, p28) の分析を行った。カフェイルリグニン及び 5-ヒドロキ
シグアヤシルリグニンはアルファルファにおいて主要なリグニン・サブユニッ
トとはみなされていないが、針葉樹において *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制させ
た場合に低下することが報告されているため分析を行った。なお、カフェオ
イルリグニンと 5-ヒドロキシグアヤシルリグニンの 2 つのリグニン・サブユニッ
20 トは、全実測値の全てが定量限界値 (LOQ) 未満であったため、統計解析から
除外した。また、 $\mu\text{mol/g CWR}$ 単位で表した S リグニン及び G リグニンそれぞ
れの値から S:G リグニン比を算出した。また、H リグニン、G リグニン及び S
リグニンの値は、総 HGS リグニンに占める各リグニン・サブユニットの割合と
しても表した。

分析の結果、G リグニン含量において本組換えアルファルファと対照の非
25 組換えアルファルファとの間に統計学的有意差が認められた ($p < 0.05$) (表 3,
p31)。本組換えアルファルファの G リグニンの平均値は $68.10 \mu\text{mol/g CWR}$ で、
対照の非組換えアルファルファの平均値の $83.72 \mu\text{mol/g CWR}$ と比較して 15.62
 $\mu\text{mol/g CWR}$ (18.66%) 低かった。その一方で、本組換えアルファルファの S リ
グニンと H リグニンの含量は、対照の非組換えアルファルファと比較して統
30 計学的有意差は認められなかった(表 3, p31)。

また、本組換えアルファルファの G リグニンの H リグニン、G リグニン及
び S リグニンの総和に占める割合は 53.69%で、対照の非組換えアルファル
ファ (61.69%) と比較して 8.00%低かった (表 4, p32)。この G リグニン含量の減
少により、S:G 比は予測どおり対照の非組換えアルファルファの 0.58 から 0.80
35 へ増加した (表 3, p31)。

以上のことから、本組換えアルファルファにおいて、*CCOMT* 遺伝子の発現
を抑制することにより G リグニンの産生が減少し、対照の非組換えアルファ
ルファと比較して総 HGS リグニンに占める G リグニンの割合が低下し、S:G
40 比が増加することが確認された。

⁷本組換えアルファルファの Syn1 世代と同様の育成方法により非組換えアルファル
ファ R2336 系統と Ms208 系統を掛け合わせるにより C0-Syn1 世代を作出した (図 5,
p33)。

さらに、G リグニン含量の低下が総リグニン含量に与える影響を調べるため、総リグニン含量 (酸性デタージェント繊維：ADL⁸) を測定した。2011年に米国の6カ所のほ場で採取された本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファ (C0-Syn1 世代) の一番刈りの地上部を供試した。本組換えアルファルファの地上部の分析の結果、総リグニン (ADL) の減少が確認された。本組換えアルファルファにおける総リグニン (ADL) の平均値は乾燥重で5.39% DW で、対照の非組換えアルファルファの平均値 6.93% DW と比較して1.53% (p<0.05) 低かった (表 5, p33 及び別添資料 2 の Table 1, p15)。以上のことから、同じ生育段階に収穫した対照の非組換えアルファルファと比較して本組換えアルファルファの総リグニン (ADL) は有意に低いことが確認された (別添資料 2)。

⁸酸性デタージェント溶液により抽出された残渣を硫酸で処理することにより得られるリグニン(飼料分析基準研究会(編著), 2004)。

表 3 本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファのリグニン・サブユニット含量及び S:G 比⁹

| 分析成分 (単位) ^{1,2} | 本組換えアルファルファ ³ 平均値 (S.E.) ⁴ (範囲) | 対照品種 ⁵ 平均値 (S.E.) (範囲) | 有意差 (p 値) | 商業品種 99%T.I. ⁶ (範囲) |
|---------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| リグニン・サブユニット (μmol/g CWR) | | | | |
| G リグニン | 68.10 (9.48) (21.17~134.96) | 83.72 (9.40) (33.11~131.40) | 0.027* | 8.83, 176.39 (25.34~153.11) |
| S リグニン | 55.96 (8.83) (9.82~87.67) | 50.41 (8.78) (12.20~91.89) | 0.302 | 0, 120.96 (5.64~110.93) |
| H リグニン | 5.05 (0.45) (2.20~10.84) | 3.88 (0.43) (0.58~5.49) | 0.077 | 1.59, 6.91 (0.29~8.26) |
| S リグニンと G リグニンの比較 | | | | |
| S:G 比 | 0.80 (0.061) (0.43~1.16) | 0.58 (0.060) (0.35~0.70) | <0.001* | 0.21, 0.96 (0.22~0.92) |

¹2011 年に米国の 6 ヶ所のほ場 (カリフォルニア州、アイオワ州、イリノイ州、カンザス州、テキサス州及びウィスコンシン州) で生育した本組換えアルファルファ、対照の非組換えアルファルファ (C0-Syn1 世代) 及び従来商業品種の一番刈りからサンプルを採取した。

² CWR = Cell Wall Residue (細胞壁残渣); S:G 比 = S リグニン含量を G リグニン含量で割ったもの。

³ 通常の刈り取り期である 1~10%開花期 (対照品種及び商業品種と同条件) に収穫した本組換えアルファルファ。

⁴ 平均値 (S.E.) = 最小二乗平均 (標準誤差)

⁵ 対照の非組換えアルファルファとして、非組換えアルファルファ系統である R2336 系統から作出した C0-Syn1 を用いた。

⁶ 95%の信頼度で商業品種集団の 99%が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は 0 に設定した。

* 有意差あり (p<0.05)

⁹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 4 本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファのリグニン・サブユニット含量 (総 HGS リグニンに占める割合)¹⁰

| 分析成分 (単位) ^{1,2} | 本組換えアルファルファ ³ 平均値 (S.E.) ⁴ (範囲) | 対照品種 ⁵ 平均値 (S.E.) (範囲) | 有意差 (p 値) | 商業品種 99%T.I. ⁶ (範囲) |
|----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------|--------------------------------------|
| リグニン・サブユニット (%総 HGS リグニン) | | | | |
| G リグニン | 53.69 (1.87) (44.92~63.78) | 61.69 (1.87) (56.88~70.56) | <0.001* | 46.69, 76.44 (50.02~76.69) |
| S リグニン | 42.09 (2.35) (26.98~52.01) | 35.24 (2.35) (24.60~40.26) | <0.001* | 17.39, 53.32 (17.07~46.14) |
| H リグニン | 4.22 (0.54) (2.04~9.78) | 3.07 (0.54) (0.34~5.18) | 0.001* | 0, 6.74 (0.18~6.23) |

¹2011年に米国の6カ所のほ場(カリフォルニア州、アイオワ州、イリノイ州、カンザス州、テキサス州及びウィスコンシン州)で生育した本組換えアルファルファ、対照の非組換えアルファルファ(C0-Syn1世代)及び従来商業品種の一番刈りからサンプルを採取した。

²総 HGS リグニンは H リグニン、G リグニン及び S リグニンを合計したものである (%総 HGS リグニン)。

³ 通常の刈り取り期である 1~10%開花期(対照品種及び商業品種と同条件)に収穫した本組換えアルファルファ。

⁴ 平均値 (S.E.) = 最小二乗平均 (標準誤差)

⁵ 対照の非組換えアルファルファとして、非組換えアルファルファ系統である R2336 系統から作出した C0-Syn1 を用いた。

⁶ 95%の信頼度で商業品種集団の 99%が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は 0 に設定した。

* 有意差あり (p<0.05)

¹⁰本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 5 本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファの総リグニン含量¹¹

| 分析成分 (単位) ^{1,2} | 本組換えアルファルファ ³ | 対照品種 ⁵ | 有意差 (p 値) | 商業品種 |
|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------|------------------------------|
| | 平均値 (S.E.) ⁴ (範囲) | 平均値 (S.E.) (範囲) | | 99%T.I. ⁶ (範囲) |
| 総リグニン ⁷ (% DW) | 5.39 (0.64) (2.73~7.60) | 6.93 (0.64) (2.23~10.10) | 0.004* | 1.39, 12.54 (1.70~10.03) |

¹2011年に米国の6カ所のほ場(カリフォルニア州、アイオワ州、イリノイ州、カンザス州、テキサス州及びウィスコンシン州)で生育した本組換えアルファルファ、対照の非組換えアルファルファ(C0-Syn1世代)及び従来商業品種の一番刈りからサンプルを採取した。

5 ²DW = 乾燥重

³ 通常の刈り取り期である1~10%開花期に収穫した本組換えアルファルファ。

⁴ 平均値(S.E.) = 最小二乗平均(標準誤差)

⁵ 対照の非組換えアルファルファとして、非組換えアルファルファ系統であるR2336系統から作出したC0-Syn1を用いた。

⁶ 95%の信頼度で商業品種集団の99%が含まれるように定めた範囲。下限値の限度は0に設定した。

10 ⁷ 半自動化ANKOM法(Weston et al., 2006)により分析を行った。

*有意差あり (p<0.05)

¹¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

(2) ベクターに関する情報

イ 名称及び由来

5

本組換えアルファルファの作出に用いられた PV- MSPQ12633 は、*E. coli* 由来のプラスミド pBR322 などをもとに構築された。詳細は表 2 (p20) に記載した。

ロ 特性

① ベクターの塩基数及び塩基配列

15

本組換えアルファルファの作出に用いられた PV- MSPQ12633 の全塩基数は 10,608bp である。なお、PV- MSPQ12633 の塩基配列は別添資料 3 に記載した。

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

20

E. coli における構築ベクターの選抜マーカー遺伝子として、スペクチノマイシンやストレプトマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾン *Tn7* 由来の *aadA* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

③ ベクターの感染性の有無及び感染性を有する場合はその宿主域に関する情報

25

本ベクターには感染性の知られている配列は含まれていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ 宿主内に移入された核酸全体の構成

30

宿主内に移入された本プラスミド・ベクターの構成要素を表 2 (p20~22) 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と制限酵素による切断部位を図 2 (p19) に示した。

35

ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法

PV-MSPQ12633 をアグロバクテリウム法によって、R2336 系統の葉組織へ導入した。

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の方法

10 R2336 系統の葉組織と PV-MSPQ12633 を含む *A. tumefaciens* ABI 株を共置培養した後、カナマイシン及びチカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養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

チカルシリン・クラブラン酸を添加した組織培養培地により、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、本組換えアルファルファの Syn1 世代の種子¹²において、形質転換に用いた PV-MSPQ12633 の外側骨格領域を標的とした PCR 分析を行ったところ、本組換えアルファルファには PV-MSPQ12633 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 4)。このことから、本組換えアルファルファには形質転換に用いたアグロバクテリウム菌体は残存していないことが確認された(別添資料 4 の Table 1, p10)。

25 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 形質転換された再分化個体 (T0) を従来品種 Ms208 系統と交配させ、P0 世代を作出した。P0 世代において、T-DNAI 領域を有し、T-DNAII 領域を持たない個体を PCR 及びサザンブロット分析により選抜した。優れた表現型と導入遺伝子の存在状態などを指標に、最終的に商品化系統として本組換えアルファルファを選抜した。

アルファルファは 4 倍体であり、8 つの染色体を 4 セット持っている

¹²収穫種子をバルクにし、その中からランダムに約 200 粒取り、DNA を抽出し PCR 分析に用いた。

- ($2n=4x=32$)。ほとんどのアルファルファは自家不和合性であり、近交弱勢及び雑種強勢を示す (Cooper and Brink, 1940; Wilsie, 1958; Hill, 1983)。商業品種の種子はハチを花粉媒介昆虫として必要とする形質を持つ複数の親系統を自然交配することにより作られる。この方法により作出された品種は合成品種
- 5 と呼ばれる。合成品種は、複数の遺伝的優良系統の多交雑により作出しているため、合成品種内の個体は異なる遺伝子型を持ち、多様な表現形質を示し、栽培種は一般的に遺伝的に固定されていない (Rumbaught et al., 1988)。本組換えアルファルファについても、MBC2世代内での任意交雑により Syn1 世代を、Syn1 世代内での任意交雑により Syn1 Adv 世代を作出した。
- 10 本組換えアルファルファの育成図を 図 5 (p37) に示した。なお、本申請の対象は、P0 世代及び P0 世代から派生する全ての交雑後代系統である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図 5 本組換えアルファルファの育成図

(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

① 移入された核酸の複製物が存在する場所

5

形質転換された再分化個体 (T0) を従来品種の Ms208 系統と交配させ、P0 世代を作出した。P0 世代において、T-DNAI 領域を有し、T-DNAII 領域を持たない個体を PCR により選抜した。得られた P0 世代に FD4 従来品種個体群を交配させることにより MBC1 を作出した。導入遺伝子が確認された 20 個体の MBC1 から得られた花粉を用いて FD4 従来品種個体群と交配することにより MBC2 を作出した。同様に、導入遺伝子が確認された 24 個体の MBC2 から得られた花粉を用いて FD4 従来品種個体群と交配することにより MBC3 を作出した。

10

さらに、導入遺伝子が確認された 80 個体の MBC2 を自殖することにより Syn1 を作出した。MBC2、MBC3 及び Syn1 の個体について End point TaqMan PCR により導入遺伝子の有無を調べた。

15

分離比の検定においては、アルファルファが同質 4 倍体であることを考慮した。同質 4 倍体では遺伝子が動原体と連鎖する場合にはメンデルの分離法則に従い染色体型分離することが知られている。一方で、重複還元配偶子の形成やキアズマの有無により最高均等分離や染色分体分離に従い遺伝子が分離することも知られている (村松, 1987)。そこで、本組換えアルファルファの導入遺伝子について、1) 染色体型分離、2) 最高均等分離、及び 3) 染色分体分離の 3 つの遺伝分離に従った場合の分離比について検証した。

20

まず初めに、本組換えアルファルファの MBC2 世代から生ずる配偶子の組み合わせを検討した (表 6, p39)。なお、MBC2 世代では 4 本の染色体のうち 1 本に導入遺伝子が含まれる個体 (Aaaa) のみを選抜し、後代の育成に使用した。

25

次に、表 6 (p39) で検討した配偶子からできる Syn1 世代における遺伝子型の分離比を検討した (表 7, p39)。

また、Syn1 世代における表現型の分離比の期待値を検討し、実際に本組換えアルファルファの Syn1 世代を調査した結果と比較した (表 8, p39)。その結果、本組換えアルファルファの Syn1 世代における表現型の分離比の観測値 (2.93:1) は、最高均等分離及び染色分体分離による分離比の期待値 (2.41:1 及び 2.48:1) とは異なることが確認された。

30

一方で、Syn1 世代における表現型の分離比の観測値 (376:128) と染色体型分離の期待値 (378:126) の間にカイ二乗検定による統計学的有意差は認められなかった (表 9, p40; 別添資料 5 の Table1, p7)。したがって、本組換えアルファルファの導入遺伝子は染色体上に存在していると考えられた。

35

表 6 本組換えアルファルファのMBC2世代(遺伝子型Aaaa)における配偶子の期待値¹³

| | AA | Aa | aa |
|--------|----|----|----|
| 染色体型分離 | 0 | 1 | 1 |
| 最高均等分離 | 1 | 10 | 13 |
| 染色分体分離 | 1 | 12 | 15 |

*A は導入遺伝子を持つ導入遺伝子座を示し、a は導入遺伝子を持たない導入遺伝子座を示す。

5

表 7 本組換えアルファルファのSyn1世代における遺伝子型の期待値¹⁴

| | AAAA | AAAa | AAaa | Aaaa | aaaa |
|--------|------|------|------|------|------|
| 染色体型分離 | 0 | 0 | 9 | 18 | 9 |
| 最高均等分離 | 1 | 20 | 126 | 260 | 169 |
| 染色分体分離 | 1 | 24 | 174 | 360 | 225 |

表 8 本組換えアルファルファのSyn1世代における表現型の期待値及び観測値¹⁵

10

| | 陽性個体数 | 陰性個体数 | 陰性を1とする 分離比 |
|---------------|-------|-------|----------------|
| 染色体型分離(期待値) | 378 | 126 | 3 : 1 |
| 最高均等分離(期待値) | 356 | 148 | 2.41 : 1 |
| 染色分体分離(期待値) | 359 | 145 | 2.48 : 1 |
| Syn1世代における観測値 | 376 | 128 | 2.93 : 1 |

¹³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

¹⁴本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

¹⁵本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

表 9 本組換えアルファルファの育成過程における *CCOMT* 遺伝子断片の分離様式¹⁶

| 世代 | 供試個体数 ¹ | 観測値 ² | | 1:1 の分離比の期待値 | | χ^2 | P-値 ³ |
|------|--------------------|------------------|-------|--------------|-------|----------|------------------|
| | | 陽性個体数 | 陰性個体数 | 陽性個体数 | 陰性個体数 | | |
| MBC2 | 261 | 119 | 142 | 130.5 | 130.5 | 2.03 | 0.154 |
| MBC3 | 263 | 132 | 131 | 131.5 | 131.5 | <0.01 | 0.951 |

| 世代 | 供試個体数 ¹ | 観測値 ² | | 3:1 の分離比の期待値 | | χ^2 | P-値 ³ |
|------|--------------------|------------------|-------|--------------|-------|----------|------------------|
| | | 陽性個体数 | 陰性個体数 | 陽性個体数 | 陰性個体数 | | |
| Syn1 | 504 | 376 | 128 | 378 | 126 | 0.04 | 0.837 |

5

¹MBC2 世代の 261 個体、MBC3 世代の 263 個体及び Syn1 世代の 504 個体は、栽培された親世代のすべての種子をバルクにし、その中からランダムに選んだ種子を用いて栽培された。

²*CCOMT* 遺伝子の有無を TaqMan PCR によって調べた。

³上記 3 世代から得られた分離比をカイ二乗検定で分析した ($p<0.05$)。

¹⁶本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

- 5 サザンブロット分析による導入遺伝子の解析の結果、本組換えアルファルファの核ゲノム中1ヵ所に1コピーのT-DNAI領域が組み込まれており (別添資料6のFigure4~7, p39~42)、複数世代 (P0、MBC1、MBC2 及び Syn1) にわたり安定して遺伝していることが確認された (別添資料7のFigure4, p19)。また、サザンブロット分析により T-DNAII 及び外側骨格領域は導入されていないことが確認
- 10 されている (別添資料6のFigure8~10, p43~45)。なお、本組換えアルファルファにおける導入遺伝子の模式図を図6 (p42)に示した。

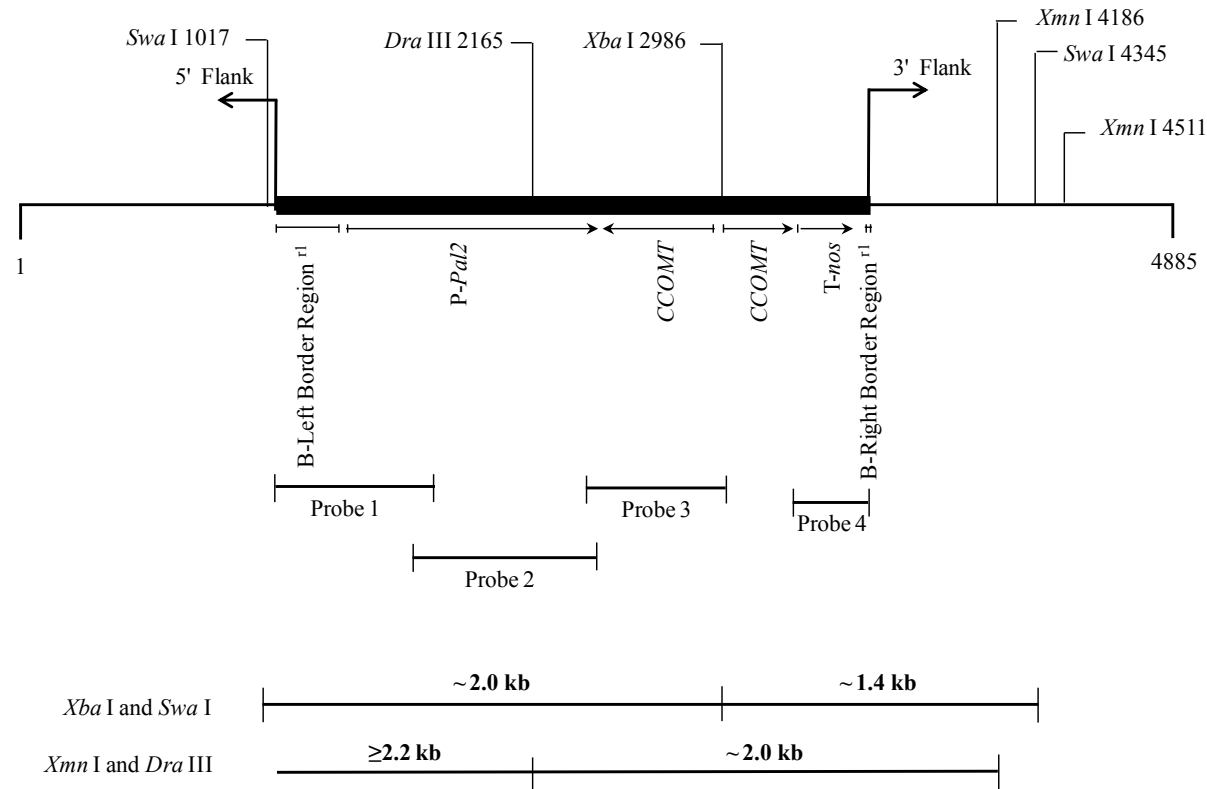


図 6 本組換えアルファルファの導入遺伝子地図及び挿入されたゲノム近傍配列並びに制限酵素切断部位の模式図¹⁷

図の上段は本組換えアルファルファの導入遺伝子の模式図であり、導入遺伝子内の構成要素及びサザンブロット分析に用いた制限酵素切断部位を記載した。図上段の矢印により導入遺伝子の 5'末端及び 3'末端に隣接するゲノム DNA 配列の開始位置を示した。

- 5 図の中段には、T-DNAI プローブの相対サイズ及び位置を示した。図の下段は各制限酵素で切断した後に予想される DNA 断片のサイズを示した。なお、模式図中の構成要素、制限酵素切断部位及び各プローブはおおよその位置を示している。図中の rl は、B-Right Border Region 及び B-Left Border Region が本組換えアルファルファにおいて PV-MSPQ1263 と比較して短くなっていることを意味する。

¹⁷本図に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

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

5 1 コピーなので該当しない (別添資料 6 の Figure4~7, p39~42)。

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

10 2010年に米国の2ヵ所 (アイオワ州及びウィスコンシン州) のほ場において、本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファの複数世代 (MBC1、Syn1 及び Syn1-Adv1) における地上部の総リグニン含量として ADL の分析を行った。

15 その結果、本組換えアルファルファにおいてリグニン含量が減少していることが確認された (表 10, p44; 別添資料 8 の Table 1, p4)。本組換えアルファルファの各世代(MBC1、Syn1 及び Syn1-Adv1)のリグニン含量は対照の非組換えアルファルファと比較してそれぞれ17.71%、13.27%及び15.34%減少していた (表 10, p44; 別添資料 8 の Table 1, p4)。

20 また、2013年に米国 Forage Genetic International (FGI 社) の温室において育成された本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファの複数世代 (MBC2、Syn1 及び Syn1-Adv1) における *CCOMT* 遺伝子抑制カセットに由来する dsRNA 及び siRNA の転写量をノーザンブロット分析により行った。

25 その結果、本組換えアルファルファの各世代において内在性 *CCOMT* 蛋白質の RNA 転写量が減少していることが確認され、*CCOMT* 遺伝子抑制カセットに由来する siRNA が転写されていることが確認された (別添資料 9 の Figure 3 及び 4, p16~17)

表 10 本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファにおける総リグニン含量* (2010年、米国)¹⁸

| 供試世代 ² | 平均値 (S.E.) ¹ (範囲) | | p 値 ⁴ |
|-------------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------|
| | 本組換え アルファルファ | 対照の非組換え アルファルファ ³ | |
| MBC1 | 4.37 (0.36) (3.55 ~ 5.63) | 5.31 (0.36) (4.42 ~ 7.11) | 0.002 |
| Syn1 | 4.02 (0.36) (3.30 ~ 4.31) | 4.64 (0.36) (4.15 ~ 5.39) | 0.034 |
| Syn1-Adv1 | 3.91 (0.36) (3.61 ~ 4.42) | 4.62 (0.36) (3.72 ~ 4.89) | 0.016 |

5 *総リグニン含量として酸性デタージェントリグニン (ADL) を分析した。

¹ 平均値(S.E.) = 最小二乗平均 (標準誤差)

² 値は%乾燥重で求めた。

³ 対照の非組換えアルファルファとして、R2336 系統から作出した C0-MBC1、C0-Syn1 及び C0-Syn1-Adv1 世代を用いた。

10 ⁴ 分散分析により統計処理を行った (1 サンプル/反復で 6 反復、p<0.05 で有意)。

¹⁸本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

⑤ ウイルスの感染その他の経路を経由して移入された核酸が野生動植物等に伝播されるおそれがある場合は、当該伝達性の有無及び程度

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

本組換えアルファルファは本組換えアルファルファに存在する特異的 DNA 配列に結合可能なプライマーセットを利用して、End-point TaqMan PCR 法による検出及び識別が可能である (別添資料 10)。検定に用いる DNA の濃度は、PCR の 1 反応当たり 5~10ng であることが推奨されており、葉の一部 (リーフディスク) を用いて検定できる。

15

本法の再現精度については、46 サンプルの本組換えアルファルファ及び 134 サンプルの非組換えアルファルファを用いて確認試験を行った (別添資料 10 の p6)。

20

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

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

25

本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片はリグニン生合成経路の主要な酵素をコードする *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する。*CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されることにより、リグニンの三次元網目構造を形成する G リグニン、S リグニン及び H リグニンのうち、G リグニンが減少する。S リグニン及び H リグニンと重合し、リグニンの三次元網目構造を形成する G リグニンが減少することにより、アルファルファの総リグニンも減少する。実際に、本組換えアルファルファの地上部の分析の結果、総リグニン (ADL) が、対照の非組換えアルファルファと比較して 1.53% ($p < 0.05$) 減少することが確認されている (表 5, p33; 別添資料 2)。

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¹⁹

5

2012年から2013年にかけて独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所に設置された隔離ほ場において本組換えアルファルファの隔離ほ場試験を行った(以下「本隔離ほ場試験」という。)。試験には本組換えアルファルファのSyn1世代を供試した(図5, p37)。対照の非組換えアルファルファとしては、R2336系統を母本とし、本組換えアルファルファのSyn1世代と同様の育成方法により作出したC0-Syn1世代を用いた。

10

なお、生育初期における低温又は高温耐性試験(項目b, p47)は米国の人工気象室で実施した。また、第一の1-(3)-ニ-④(p12)に記載したように、アルファルファは自家不和合性を示す他殖性植物であり、主にハナバチ、ハキリバチやミツバチ等を花粉媒介昆虫として虫媒受粉によって種子形成される(Lesins and Lesins, 1979; Quiros and Bauchan, 1988; Barnes and Sheaffer, 1995)。しかしながら、本組換えアルファルファの隔離ほ場試験では、交雑防止措置として開花期間中には形態及び生育特性調査区を防虫網で覆っているため、種子の生産性、脱粒性、休眠性及び発芽率を評価するための試験(項目e, p48)のうち、種子の生産量及び脱粒性の調査は米国(アイダホ州)のほ場で実施し、種子の発芽率の調査は米国の温室で実施した。

15

20

a 形態及び生育の特性

25

形態及び生育の特性を評価するため、7項目(萌芽始め(月日)、春季の株数、二番刈り時の最長莖長(cm)、二番刈り時の地上部の新鮮重(g)、二番刈り時の倒伏性、花色、花序軸あたりの花数)について評価を行った。

春季の株数、最長莖長(二番刈り)(cm)、地上部の新鮮重(二番刈り)(g)、花序軸あたりの花数に関して統計処理を実施し、萌芽始め(月日)及び花色に関しては統計処理を行わなかった。また、倒伏性(二番刈り)については本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファともに全て倒伏したため、統計処理を行わなかった。

30

その結果、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの

¹⁹本項目中の以下に続くa~hに記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社
に帰属する。

間に差違は認められなかった (別添資料 11 の表 2, p11)。

b 生育初期における低温又は高温耐性

- 5 アルファルファは多年生であることから、生育初期における低温耐性及び
高温耐性の調査を行った。なお、生育初期における低温又は高温耐性試験は、
2011 年に米国のモンサント・カンパニーの人工気象室において実施した。

10 生育初期における低温耐性を調査するために、播種後 26 日目の本組換えア
ルファルファ、対照の非組換えアルファルファ、従来商業品種 4 系統の幼苗
を 3 段階の温度条件 (昼間/夜間) (適温 : 28°C/23°C、やや低温 : 15°C/8°C、低
温 : 7°C/5°C) に移し 21 日間生育させ、調査を行った。低温処理前、低温処理
後 7 日目、14 日目及び 21 日目に生育段階、草勢及び最長茎長について調査を
行った。

15 なお、本試験では、栽培した個体のうち導入遺伝子を有することを確認し
た個体のみを調査した。

20 調査の結果、統計処理を行った最長茎長について本組換えアルファルファ
と対照の非組換えアルファルファの間に統計学的有意差は認められず、統計
処理を行わなかった生育段階と草勢についても本組換えアルファルファと対
照の非組換えアルファルファの間に違いは認められなかった(別添資料 12 の
Table 1~3, p5~7)。

25 生育初期における高温耐性を調査するために、播種後 26 日目の本組換えア
ルファルファ、対照の非組換えアルファルファ、従来商業品種 4 系統の幼苗
を 3 段階の温度条件 (昼間/夜間) (適温 : 28°C/23°C、やや高温 : 35°C/33°C、高
温 : 40°C/38°C) に移し 21 日間生育させ、調査を行った。高温処理前、高温処
理後 7 日目、14 日目及び 21 日目に生育段階、草勢及び最長茎長について調査
を行った。

30 なお、本試験では栽培した個体のうち導入遺伝子を有することを確認した
個体のみを調査した。

35 調査の結果、統計処理を行った最長茎長について本組換えアルファルファ
と対照の非組換えアルファルファの間に統計学的有意差は認められず、統計
処理を行わなかった生育段階と草勢についても本組換えアルファルファと対
照の非組換えアルファルファの間に違いは認められなかった(別添資料 13 の
Table 1~3, p5~7)。

c 成体の越冬性

5 成体の越冬性を評価するために、形態及び生育特性調査区において、本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファの萌芽始め及び春季の株数を比較した。その結果、いずれの項目においても本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の表 2, p11)。

10 d 花粉の稔性及びサイズ

15 本隔離ほ場で生育した本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファから採取した花粉を Alexander 溶液で染色し、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズを測定した。これらの項目について統計処理を行った結果、花粉の稔性 (充実度) 及びサイズのいずれにおいても本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 11 の図 7 及び表 3, p12)。

e 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

20

25 第一の 1-(3)-ニ-④ (p12) に記載したように、アルファルファは自家不和合性を示す他殖性植物であり、主にハナバチ、ハキリバチやミツバチ等を花粉媒介昆虫とする虫媒受粉によって種子形成される (Lesins and Lesins, 1979; Quiros and Bauchan, 1988; Barnes and Sheaffer, 1995)。しかしながら、本隔離ほ場試験では、交雑防止措置として開花期間中は形態及び生育特性調査区を防虫網で覆っているため、種子の生産量、脱粒性及び発芽率の調査は、米国のほ場及び温室において実施した。

30 種子の生産量及び脱粒性を調査するために、本組換えアルファルファ²⁰、対照の非組換えアルファルファ及び従来商業品種 7 系統について 2010 年に米国の 1 カ所のほ場 (アイダホ州) において 7 項目 (苗立ち数、草勢、倒伏性、50 粒あたりの種子重、一莢あたりの種子数、裂莢数、種子収量) について調査した。

²⁰本試験で用いた本組換えアルファルファの Syn1 世代には導入遺伝子を持たない個体が理論値で 25%含まれる。

調査の結果、全ての項目で本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの間に統計学的有意差は認められなかった (別添資料 14 の Table2, p6)。

- 5 また、温室で栽培した本組換えアルファルファ、対照の非組換えアルファルファ及び従来商業品種4系統より収穫された種子の発芽率の調査を行った。温室で採種された場合、硬実種子が増加する可能性があることが報告されていることから (Bass et al., 1988; Copeland and McDonald, 2001)、その影響を排除するため種皮に傷を入れない (無処理) 種子に加え、耐水性を持つ収穫種子の種皮に傷を入れ、吸水を良くした種子についても発芽率を調査した。4 反復各 100 粒ずつ 20℃、暗黒条件下で発芽試験を行い、発芽率を調査した。発芽種子は正常発芽と異常発芽に分けて測定し、非発芽種子は枯死種子、吸水膨潤状態種子及び硬実種子に分けて測定した (AOSA, 2010; AOSA/SCST, 2010)。なお、本試験で用いた本組換えアルファルファの Syn1 世代には導入遺伝子を持たない個体が理論値で 25%含まれる。

調査の結果、種皮に傷を入れない (無処理) 種子において、正常発芽率で統計学的有意差が認められ、本組換えアルファルファでは 86.0%、対照の非組換えアルファルファでは 72.5%であった。また、硬実種子率において統計学的有意差が認められ、本組換えアルファルファでは 13.0%、対照の非組換えアルファルファでは 25.3%であった (別添資料 15 の Table 1, p7)。

種皮に傷を入れた種子においては、正常発芽率で統計学的有意差が認められ、本組換えアルファルファでは 93.5%、対照の非組換えアルファルファでは 89.8%であった (別添資料 15 の Table 1, p7)。

25 f 交雑率

アルファルファと交雑可能であると考えられる近縁種は、多年生の *Medicago* 属の *M. prostrata*、*M. cancellata* 及び *M. saxatilis* の 3 種である (Lesins, 1961; Lesins, 1962; Lesins, 1970; Quiros and Bauchan, 1988)、これらは日本には存在しない (大橋, 1999; 大橋, 2003)。よって、交雑率の試験は行わなかった。

g 有害物質の産生性

本組換えアルファルファから土壤微生物又は他の植物に影響を与える物質が産生されていないことを確認するため、土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験を行った。その結果、いずれの項目においても統計学的有意差は

認められなかった (別添資料 11 の表 4~表 6, p14)。

h 病害虫に対する抵抗性

5 本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片はリグニン生合成経路の主要な酵素をコードする *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する。その結果、本組換えアルファルファではリグニン含量が減少している。植物体中のリグニン含量が低下することにより植物体の構造が弱くなり、環境からの物理的ストレスに弱くなっていると考えられる。また、病害や害虫に対する抵抗性も低下する可能性が考えられる。本組換えアルファルファ植物体中のリグニン含量の低下により病害等に対する感受性が高まった場合、本組換えアルファルファ植物体で病害等が増殖し、他の野生植物の病害等が増加する可能性が考えられる。

10
15
20 そこで、本組換えアルファルファ及び対照の非組換えアルファルファについて、わが国のアルファルファ栽培における主要害虫であるアルファルファタコゾウムシ (*Hypera postica*) 及びアブラムシ (*Aphididae*) 並びに主要な病害であるアルファルファそばかす病 (*Leptosphaerulina briosiana*) による植物体の傷害程度を調査した。その結果、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に違いは認められなかった (別添資料 11 の表 7, p16)。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

25 (1) 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。

30 (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

—

- (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

5

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

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

10

—

(6) 国外における使用等に関する情報

本組換えアルファルファの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請状況は以下のとおりである (表 11, p52)。

5

表 11 本組換えアルファルファの海外の主要栽培予定国及び輸入予定国における申請及び認可状況²¹

2014年5月現在

| 機関 | 安全性審査の種類 | 申請時期 | 承認時期 |
|--------------------------------|----------|--------------------|--------------------|
| 米国食品医薬品庁 (FDA) | 食品・飼料 | 2012年8月 | 2013年12月 |
| 米国農務省 (USDA) | 環境 | 2012年11月 | 審査中 |
| カナダ保健省 (Health Canada) | 食品 | 2012年11月 | 審査中 |
| カナダ食品検査庁 (CFIA) | 環境・飼料 | 2012年11月 | 審査中 |
| オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関 (FSANZ) | 食品 | 2013年4月 | 2014年5月 |
| 韓国食品医薬品安全処 (MFDS) | 食品 | 2013年2月 | 審査中 |
| 韓国農村振興庁 (RDA) | 環境 | 2013年3月 | 審査中 |
| 中国農業部 (MOA) | 環境・食品・飼料 | ■■■■ ²² | ■■■■ ²² |

10 なお、本組換えアルファルファのわが国における申請状況は以下のとおりである (表 12, p52)。

表 12 本組換えアルファルファのわが国における申請及び認可状況²³

2014年5月現在

| 機関 | 内容 | 申請時期 | 承認時期 |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|--------------------|
| 厚生労働省 | 食品 ²⁴ | 2014年2月 | ■■■■ ²² |
| 農林水産省 | 飼料 ²⁵ | ■■■■ ²² | ■■■■ ²² |
| 農林水産省・環境省 | 環境 (第一種使用規程 ²⁶ : 隔離ほ場) | 2011年9月 | 2012年9月 |
| 農林水産省・環境省 | 環境 (第一種使用規程: 一般使用) | 2014年2月 | — |

²¹本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

²² 社外秘につき非開示。

²³本表に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社に帰属する。

²⁴ 食品衛生法に基づく。

²⁵ 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。

²⁶ 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²⁷

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

わが国では、アルファルファは明治初年に牧草として導入され、全国の平地から低山地の道端や草地に広く野生化したといわれている (大橋, 1999)。しかし、アルファルファの生育は日本各地で報告されているものの (浅沼ら, 1987; 清水ら, 2001)、分布域は局所的で生育量は少ないとされている報告が多いことから (浅沼ら, 1987; 大分県植物誌刊行会, 1989; 杉野, 2008; 太田, 2010)、その生育地は点在しており、大きな群落を作るものではないと考えられた。また、アルファルファの幼植物は雑草との競合に弱く (Canevari et al., 2008; UC-IPM, 2010)、植物体の定着と収量は雑草との競合がある場所で生育した場合は著しく低下する (Bagavathiannan et al., 2011)。さらに、アルファルファは雑草との競合に弱いことから、播種前から生育時期全般を通じて雑草防除を必要とする (鈴木, 1992; Canevari et al., 2008; UC-IPM, 2010)。また、アルファルファは降水量が極めて少ない地域を起源とすることから耐干性は高いが耐湿性が低く、かつ酸性土壌を嫌うことから、わが国の湿潤気候と酸性土壌には適さない。

さらに、わが国においてアルファルファは、日本固有の在来種を駆逐して生物多様性に影響を及ぼす外来種タンポポ種群 (*Taraxacum* spp.) やセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) などのような侵略的外来種としては掲載されていない (日本生態学会(編), 2002)。

以上のことより、わが国の自然条件下において、アルファルファの生育した個体が増加して現在の分布が拡大する可能性は低く、かつ侵略的外来種のように優占群落をつくる可能性は低いと考えられる。

競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズをわが国の隔離ほ場において調査した (第一の 2-(6)-②-a, c 及び d, p46~48)。その結果、統計処理を行った項目において、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に統計学的有

²⁷本項目中で、第一の 2-(6)-①の a~h に記載された情報に係る権利及び内容の責任は日本モンサント株式会社には帰属する。

意差は認められなかった。また、統計処理を行わなかった項目においても、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に違いは認められなかった。

5 また、生育初期における低温又は高温耐性並びに種子の生産量、脱粒性、
休眠性及び発芽率を米国において調査した (第一の 2-(6)-②-b, d 及び e, p47~49)。その結果、種子の休眠性及び発芽率に関する項目において、種皮に傷を入れない (無処理) 種子の正常発芽率、種皮に傷を入れない (無処理) 種子の硬実種子率、種皮に傷を入れた種子の正常発芽率において本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの間で統計学的有意差が認められた。また、統計処理を行わなかった項目について、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に違いは認められなかった。

種皮に傷を入れない (無処理) 種子の正常発芽率は、本組換えアルファルファでは 86.0%、対照の非組換えアルファルファでは 72.5%であった。

15 種皮に傷を入れない (無処理) 種子の硬実種子率は、本組換えアルファルファでは 13.0%、対照の非組換えアルファルファでは 25.3%であった。

種皮に傷を入れた種子の正常発芽率は、本組換えアルファルファでは 93.5%、対照の非組換えアルファルファでは 89.8%であった。

20 収穫種子の発芽率が上昇することによって、埋土種子が減少すると考えられる。埋土種子における休眠性は一年生雑草、多年生雑草が一般的に持つ形質である (Bostock, 1978; Bowes and Thomas, 1978; Conn and Werdin-Pfisterer, 2010)。休眠により土壌中に埋土種子が長期間存在することは雑草が再定着する可能性を高めると考えられる (Bowes and Thomas, 1978)。よって、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの間で認められた発芽率の上昇は、種子の休眠性を低下させるものであると考えられる。したがって、埋土種子の減少が競合において優位に働くとは考えにくい。

25 一方で、収穫種子の発芽率の上昇により、結実後に発生する個体数が一時的に増加する可能性が考えられる。しかしながら、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズ並びに種子の生産量及び脱粒性に関する全ての項目において本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった (第一の 2-(6)-②- a~e, p46~49)。また、アルファルファの幼植物は雑草との競合に弱いことが知られている (Canevari et al., 2008; UC-IPM, 2010)。したがって、発芽した本組換えアルファルファの幼植物の競合における優位性が高まっているとは考えにくい。以上のことから、収穫種子の発芽率の上昇による発生個体数の一時的な増加が競合において優位に働くとは考えにくい。

35 したがって、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの

間で認められた正常発芽率の増加及び硬実種子率の減少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。

5 なお、本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片はリグニン生合成経路の主要な酵素をコードする *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する。その結果、本組換えアルファルファではリグニン含量が減少している。植物体中のリグニン含量が低下することにより植物体の構造が弱くなり、環境からの物理的ストレスに弱くなっていると考えられる。また、病害や害虫に対する抵抗性も低下する可能性が考えられる。しかしながら、リグニン含量の
10 低下により起こると考えられるこれらの変化は植物体を弱めるものであることから、本組換えアルファルファの競合における優位性を高めるとは考えにくい。

15 一方で、本組換えアルファルファ植物体中のリグニン含量の低下により病害等に対する感受性が高まった場合、本組換えアルファルファ植物体で病害等が増殖し、他の野生植物の病害等が増加する可能性が考えられる。しかしながら、隔離ほ場試験において病害及び害虫発生状況を調査した結果、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に病害及び害虫による傷害程度に違いは認められなかった (第一の 2-(6)-②-h, p50) ことから、
20 本組換えアルファルファ植物体中のリグニン含量の低下により病害等に対する感受性が高まっているとは考えにくい。

 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。

25 (2) 影響の具体的内容の評価

—

30 (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

35 以上のことから、本組換えアルファルファは、競合における優位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。

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

アルファルファの他感作用については、キュウリ、レタス、ソルガム及びオオムギにおいて報告されている (Hegde and Miller, 1990; Ells and McSay, 1991; Xuan and Tsuzuki, 2002; Ferreira and Reinhardt, 2010)。アルファルファの他感作用の強さは組織によって異なり、組織そのものと水溶性抽出物の間でも異なることが報告されている (Hegde and Miller, 1990; Ells and McSay, 1991; Chung and Miller, 1995b; Chung and Miller, 1995a)。葉、生殖組織及びそれらの抽出物の他感作用は、根組織、根からの抽出物及び土壌滲出物の他感作用よりも強いことが報告されている (Chung and Miller, 1995b)。

10

15

アルファルファに含まれる複数の水溶性物質が他感作用に関係している可能性が示唆されている (Dornbos et al., 1990; Chon et al., 2006)。そのうちメディカルピン (medicarpin) は成熟したアルファルファ中で生成される物質であり、アルファルファの株数の減少が認められた土壌中で存在することが確認されている。メディカルピンの土壌への添加がアルファルファの苗の生育阻害を起すことが示されており、アルファルファの他感作用の原因物質として提唱されている (Dornbos et al., 1990)。しかしながら、これまでにアルファルファの他感作用の原因物質に関する結論は出されていない (Dornbos et al., 1990; Chon et al., 2006)。

20

25

本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片は、アルファルファの内在性遺伝子である *CCOMT* 遺伝子の一部であり (表 2, p20~22)、*CCOMT* 遺伝子断片から dsRNA が産生されることで内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。

30

本組換えアルファルファとは別イベントの *CCOMT* 蛋白質の発現が抑制された遺伝子組換えアルファルファを用いて、リグニン生合成経路の中間代謝産物及び二次代謝産物について調査が行われた研究報告によると、*CCOMT* 蛋白質の発現の抑制によって細胞壁中に結合するフェノール酸(リグニンと細胞壁を結び付ける)あるいはポリフェノールの含有量に変化は認められなかった (Chen et al., 2003; Chen et al., 2006)。また、*CCOMT* 蛋白質の発現を抑制した場合、茎においてカフェオイル-CoA から派生する経路の代謝産物であるカフェ

35

オイル 3-*O*-グルコシドが増加していることが確認されている (Chen et al., 2003)。しかしながら、葉ではカフェオイル 3-*O*-グルコシドは検出されず、総

ポリフェノールに違いは認められなかったことから、アルファルファにおいてカフェオイル 3-O-グルコシドは微量成分であると考えられた。さらに、水溶性フェノール化合物に関する多変量解析の結果から、対照のアルファルファと CCOMT 蛋白質の発現を抑制したアルファルファの葉の間で水溶性フェノール化合物の含有量には違いが認められなかった (Chen et al., 2003)。よって、アルファルファにおいて CCOMT 蛋白質の発現が抑制されることにより、目的以外の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

したがって、CCOMT 遺伝子断片の発現によって、本組換えアルファルファ中に新たな有害物質が産生されるとは考えにくい。

実際に、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間で、有害物質の産生性の有無を土壤微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験(第一の 2-(6)-②-g, p49) により比較検討した。その結果、調査したいずれの項目においても、本組換えアルファルファ区と対照の非組換えアルファルファ区との間に統計学的有意差は認められなかった。

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を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

—

(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、本組換えアルファルファは、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

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

アルファルファ (*M. sativa* L.) と自然交雑が可能と考えられる近縁種は多年生の *Medicago* 属の *M. prostrata*、*M. cancellata* 及び *M. saxatilis* の 3 種であるが (Michaud et al., 1988; Quiros and Bauchan, 1988; Small and Jomphe, 1989; Chandra et al., 2011)、これらは日本には自生していない (大橋, 1999; 大橋, 5 2003)。また、わが国に多年生の *Medicago* 属の植物としてコメツブウマゴヤシが自生しているが、交雑は起こらないと考えられる。したがって、交雑性に起因する生物多様性影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

10

(2) 影響の具体的内容の評価

—

15

(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

20

以上のことから、本組換えアルファルファは、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。

4 その他の性質

25

—

第三 生物多様性影響の総合的評価

5 競合における優位性：わが国では、アルファルファは明治初年に牧草として導入され、全国の平地から低山地の道端や草地に広く野生化している。しかし、アルファルファの生育は日本各地で報告されているものの、分布域は局所的で生育量は少ないとされている報告が多いことから、その生育地は点在しており、大きな群落を作るものではないと考えられた。また、アルファルファの幼植物は、その幼植物体が雑草との競合に弱く、播種前から生育時期全般を通じて雑草防除を必要とし、また、わが国の湿潤気候と酸性土壌には適さない。

10 さらに、わが国においてアルファルファは、日本固有の在来種を駆逐して生物多様性に影響を及ぼす外来種タンポポ種群 (*Taraxacum spp.*) やセイタカアワダチソウ (*Solidago altissima*) などのような侵略的外来種としては掲載されていない。

15 以上のことより、わが国の自然条件下において、アルファルファの生育した個体が増加して現在の分布が拡大する可能性は低く、かつ侵略的外来種のように優占群落をつくる可能性は低いと考えられた。

20 競合における優位性に関する項目として、形態及び生育の特性、成体の越冬性、花粉の稔性及びサイズをわが国の隔離ほ場において比較検討した。その結果、統計処理を行った項目において、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に統計学的有意差は認められなかった。また、統計処理を行わなかった項目においても、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に違いは認められなかった。また、生育初期における低温及び高温耐性並びに種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率を米国において調査した結果、種子の休眠性及び発芽率に関する項目において、無処理種子の正常発芽率、無処理種子の硬実種子率、種皮に傷を入れた種子の正常発芽率において本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの間で統計学的有意差が認められた。しかしながら、収穫種子の発芽率が上昇する場合、休眠性の指標となる埋土種子の減少につながるため、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファの間で認められた正常発芽率の増加及び硬実種子率の減少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。

35 なお、本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片はリグニン生合成経路の主要な酵素をコードする *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制する。

その結果本組換えアルファルファではリグニン含量が減少している。植物体中のリグニン含量が低下することにより植物体の構造が弱くなり、環境からの物理的ストレスに弱くなっていると考えられる。また、病害に対する抵抗性も低下する可能性が考えられる。しかしながら、リグニン含量の低下により考えられるこれらの変化は植物体を弱めるものであると考えられることから、競合における優位性を高めるとは考えにくい。一方で、本組換えアルファルファ植物体中のリグニン含量の低下により病害等に対する感受性が高まった場合、本組換えアルファルファ植物体で病害等が増殖し、他の野生植物の病害等が増加する可能性が考えられた。しかしながら、隔離ほ場試験において、病害及び害虫発生状況を調査した結果、本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間に病害及び害虫による傷害程度に違いは認められなかった。よって、本組換えアルファルファ植物体中のリグニン含量の低下により病害等に対する感受性が高まっているとは考えにくい。

したがって、本組換えアルファルファは競合における優位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。

有害物質の産生性：

本組換えアルファルファに導入された *CCOMT* 遺伝子断片は、アルファルファの内在性遺伝子である *CCOMT* 遺伝子の一部であり、*CCOMT* 遺伝子断片から dsRNA が産生されることで内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。

本組換えアルファルファとは別イベントの *CCOMT* 蛋白質の発現が抑制された遺伝子組換えアルファルファを用いて、リグニン生合成経路の中間代謝産物及び二次代謝産物について調査が行われた研究報告から、アルファルファにおいて *CCOMT* 蛋白質の発現が抑制されることにより、目的以外の代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は低いと判断された。

したがって、*CCOMT* 遺伝子断片の発現によって、本組換えアルファルファ中に新たな有害物質が産生されるとは考えにくい。

本組換えアルファルファと対照の非組換えアルファルファとの間で、有害物質の産生性の有無を土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験により比較検討した。その結果、調査したいずれの項目においても、本組換えアルファルファ区と対照の非組換えアルファルファ区との間に統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本組換えアルファルファは有害物質の産生性に起因する生物多様性影響を生ずるおそれはないと判断された。

交雑性：

アルファルファ (*M. sativa* L.) と交雑が可能と考えられる近縁種は多年生の *Medicago* 属の *M. prostrata*、*M. cancellata* 及び *M. saxatilis* の3種であるが、これらは日本には自生していない。また、わが国に多年生の *Medicago* 属の植物としてコメツブウマゴヤシが自生しているが、交雑は起こらないと考えられる。

5

以上のことから、本組換えアルファルファは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。

よって、総合的評価として、本組換えアルファルファを第一種使用規程に従って使用した場合に、わが国の生物多様性に影響を生ずるおそれはないと結論された。

10

参考文献

- Akin, D.E. 1988. Biological structure of lignocellulose and its degradation in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 21: 295-310.
- 5
- AOSA. 2010. AOSA Rules for testing seeds Vol. 4: Seedling evaluation. Association of Official Seed Analysts, Ithaca, New York.
- AOSA/SCST. 2010. Tetrazolium testing handbook. Association of Official Seed
10 Analysts and the Society of Commercial Seed Technologists, Ithaca, New York.
- Bagavathiannan, M.V., R.H. Gulden and R.C. Van Acker. 2011. The ability of alfalfa (*Medicago sativa*) to establish in a seminatural habitat under different seed dispersal times and disturbance. *Weed Science* 59: 314-320.
- 15
- Barker, R.F., K.B. Idler, D.V. Thompson and J.D. Kemp. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. *Plant Molecular Biology* 2: 335-350.
- 20
- Barnes, D.K. and C.C. Sheaffer. 1995. Alfalfa. Pages 205-216 in *Forage: An Introduction to Grassland Agriculture*. Volume 1. Fifth Edition. R.F. Barnes, D.A. Miller, and C.J. Nelson (eds.). Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Bass, L.N., C.R. Gunn, O.B. Hesterman and E.E. Roos. 1988. Seed physiology, seedling performance, and seed sprouting. Pages 961-983 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill, Jr. (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 25
- Bauchan, G.R. and J. J. H. Elgin. 1984. A new chromosome number for the genus *Medicago*. *Crop Science* 24: 193-195.
- 30
- Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from
35 transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.

- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
- 5 Bevan, M., W.M. Barnes and M.-D. Chilton. 1983. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385.
- Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
- 10 Bohart, G.E. 1957. Pollination of alfalfa and red clover. *Annual Review of Entomology* 2: 355-380.
- Bora, K.S. and A. Sharma. 2011. Phytochemical and pharmacological potential of *Medicago sativa*: A review. *Pharmaceutical Biology* 49: 211-220.
- 15 Bostock, S.J. 1978. Seed germination strategies of five perennial weeds. *Oecologia* 36: 113-126.
- Bowes, G.G. and A.G. Thomas. 1978. Longevity of leafy spurge seeds in the soil following various control programs. *Journal of Range Management* 31: 137-140.
- 20 Campbell, T.A. and Y. He. 1997. Factorial analysis of self-incompatibility in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 69-73.
- 25 Canevari, M., R.N. Vargas and S.B. Orloff. 2008. Weed management in alfalfa. Pages 113-130 in *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. C.G. Summers and D.H. Putnam (eds.). University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, California.
- 30 Chandra, A., S. Verma and K.C. Pandey. 2011. Genetic similarity based on isoenzyme banding pattern among fifty species of *Medicago* representing eight sections (*Fabaceae*). *Biochemical Systematics and Ecology* 39: 711-717.
- 35 Chen, F., A.L. Duran, J.W. Blount, L.W. Sumner and R.A. Dixon. 2003. Profiling phenolic metabolites in transgenic alfalfa modified in lignin biosynthesis. *Phytochemistry* 64: 1013-1021.

- Chen, F., M.S.S. Reddy, S. Temple, L. Jackson, G. Shadle and R.A. Dixon. 2006. Multi-site genetic modulation of monolignol biosynthesis suggests new routes for formation of syringyl lignin and wall-bound ferulic acid in alfalfa (*Medicago sativa* L.).
5 The Plant Journal 48: 113-124.
- Chon, S.U., J.A. Jennings and C.J. Nelson. 2006. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) autotoxicity: Current status. Allelopathy Journal 18: 57-80.
- 10 Chung, I.-M. and D.A. Miller. 1995a. Differences in autotoxicity among seven alfalfa cultivars. Agronomy Journal 87: 596-600.
- Chung, I.-M. and D.A. Miller. 1995b. Effect of alfalfa plant and soil extracts on germination and growth of alfalfa. Agronomy Journal 87: 762-767.
15
- Cock, J.M., R. Swarup and C. Dumas. 1997. Natural antisense transcripts of the S locus receptor kinase gene and related sequences in Brassica oleracea. Mol Gen Genet 255: 514-524.
- 20 Conn, J.S. and N.R. Werdin-Pfisterer. 2010. Variation in seed viability and dormancy of 17 weed species after 24.7 years of burial: The concept of buried seed safe sites. Weed Science 58: 209-215.
- Cooper, D.C. and R.A. Brink. 1940. Partial self-incompatibility and the collapse of
25 fertile ovules as factors affecting seed formation in alfalfa. Journal of Agricultural Research 60: 453-472.
- Copeland, L.O. and M.B. McDonald. 2001. Seed dormancy. Pages 140-164 in Principles of Seed Science and Technology. Fourth Edition. Kluwer Academic
30 Publishers, Boston, Massachusetts.
- Cramer, C.L., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S.L. Dildine, G.P. Bolwell, R.A. Dixon, C.J. Lamb and W. Schuch. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. Plant Molecular Biology 12: 367-383.
35
- Depicker, A., S. Stachel, P. Dhaese, P. Zambryski and H.M. Goodman. 1982. Nopaline

synthase: Transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573.

5 Dillehay, B.L., W.S. Curran and D.A. Mortensen. 2011. Critical period for weed control in Alfalfa. *Weed Science* 59: 68-75.

Dornbos, D.L., G.F. Spencer and R.W. Miller. 1990. Medicago delays alfalfa seed germination and seedling growth. *Crop Science* 30: 162-166.

10 Ells, J.E. and A.E. McSay. 1991. Allelopathic effects of alfalfa plant residues on emergence and growth of cucumber seedlings. *HortScience* 26: 368-370.

15 FAO-WHO. 1991. Strategies for assessing the safety of foods produced by biotechnology. Report of joint FAO/WHO consultation. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

20 FAO. 2009. Alfalfa management guide for Ningxia TCP/CPR/3104. United Nations Food and Agriculture Organization. http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/ningxia_guide/ningxia_guide.htm.

Ferreira, M.I. and C.F. Reinhardt. 2010. Field assessment of crop residues for allelopathic effects on both crops and weeds. *Agronomy Journal* 102: 1593-1600.

25 Fick, G.W., D.A. Holt and D.G. Lugg. 1988. Environmental physiology and crop growth. Pages 163-194 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

30 Fischer, A.J., J.H. Dawson and A.P. Appleby. 1988. Interference of annual weeds in seedling Alfalfa (*Medicago Sativa*). *Weed Science* 36: 583-588.

Fitzpatrick, S., P. Reisen and M. McCaslin. 2003. Pollen-mediated gene flow in alfalfa: A three-year summary of field research. Proceedings of the 2003 Central Alfalfa Improvement Conference, Virtual Meeting.

35 Fling, M.E., J. Kopf and C. Richards. 1985. Nucleotide sequence of the transposon Tn7

gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-*O*-nucleotidyltransferase. Nucleic Acids Research 13: 7095-7106.

5 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983a. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 4803-4807.

10 Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffmann and S.C. Woo. 1983b. Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80: 4803-4807.

15 Fridriksson, S. and J.L. Bolton. 1963. Development of the embryo of *Medicago sativa* L. after normal fertilization and after pollination by other species of *Medicago*. Canadian Journal of Botany 41: 23-33.

20 Fryer, J.R. 1930. Cytological studies in *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonella*. Canadian Journal of Research 3: 3-50.

Fukuhara, T., H. Moriyama, J.Y. Pak, H. Hyakutake and T. Nitta. 1993. Enigmatic double-stranded RNA in Japonica rice. Plant Mol Biol 21: 1121-1130.

25 Giza, P.E. and R.C.C. Huang. 1989. A self-inducing runaway-replication plasmid expression system utilizing the Rop protein. Gene 78: 73-84.

30 Gould, A.R. and R.I. Francki. 1981. Immunochemical detection of ds-RNA in healthy and virus-infected plants and specific detection of viral ds-RNA by hybridization to labelled complementary DNA. J Virol Methods 2: 277-286.

35 Guo, D., F. Chen, K. Inoue, J.W. Blount and R.A. Dixon. 2001. Downregulation of caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-*O*-methyltransferase in transgenic alfalfa: Impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin. Plant Cell 13: 73-88.

Hammon, B., C. Rinderle and M. Franklin. 2006. Pollen movement from alfalfa seed

production fields. Colorado State University Cooperative Extension, Grand Junction, Colorado.

5 Hancock, D.W., G.D. Buntin, L.O. Ely, R.C. Lacy, G.L. Heusner and R.L. Stewart. 2009. Alfalfa management in Georgia. University of Georgia Cooperative Extension, Athens, Georgia.

10 Hanson, C.H. 1961. Longevity of pollen and ovaries of alfalfa. *Crop Science* 1: 114-116.

Hegde, R.S. and D.A. Miller. 1990. Allelopathy and autotoxicity in alfalfa: Characterization and effects of preceding crops and residue incorporation. *Crop Science* 30: 1255-1259.

15 Heisel, S.E., Y. Zhang, E. Allen, L. Guo, T.L. Reynolds, X. Yang, D. Kovalic and J.K. Roberts. 2008. Characterization of unique small RNA populations from rice grain. *PLoS One* 3: e2871.

20 Hill, R.R. 1983. Heterosis in population crosses of alfalfa. *Crop Science* 23: 48-50.

Inoue, K., V.J.H. Sewalt, G.M. Ballance, W. Ni, C. Stürzer and R.A. Dixon. 1998. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology* 117: 761-770.

25 Ivashuta, S.I., J.S. Petrick, S.E. Heisel, Y. Zhang, L. Guo, T.L. Reynolds, J.F. Rice, E. Allen and J.K. Roberts. 2009. Endogenous small RNAs in grain: Semi-quantification and sequence homology to human and animal genes. *Food and Chemical Toxicology* 47: 353-360.

30 Jennings, J.A. and C.J. Nelson. 2002a. Rotation interval and pesticide effects on establishment of alfalfa after alfalfa. *Agronomy Journal* 94: 786-791.

35 Jennings, J.A. and C.J. Nelson. 2002b. Zone of autotoxic influence around established alfalfa plants. *Agronomy Journal* 94: 1104-1111.

- Jensen, P.D., Y. Zhang, B.E. Wiggins, J.S. Petrick, J. Zhu, R.A. Kerstetter, G.R. Heck and S.I. Ivashuta. 2013. Computational sequence analysis of predicted long dsRNA transcriptomes of major crops reveals sequence complementarity with human genes. *GM Crops and Food* 4: 90-97.
- 5
- Kusaba, M. 2004. RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139-143.
- Lam, K.C., R.K. Ibrahim, B. Behdad and S. Dayanandan. 2007. Structure, function, and evolution of plant *O*-methyltransferases. *Genome* 50: 1001-1013.
- 10
- Lesins, K. 1961. Interspecific crosses involving alfalfa. II. *Medicago cancellata* M.B. x *M. sativa* L. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 3: 316-324.
- 15
- Lesins, K. 1962. Interspecific crosses involving alfalfa. III. *Medicago sativa* L. x *M. prostrata* Jacq. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 4: 14-23.
- Lesins, K. 1970. Interspecific crosses involving alfalfa. V. *Medicago saxatilis* x *M. sativa* with reference to *M. cancellata* and *M. rhodopaea*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 12: 80-86.
- 20
- Lesins, K.A. and I. Lesins. 1979. Evolution in *Medicago*. Pages 46-58 in *Genus Medicago (Leguminosae): A Taxogenetic Study*. Dr. W. Junk by Publishers, The Hague, Netherlands.
- 25
- Leyva, A., X. Liang, J.A. Pintor-Toro, R.A. Dixon and C.J. Lamb. 1992. *cis*-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4: 263-271.
- 30
- McCoy, T.J. and E.T. Bingham. 1988. Cytology and cytogenetics of alfalfa. Pages 737-776 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 35
- Michaud, R., W.F. Lehman and M.D. Rumbaugh. 1988. World distribution and historical development. Pages 25-91 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson,

- D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 5 Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812.
- 10 OECD. 2005. Consensus document on compositional considerations for new varieties of alfalfa and other temperate forage legumes: Key feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2005)13. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
- Oldemeyer, R.K. 1956. Interspecific hybridization in *Medicago*. *Agronomy Journal* 48: 584-585.
- 15 Parrott, W., B. Chassy, J. Ligon, L. Meyer, J. Petrick, J. Zhou, R. Herman, B. Delaney and M. Levine. 2010. Application of food and feed safety assessment principles to evaluate transgenic approaches to gene modulation in crops. *Food and Chemical Toxicology* 48: 1773-1790.
- 20 Petrick, J.S., B. Brower-Toland, A.L. Jackson and L.D. Kier. 2013. Safety assessment of food and feed from biotechnology-derived crops employing RNA-mediated gene regulation to achieve desired traits: A scientific review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 66: 167-176.
- 25 Putnam, D.H., S.B. Orloff and L.R. Teuber. 2007. Choosing an alfalfa variety. Publication 8291. Pages 1-15 in *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. C.G. Summers and D.H. Putnam (eds.). University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, California.
- 30 Quiros, C.F. and G.R. Bauchan. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. Pages 93-124 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 35 Rumbaugh, M.D., J.L. Caddel and D.E. Rowe. 1988. Breeding and quantitative

- genetics. Pages 777-808 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and J. R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 5 Sangduen, N., G.L. Kreitner and E.L. Sorensen. 1983a. Light and electron microscopy of embryo development in an annual x perennial *Medicago* species cross. *Canadian Journal of Botany* 61: 1241-1257.
- 10 Sangduen, N., E.L. Sorensen and G.H. Liang. 1982. A perennial x annual *Medicago* cross. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 24: 361-365.
- Sangduen, N., E.L. Sorensen and G.H. Liang. 1983b. Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. *Euphytica* 32: 527-534.
- 15
- Seguin, P., C.C. Sheaffer, M.A. Schmitt, M.P. Russelle, G.W. Randall, P.R. Peterson, T.R. Hoverstad, S.R. Quiring and D.R. Swanson. 2002. Alfalfa autotoxicity: Effects of reseeding delay, original stand age, and cultivar. *Agronomy Journal* 94: 775-781.
- 20 Sheaffer, C.C., G.D. Lacefield and V.L. Marble. 1988. Cutting schedules and stands. Pages 411-437 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 25 Siomi, H. and M.C. Siomi. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 457: 396-404.
- Small, E. and M. Jomphe. 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67: 3260-3294.
- 30
- Smith, D. 1961. Association of fall growth habit and winter survival in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 41: 244-251.
- Southworth, W. 1928. Influences which tend to affect seed production in alfalfa and an attempt to raise a high seed-producing strain by hybridization. *Scientific Agriculture* 9: 1-29.
- 35

- St. Amand, P.C., D.Z. Skinner and R.N. Peadar. 2000. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 107-114.
- 5
- Stalker, D.M., C.M. Thomas and D.R. Helinski. 1981. Nucleotide sequence of the region of the origin of replication of the broad host range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics* 181: 8-12.
- 10
- Steele, K.P., S.M. Ickert-Bond, S. Zarre and M.F. Wojciechowski. 2010. Phylogeny and character evolution in *Medicago* (Leguminosae): Evidence from analyses of plastid *trnK/matK* and nuclear *GA3ox1* sequences. *American Journal of Botany* 97: 1142-1155.
- Tesar, M.B. 1993. Delayed seeding of alfalfa avoids autotoxicity after plowing or glyphosate treatment of established stands. *Agronomy Journal* 85: 256-263.
- 15
- Teuber, L.R. and M.A. Brick. 1988. Morphology and anatomy. Pages 125-162 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
- 20
- Teuber, L.R., S. Mueller, A. Van Deynze, S. Fitzpatrick, J.R. Hagler and J. Arias. 2007. Seed-to-seed and hay-to-seed pollen mediated gene flow in alfalfa. Page 204 in 2007 North Central Weed Science Society Proceedings, Champaign, Illinois.
- 25
- U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register* 57: 22984-23005.
- UC-IPM. 2010. UC IPM pest management guidelines - Alfalfa. Statewide IPM Program. University of California, Oakland, California. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/PMG/index.html> [Accessed August 24, 2011].
- 30
- Undersander, D., D. Cosgrove, E. Cullen, C. Grau, M.E. Rice, M. Renz, C. Sheaffer, G. Shewmaker and M. Sulc. 2011. *Alfalfa management guide*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc, Madison, Wisconsin.
- 35

Undersander, D., M. McCaslin, C. Sheaffer, D. Whalen, D. Miller, D. Putnam and S. Orloff. 2009. Low lignin alfalfa: Redefining the yield/quality tradeoff. 2009 Western Alfalfa & Forage Conference, Reno, Nevada.

5

USDA-AMS. 2011. State Noxious-Weed Seed Requirements Recognized in the Administration of the Federal Seed Act. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service., Washington, D.C. <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELPRDC5090172>

10 [Accessed October 19, 2011].

USDA-APHIS. 2010. Glyphosate-tolerant alfalfa events J101 and J163: Request for nonregulated status: Final environmental impact statement-December 2010. U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Washington, D.C.

15

USDA-GRIN. 2007. GRIN taxonomy for plants. U.S. Department of Agriculture, National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. . <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/exsplist.pl> [Accessed August 12, 2011].

20

USDA-NASS. 2010. Noncitrus fruits and nuts: 2009 preliminary summary. U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Statistics Service, Washington, D.C. <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1113> [Accessed August 13, 2010].

25

USDA. 2007. 2007 census of agriculture. AC-07-A-51. Washington, D.C.

Van Deynze, A.E., S. Fitzpatrick, B. Hammon, M.H. McCaslin, D.H. Putnam, L.R. Teuber and D.J. Undersander. 2008. Gene flow in alfalfa: Biology, mitigation, and potential impact on production. No. 28. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa.

30

Vance, C.P., T.K. Kirk and R.T. Sherwood. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. Annual Review of Phytopathology 18: 259-288.

35

Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph and W. Boerjan. 2010. Lignin

biosynthesis and structure. *Plant Physiology* 153: 895-905.

Vansell, G.H. and F.E. Todd. 1946. Alfalfa tripping by insects. *Agronomy Journal* 38: 470-488.

5

Viands, D.R., P. Sun and D.K. Barnes. 1988. Pollination control: Mechanical and sterility. Pages 931-960 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

10

Vieira, J. and J. Messing. 1987. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology* 153: 3-11.

Weishaar, M.A., E.C. Brummer, J.J. Volenec, K.J. Moore and S. Cunningham. 2005.

15

Improving winter hardiness in nondormant alfalfa germplasm. *Crop Science* 45: 60-65.

Weston, T.R., V. Nayigihugu and B.W. Hess. 2006. Comparison of techniques for quantitative analysis of acid detergent lignin in roughages. Pages 242-244 in *Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science*, Champaign, Illinois.

20

Wilsie, C.P. 1958. Effect of inbreeding on fertility and vigor of alfalfa. *Agronomy Journal* 50: 182-185.

25

Xuan, T.D. and E. Tsuzuki. 2002. Varietal differences in allelopathic potential of alfalfa. *Journal of Agronomy and Crop Science* 188: 2-7.

Zambryski, P., A. Depicker, K. Kruger and H.M. Goodman. 1982. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: Analysis of the boundaries of T-DNA. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 361-370.

30

Zhou, R., L. Jackson, G. Shadle, J. Nakashima, S. Temple, F. Chen and R.A. Dixon. 2010. Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 17803-17808.

35

- 浅沼昌平・狩山俊悟・榎本敬・小畠裕子 1987 岡山県の帰化植物 倉敷市立自然史博物館 岡山
- 5 上野昌彦 1987 16. 飼肥料作物 マメ科 アルファルファ. 農学大辞典 第2次増訂改版 農学大事典編集委員会 (編) 養賢堂 東京 pp.762-763
- 大分県植物誌刊行会 1989 新版 大分県植物誌 大分
- 10 太田久次 1999 鈴鹿市の帰化植物 ムツミ企画 三重
- 太田久次 2010 三重県帰化植物誌 ムツミ企画 三重
- 15 大橋広好 1999 マメ科 【10】ウマゴヤシ属 1 ムラサキウマゴヤシ. 新装版 日本の野生植物 草本 II 離弁花類 佐竹 義輔・大井 次三郎・北村 四郎・亘理 俊次・冨成 忠夫(編) 平凡社 東京 p.194
- 大橋広好 2003 マメ科 【16】ウマゴヤシ属 8 ムラサキウマゴヤシ. 日本の帰化植物 清水建美 (編) 平凡社 東京 p.113
- 20 亀岡暄一 (編) 1998 アルファルファ アルファルファミール. 新編 飼料 ハンドブック 社団法人 日本科学飼料協会 東京 pp.13-14
- 財務省 2013 財務省貿易統計 財務省
<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed Nov 27, 2013].
- 25 清水矩宏・森田弘彦・廣田伸七(編・著) 2001 ムラサキウマゴヤシ. 日本帰化植物写真図鑑 -Plant invader 600 種- 全国農村教育協会 東京 p.138
- 30 杉野孝雄 2008 静岡県の帰化植物 富士常葉大学附属環境防災研究所 静岡
- 鈴木信治 1992 マメ科牧草 アルファルファ(ルーサン) -その品種・栽培・利用- 雪印種苗株式会社 北海道
- 35 飼料分析基準研究会 (編著) 2004 第3章 4 粗繊維. 飼料分析法・解説 社団法人 日本科学飼料協会 東京 pp.3-19-3-26

日本生態学会(編) 2002 外来種ハンドブック 村上興正、鷺谷いづみ (監修)
株式会社 地人書館 東京

- 5 廣井清貞 2004 第Ⅱ章 品種開発に関する研究動向 2. マメ科牧草 2) アル
ファルファ. 農林水産研究文献解題 No. 29 飼料作物の栽培・利用技術 農林水
産省 東京 pp. 89-92

北海道 2010 北海道の外来種リスト -北海道ブルーリスト 2010-
<http://bluelist.ies.hro.or.jp/db/detail.php?k=08&cd=201> [Accessed Jan 20, 2014]

10

前田泰生・真木芳助 1973 アルファルファの有力野生の深索に関する研究.
東北農業試験場虫害第1研究室資料 第30号 東北農業試験場 岩手
pp.121-125

- 15 松村哲夫 2010 高品質自給粗飼料生産の拡大を目指しましょう! ~マメ科牧
草「アルファルファ」の活用~ 牧草と園芸 第58巻4号:1-8

- 20 水上優子、神戸三智雄 2005 3)-2 アルファルファの花粉移動性及び導入遺伝子の
影響の評価 ウ 結果. 研究成果第428集「遺伝子組換え体の産業利用における安
全性確保総合研究」 農林水産省 農林水産技術会議事務局 東京 pp.49-50

水田光雄 1998 神戸港の帰化植物調査(完結) 兵庫の植物 8:39-59

- 25 横山雅一 1991 神戸周辺の帰化植物観察ノート 兵庫の植物 創刊号:123-128

緊急措置計画書

平成 26 年 2 月 24 日

5

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根 精一郎
住所 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

10

第一種使用規程の承認を申請している低リグニンアルファルファ(*CCOMT, Medicago sativa L.*) (KK179, OECD UI: MON-00179-5) (以下「本組換えアルファルファ」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、科学的判断された場合、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は以下に示すとおりである。

平成 26 年 2 月現在

| 委員 | |
|----|---------------------------------------------------------------------|
| * | 日本モンサント株式会社 代表取締役社長 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号 (電話番号 03-6226-6080) |
| | 日本モンサント株式会社 農薬規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 部長 |
| | 日本モンサント株式会社 広報部 |

20

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

5 弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、種子、穀物生産、収穫物の状況に関し、種子生産、種子供給、販売、穀物取扱業者など使用の可能性が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

10

弊社は、モンサント・カンパニーと連絡をとり、生産農家や穀物取扱業者などの取引ルートへ本組換えアルファルファの適切な管理、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。

15 4 遺伝子組換え生物等を不活化し又は拡散防止措置を執ってその使用等を継続する

ための具体的な措置の内容

20

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、モンサント・カンパニーの協力のもと、本組換えアルファルファ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アルファルファに対し、科学的根拠に基づきリスクの程度に応じて、速やかに機動的な対応を行う。

25 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。

30

低リグニンアルファルファ(*CCOMT*, *Medicago sativa* L) (KK179, OECD UI: MON-00179-5)の別添資料リスト

- 別添資料 1 Amended Report for MSL0023982: Composition of Lignin of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024403) (社外秘)
- 別添資料 2 Analyses of Lignin in Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024120) (社外秘)
- 別添資料 3 Sequence of Genetic Elements in PV-MSPQ12633 (社外秘)
- 別添資料 4 Summary of PCR analysis to confirm the absence of *Agrobacterium tumefaciens* used to produce KK179 (MSL0025515) (社外秘)
- 別添資料 5 Heritability of the KK179 insert in the MBC2, MBC3, and Syn1 Populations (RPN-2010-0705) (社外秘)
- 別添資料 6 Molecular Characterization of Reduced Lignin Alfalfa KK179 (MSL0023299) (社外秘)
- 別添資料 7 Stability of the DNA Insert in KK179 Across Multiple Generations (REG-2011-0081) (社外秘)
- 別添資料 8 Lignin Analysis of Forage from Multiple Generations of KK179 Alfalfa (RAR-2011-0129) (社外秘)
- 別添資料 9 Demonstration of the Presence or Absence of *CCOMT* Transcripts in Alfalfa Forage Samples across Multiple Generations of KK179 (MSL0024762) (社外秘)
- 別添資料 10 Alfalfa KK179-2 EndPoint TaqMan PCR with *PUB* Internal Control (BQ-QC-10768-01) (社外秘)

- 別添資料 11 低リグニンアルファルファ(*CCOMT, Medicago sativa* L.) (KK179, OECD UI: MON-00179-5) の隔離ほ場における生物多様性影響評価試験結果報告書
- 別添資料 12 An Assessment of the Effect of Cold Stress on Biotechnology Derived Alfalfa KK179 under Growth Chamber Conditions (PLC-2011-0007) (社外秘)
- 別添資料 13 An Assessment of the Effect of Heat Stress on Biotechnology Derived Alfalfa KK179 under Growth Chamber Conditions (PLC-2011-0007) (社外秘)
- 別添資料 14 Phenotypic Evaluation During Seed Production of Biotechnology Derived Alfalfa KK179 in a U.S. Field Trial During 2010 (FGI-10-001) (社外秘)
- 別添資料 15 Dormancy and Germination Evaluation of Biotechnology Derived Alfalfa KK179 Using Seed Produced in a Greenhouse (PLC-10-212) (社外秘)
- 別添資料 16 モニタリング結果報告書 (社外秘)