

除草剤グリホサート耐性アルファルファ(*cp4 epsps, Medicago sativa L.*)

(J101×J163, OECD UI:MON-00101-8×MON-00163-7) 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の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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..... 2
- (2) 使用等の歴史及び現状..... 3
- (3) 生理学的及び生態学的特性..... 5

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

- (1) 供与核酸に関する情報..... 8
- (2) ベクターに関する情報..... 14
- (3) 遺伝子組換え生物等の調製方法..... 14
- (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... 16
- (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... 18
- (6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違..... 18

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

- (1) 使用等の内容..... 24
- (2) 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..... 24
- (3) 国外における使用等により得られた情報..... 24

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

- 1 競合における優位性..... 25
- 2 有害物質の産生性..... 26
- 3 交雑性..... 27

第三 生物多様性影響の総合的評価..... 29

緊急措置計画書..... 30

第一種使用規程承認申請書

平成 16 年 7 月 14 日

農 林 水 産 大 臣 亀 井 善 之 殿
環 境 大 臣 小 池 百 合 子 殿

申請者 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 印
住所 東京都中央区銀座 4-10-10
銀座山王ビル 8F

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	除草剤グリホサート耐性アルファルファ (<i>cp4 epsps, Medicago sativa</i> L.) (J101×J163, OECD UI:MON-ØØ1Ø1-8×MON-ØØ163-7)
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の内容	食用又は飼料用に供するための使用、栽培、加工、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法	—

生物多様性影響評価書の概要

第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報

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

イ. 和名:アルファルファ、ムラサキウマゴヤシ 英名:Alfalfa, Lucerne 学名:*Medicago sativa* L.

ロ. 宿主はマメ科に属する多年生植物である *Medicago* 属に属するアルファルファ (*Medicago sativa* L.) の育種母本群である R2336 系統で、*M. sativa* subsp. *sativa* に属する。

ハ. アルファルファ(*Medicago sativa* L.)の起源は小アジア、トランスコーカシア、トルクメニスタン、イランと考えられている。その後地中海沿岸、北アフリカ、中東、ヨーロッパ、シベリア、北インド、中国に広がり定着した。

アルファルファ(*Medicago sativa* L.)はお互いに容易に交雑可能で同じ核型を有する複数の亜種によって構成される種である。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。アルファルファの黄花種である2倍体もしくは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・耐旱性の遺伝資源として *M. sativa* L. subsp. *sativa* の品種改良に利用されるほか、一部の寒冷地(カナダ、シベリア)では小規模に主に放牧地で栽培利用されている。*M. sativa* L.に属するその他の亜種としては subsp. *glutinosa* がある。その他、前述した3亜種が様々な程度に交雑した交雑種(subsp. *sativa* と subsp. *falcata* L.の間の交雑種で、俗に雑色アルファルファと呼ばれる *M. sativa* L. subsp. x *varia* 等)も *Medicago sativa* L.に含まれる。

なお、アルファルファの分類として *M. sativa* L. *falcata* L.や *M. sativa* L. x *varia*(別名 *M. media* Pers.)を *M. sativa* L.とは別の種とする分類法もあるが、近年ではこれらと *M. sativa* L. *sativa* の間に明確な生殖隔離機構がないことから亜種として扱われている。

アルファルファは有史以前から栽培された最古の牧草といわれている。栽培アルファルファの起源には複数の系統がある。主な系統2つのうち1つは小アジア、ト

ランスコーカシアにかけての高原地帯からヨーロッパと北アフリカへ拡大し、近代ヨーロッパ型 *M. sativa* L. subsp. *sativa* の原型となった系統である。他の 1 つは中央アジア原産の *M. sativa* L. subsp. *sativa* であり、細菌性萎凋病、ステムネマトーダなどに対する抵抗性遺伝資源として利用されている。このように、ごく限られた地域の 2 系統の *M. sativa* L. subsp. *sativa* がアルファルファの基本的な起源とされている。

M. sativa L. subsp. *falcata* L. も中央アジア原産と考えられ、シベリア極北部からヨーロッパ地域まで分布し、耐寒性が強い。これが、近代アルファルファを形成する過程で耐寒性の主要遺伝資源として重要な役割を果たした。尚、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、日本国内よりもはるかに大面積で栽培が行われているが、問題雑草リストにはアルファルファの記載はない。

わが国では、アルファルファは明治初年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。実際にその生育が観察された地域としては、旭川、秋田、静岡、三重、神戸、徳島、佐賀、大分の路傍や空地、樹園地などが挙げられる。また、これら野生化したアルファルファの侵入経路の一例としては、道路整備、公園整備、緑化事業等の際に輸入された農業資材(花木草本種子)への混入が挙げられている。

しかし、その一方で岐阜大学、農林水産省草地試験場、愛知県農業総合試験場が協力して国内に自生する *Medicago* 属植物についての情報を収集した結果、わが国に自生していたのは、貿易港近くに生育していた種を除くと、いずれも一年生で自殖性のウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)、モンツキウマゴヤシ(*M. arabica*)、コウマゴヤシ(*M. minima*)の 4 種のみで、アルファルファの自生は認められなかった。

以上のことより、アルファルファの自生は日本各地で報告されているものの、調査基準によっては自生化していないと判断されている報告例もあることから、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

イ. アルファルファは最も栽培の歴史の古い牧草であり、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。アルファルファは紀元前 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 年のギリシャ、紀元前 200 年のローマへと導入され、中国へは紀元前 126 年にロシアのトルキスタン地方から導入され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導入された。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。

米国では1997年にアルファルファ単植あるいはイネ科牧草との混植によって、主にカリフォルニア、コロラド、アイダホ、アイオワ、カンサス、ミシガン、ミネソタ、モンタナ、ネブラスカ、ノースダコタ、ペンシルバニア、サウスダコタ及びウィスコンシンの13州を中心に2,300万エーカー(約930万ha)以上で栽培されている。

ロ. わが国では、現在、北海道を中心に栽培されているが、アルファルファは雑草との競合に弱く、その草地には多くの草種の雑草が侵入しやすい。そのため、播種前から生育時期全般を通じて雑草対策が必要である。しかし今のところ防除は困難であること、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、わが国の高温多湿の条件には適さないなど栽培の難しさからその栽培面積はおよそ9,000ha前後とあまり普及していない。

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、その収穫物は主に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(新編・飼料ハンドブック,平成10年)。また、アルファルファ・スプラウト(発芽もやし)が食品としても利用されている。尚、牧草としてのアルファルファ種子と発芽もやし用の種子では種子単価が大幅に異なっており、発芽もやし用の種子は契約栽培で牧草用種子とは別の市場で発芽もやし専用として生産・流通・販売されている。

わが国は国内栽培用等種子として約85トン米国(約80トン)、フランス(約4トン)、そしてオーストラリア(約1トン)から輸入している。アルファルファの牧草としての需要は大きく、平成12年にアルファルファミール及びペレットを約20万トン輸入しており、これは40万haの栽培面積分に相当する。上位輸出4国はカナダ(約15万トン)、オランダ(約2.7万トン)、米国(約1.5万トン)、イタリア(約0.9万トン)である。

アルファルファは他殖性であり、自殖して遺伝的に固定すると自殖弱勢が生ずる。このため商業品種は遺伝的に優れた複数の系統をほ場で交雑させて得た合成品種を用いるため、品種内でも遺伝的に固定されていない。

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、温暖な府県では一般的に秋播きである。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であり、10aあたり窒素5kg、リン酸20～30kg、カリ10kgを基肥として施肥する。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

供用し、前作物のうちから除草を徹底するなどの配慮が必要である。刈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刈りを行う事が推奨されている。

(3) 生理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、3小葉からなる。草丈は50～150cmに達し、茎は個体当たり5～25本、よく生長した大株では50本以上の茎を生じ、これらは株元の株冠(Crown)から直立する。

ロ. 生息又は生育可能な環境の条件

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℃、夏は+16℃～+27℃の範囲である。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1,000～2,000mmであり、世界的に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。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。また、アルファルファは雑草との競合に弱いため、雑草が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。播種適期は春播きの場合旬間平均気温9～11℃で、秋播きの場合は20℃前後とされる。

上記のことから、わが国の自然条件下で発生して雑草化した個体が増加してその分布が拡大する可能性は非常に少ないと考えられる。実際にわが国において、アルファルファが問題雑草化した事例は報告されていない。

ハ. 繁殖又は増殖の様式

- ① 裂莢性の程度は低い。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。
- ② 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、これによって株が増える事はない。植物体は刈り取りや地上部枯死後に株冠(Crown)が生じて越冬し、その翌年に株冠から新たな分茎(Shoot)が再生する。尚、耐寒性の強い品種では秋期休止性が強く、秋の短日・定温条件下で生育がすみやかに休止し越冬に備える傾向にある。
- ③ アルファルファは自家不和合性の強い他殖性植物であり、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。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。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為の機構で、トリッピングと呼ばれる。しかしアルファルファはわが国では訪花昆虫が少なく、昆虫が訪花してもトリッピングの効率が高い昆虫種に限られるため受粉効率が低い。国内での育種等を行い種子を生産する場で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。

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 *M. prostrata* と *M. glomerata* の2種であるが、これらは日本には存在しない。

なお、参考として、わが国に自生するアルファルファの近縁野生種には、全国の海岸や平地の道端に生育しているウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、平地の空き地に生えるキレハウマゴヤシ(*M. laciniata* L. 別名 *M. polymorpha* L. var. *laciniata*)、トゲミノウマゴヤシ(*M. ciliaris* L. 別名 *M. polymorpha* L. var. *ciliaris* L.)、海岸近くの空き地に生えるウズマキウマゴヤシ(*M. orbicularis* 別名 *M. polymorpha* L. var. *orbicularis* L.)、全国の海岸や平地の道端、芝生に生育するコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)、西日本に稀に見られるモンツキウマゴヤシ(*M. arabica*)、ややまれに本州に生育しているコウマゴヤシ(*M. minima*)、1995年に始めてわが国で確認されたタルウマゴヤシ(*M. truncatula*)の8種が挙げられ、これらは全て一年生である。なお、この中で明治以前に移入された種はウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の2種である。

しかし、一年生と多年生の *Medicago* 属の間では人工交雑はできず、また、自然界でも両種の間雑種は確認されていない事から、アルファルファと一年生の *Medicago* 属は遺伝的に不親和性であると考えられている。*Medicago* 属の遺伝、分類、育種分野におけるアルファルファの専門家に対し、自然条件における一年生の *Medicago* 属とアルファルファとの交雑の可能性について質問したところ、彼らの返答は多年生の *Medicago* 属と一年生の *Medicago* 属の間では自然交雑の可能性は著しく低く、長年の多数の研究者の試みにもかかわらず成功例はないというものであった。

実際に、アルファルファとウマゴヤシ(*M. polymorpha* L.)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。

また、アルファルファ(*M. sativa* L.)と コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の間の交雑については、これらの雑種と考えられる個体に関する文献が過去に発表されているが、植物体は完全に不稔性であり種子を生産する事は無かったため、これら

の研究者による続報の報告はない。専門家は、これらの文献で取り上げられた植物体は分子マーカーを利用して雑種であることを検定してはいないため、本当に雑種起源のものであったかどうかは疑わしく、専門家により追試が行われたものの、交雑が繰り返し成功する事はなかったとしている。

更に、報告によると、アルファルファの柱頭に *Medicago* 属と遺伝的に高度に不親和性であると考えられる 8 種(コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)と カギユウソウ(*M. scutellata*)を含む) を受粉させ、その後の胚発生の過程を観察した。コメツブウマゴヤシ では胚発生の開始のみ確認されたものの、コメツブウマゴヤシを含む全ての交雑例で正常な胚は形成されなかった。従って、コメツブウマゴヤシとの間での受精の証拠は得られなかった。

以上から、ウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)との交雑の可能性は考えられず、評価の対象となるアルファルファと交雑可能な近縁野生種はわが国には存在しないと考えられた。

- ④ 花粉は球状で直径約 $32\ \mu\text{m}$ であり、1 花あたり約 2,500 粒の花粉を産生する。花粉の寿命は約 1 時間である。花粉の飛散距離に関しては、米国で従来アルファルファを用い、*glutamine synthase (GS)* 遺伝子マーカー及び自殖/他殖を区別できる RAPD マーカーを利用して試験が行われた。1m 径($<0.1\text{m}^2$)の花粉源アルファルファを設置した小規模実験ほ場の場合、GS マーカーを利用して測定した結果、自然交雑率は 4m で 0.2%、6m 以上では 0% であった(St. Amand et al., 2000)。一方、一般ほ場規模($\sim 10000\text{m}^2$ 程度)の花粉源から任意の距離(0, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000m)に 12 箇所(1m 径)の交雑確認区を設け、RAPD マーカーを利用し各区における自然交雑率を測定した結果、最も遠い 1000m 離れた地点においても、25~35% の高い交雑率を示した(St. Amand et al., 2000)。この高い交雑率は、(1)各交雑確認区に用いた株は、栄養繁殖で得られた遺伝的クローンである為、自家不和合性の強いアルファルファの特性上、自殖種子を形成しにくいこと、(2)その結果、少数の稔実種子中で他殖種子率が高まること(収穫種子数は論文に記述が無い)、(3)設定した花粉源以外からの花粉による交雑の可能性があること、等の理由が考えられる。以上のことから、本試験ではアルファルファの花粉の自然条件下での最大飛散距離は考察できるが、交雑率に関しては自然条件下で起こりうる割合よりも高く見積もられていると判断された。

尚、米国では実際に本組換えアルファルファを使って従来アルファルファとの自然交雑率も調査している(McCaslin et al., 2001)。この試験では、採種圃場を想定して本組換えアルファルファ栽培区を花粉源として 1 エーカー($4,047\ \text{m}^2$)作り、そこから任意の距離をとって従来アルファルファによる 4 箇所(0.03 エーカー)の交雑確認区を設け、各交雑確認区における本組換えアルファルファと従来アルファルファの交雑率を調査している。その結果、本組換えアルファルファと従来ア

ルファルファとの自然交雑率は、花粉源からの距離が 500 フィート (約 174m) で 1.39%、1,000 フィート(約 348m)で 0.32%、1,500 フィート(約 522m)で 0.07%、そして 2,000 フィート(約 610m)で 0%であった。

ニ. 有害物質の産生性

アルファルファにはアルファルファ自身及び他の植物種の生育を阻害する水溶性の他感作用物質が、茎葉や根などの植物組織から放出されることが明らかにされている。Ramish らはアルファルファの根のみまたは根と地上部を鋤き込んだ土壌では、アルファルファ及びソルガムの発芽率・草丈・植物体重が減少し、また幼苗からの水溶性物質がアルファルファ及びソルガムの発芽及び根の伸長を阻害することを報告している。また、川田らは水耕栽培したアルファルファの根からの滲出物から捕集した疎水性または半疎水性の有機物を酸性・中性・塩基性に分画したところ、中性画分が最もレタスの発芽を抑制する事、また、この中性画分は畑作物 4 種、牧草 6 種の発芽及び幼根の伸長を阻害するが、その阻害程度は植物種間で差異があることを報告している。しかし、これまでにアルファルファの他感物質は同定されていない。

2 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

(1) 供与核酸に関する情報

イ. 構成及び構成要素の由来

除草剤グリホサート耐性アルファルファ J101 系統(*cp4 epsps, Medicago sativa* L.)(J101, OECD UI No : MON-00101-8)(以下、J101 とする)と除草剤グリホサート耐性アルファルファ J163 系統 (*cp4 epsps, Medicago sativa* L.)(J163, OECD UI No : MON-00163-7) (以下、J163 とする)を p7 以降に後述する育種法を用いて育成した合成品種である J101 x J163(*cp4 epsps x cp4 epsps, Medicago sativa* L.) (J101 x J163, OECD UI No : MON-00101-8 x MON- 00163-7) (以下「本スタック系統アルファルファ」とする) は、親系統である J101 と J163 の 2 つの組換えアルファルファのそれぞれの特性を有する。したがって、以下では J101 と J163 の調製等に関する情報について述べた。尚、J101 と J163 は同一のベクターと調製方法で作出された別イベントの組換えアルファルファ系統である。

除草剤グリホサート耐性アルファルファとして商品化される品種は本スタック系統アルファルファとそれぞれの親系統が混在しているものである。以下に商品化されるアルファルファの育成方法を述べる。

アルファルファは他殖性の同質 4 倍体であり ($2n=4x=32$)、4 セットの染色体を有する為、ある特定の遺伝子を遺伝的に固定するためには 4 セットの遺伝子を全て同一の対立遺伝子にする(ホモ化する)必要がある。しかし、アルファルファは高い自家

不和合性を有し、また、自殖して遺伝的に固定すると顕著な自殖弱勢が生ずる。このため、アルファルファの商業品種の育成過程においては、遺伝的に優れた性質を自殖あるいは近交交配を行うことで遺伝的に固定する事ができない。従って、実際の育種の場面では、遺伝的に優れた性質を有する複数の系統をほ場で交雑させて得られる合成品種を育成し、商業品種として販売している。

除草剤グリホサート耐性アルファルファの商業品種（商品名ラウンドアップ・レディー・アルファルファ）においては、グリホサート耐性個体の純度を 90%以上とすることを目標としている。しかし、上述したように、アルファルファにおいては自殖を行う事で改変型 *cp4 epsps* 遺伝子を集団内で固定する事が困難である。従って、集団内でのグリホサート耐性個体の出現頻度を高めるために、ラウンドアップ・レディー・アルファルファは改変型 *cp4 epsps* 遺伝子が独立して遺伝する(p11の表 1)2 系統 J101 と J163 を用いて育成している。ラウンドアップ・レディー・アルファルファの育成過程において、J101 個体集団(遺伝子型 Aaaa または AAaa)及び J163 個体集団(遺伝子型 Bbbb または BBbb)を任意交配して得られた F1 集団で系統特異的 PCR を行い、F1 個体の中で J101 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子及び J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の両方を共に有する個体(J101 x J163)(遺伝子型 Aaaa または AAaa と Bbbb または BBbb を併せ持つ個体)のみを選抜し、Syn0 集団として用いる。

なお、Syn1 から Syn3 までの育成過程においては、各集団内で任意交雑を行うため、本スタック系統アルファルファの集団においては、J101 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子のみを有する個体(J101)と J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子のみを有する個体(J163)が分離する。Syn1 から Syn3 までの集団内での 1 個体あたりの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数の割合をメンデル遺伝による分離比から計算した理論値を p10の図 1に示す。図 1において 1,0、2,0、3,0、4,0 で示される個体は J101 あるいは J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子のみを有する個体、すなわち本スタック系統アルファルファの親系統である J101 もしくは J163 である。実際に、本スタック系統アルファルファの Syn1 世代において、遺伝子型の分離を調査したところ、J101 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子と J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子はメンデル遺伝で期待されるどおりの分離を示した(p11の表 1)。また、図 1で示されている通り、各世代での 1 個体が有する改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数は世代間で大きく変動する事はない。実際には本組換えアルファルファの評価試験には Syn1 世代を用いているが、Syn1 世代での 1 個体あたりの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数は 2.39、Syn3（商品化世代）での 1 個体あたりの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数は平均して 2.30 である。

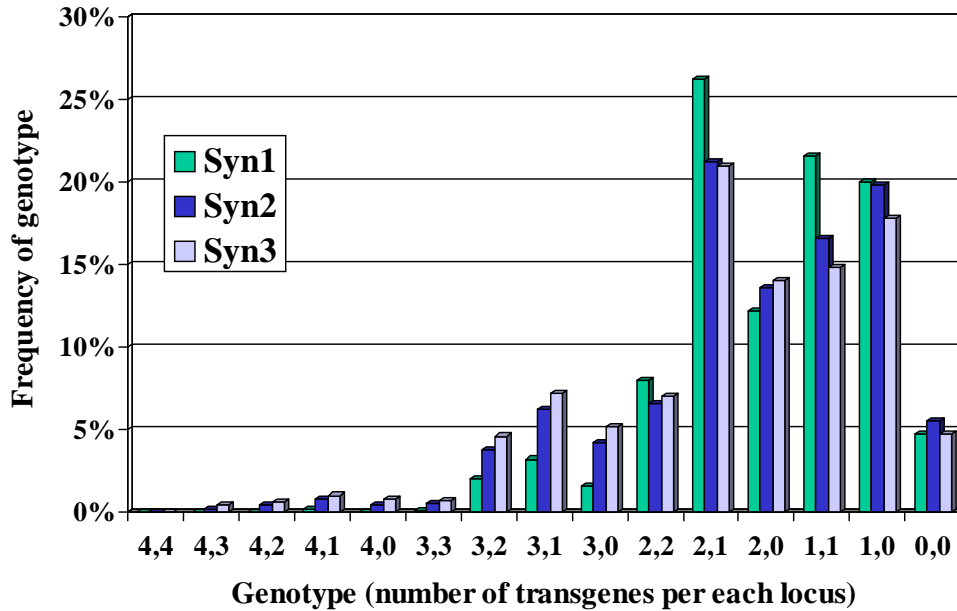


図 1 Syn1 から Syn3 集団での 1 個体あたりの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数の割合

Syn1 世代から Syn3 世代の各集団内で、1 個体あたりが有する J101 と J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数がどのように変動するかを示した。割合は予想されるメンデル遺伝による分離比から計算した理論値に基づいている。グラフ下の数字(a, b)は 1 個体が有する J101 由来もしくは J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数を示す。例えば、1,2 とは J101 由来の *cp4 epsps* 遺伝子を 1 つ、J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子を 2 つ有する(Aaaa and BBbb)か、J101 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子を 2 つ、J163 由来の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子を 1 つ有する(AAaa and Bbbb)個体の集団内での割合を示している。図に示すように、世代間で 1 個体あたりの改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の数は大きく変動しない。

表 1 本スタック系統アルファルファのSyn1 世代における遺伝子型の分離^a。

遺伝子型 ^b	実測値(個体)	期待値(個体)	χ^2	χ^2 検定
Null	170	172.1	0.025	
J101 のみ	659	629.7	0.671	
J163 のみ	641	629.7	1.372	
J101 x J163	2191	2229.5	0.206	
計	3661	3661	$\chi^2 = 2.275$	NS ^c

^a J101 と J163 を任意交雑させて育成した本スタック系統アルファルファ J101 x J163 の Syn1 集団 3661 個体における実際の遺伝子型の分離を示す。

^b 遺伝子型の判別方法は以下のとおりである。Null(グリホサート感受性)個体: 表現型より判定。J101、J163、J101 x J163: 系統特異的PCRにより判定。

^cNS = Not Significant (p>0.05)

ロ. 構成要素の機能

J101 及び J163 の作出に用いられた供与核酸は同一のものである。J101 および J163 の作出に用いられた供与核酸の機能は表 2(p13)に示した。

【改変型 *cp4 epsps* 遺伝子】

- ① 除草剤グリホサートは、非選択的な除草剤であるラウンドアップの有効成分で、芳香族アミノ酸の生合成経路であるシキミ酸経路中の酵素の一つである 5-エノールピルビルシキミ酸-3-リン酸合成酵素(EPSPS)(E.C.2.5.1.19)と特異的に結合してその活性を阻害する。そのため植物はグリホサートを処理すると EPSPS が阻害されることにより蛋白質合成に必須の芳香族アミノ酸を合成できなくなり枯れてしまう。本組換えアルファルファの目的遺伝子である改変型 *cp4 epsps* 遺伝子は除草剤グリホサートに高い耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を発現する。改変型 *cp4 epsps* 遺伝子によって産生される CP4 EPSPS 蛋白質は、グリホサート存在下でも活性阻害を受けないため、結果として本蛋白質を発現する組換え植物ではシキミ酸経路が正常に機能して生育することができる。

尚、EPSPS は植物や微生物に特有の芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素の一つであり、植物中では葉緑体または色素体に存在する。シキミ酸経路は植物の固定する炭素の 5 分の 1 に関与すると考えられる重要な代謝経路である。本経路は、その第一段階に関与する 3-デオキシ-D-アラビノ-ヘプトロソン酸-7-リン酸(3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate, DAHP)合成酵素

によって調節を受けて制御されるが、DAHP から EPSPS が触媒する 5-エノールピルビルシキミ酸 3 リン酸(EPSP)の生成を経てコリスミ酸が生成されるまでの段階では、中間代謝物質や最終生成物によって阻害されたり抑制される可能性が極めて低いことが明らかにされている。このことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを示唆しており、従って、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、通常の 40 倍の EPSPS を生成する植物細胞において、芳香族アミノ酸が過剰に合成されないことが報告されており、加えて、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、シキミ酸経路の最終産物である芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。これらのことは EPSPS が本経路における律速酵素ではないことを支持している。また、EPSPS はホスホエノールピルビン酸塩(PEP)とシキミ酸-3-リン酸塩(S3P)から、EPSP と無機リン酸塩(Pi)を生じる可逆反応を触媒する酵素であり、これらの基質と特異的に反応することが知られている。これら以外に唯一 EPSPS と反応することが知られているのは S3P の類似体であるシキミ酸であるが、その反応性は S3P との反応性の 200 万分の 1 にすぎず、生体内で基質として反応するとは考えられない。

- ② CP4 EPSPS 蛋白質が、既知のアレルゲンと機能上重要なアミノ酸配列を共有するかどうか、データベース(GenBank, EMBL, PIR, NRL3D, SwissProt)を用いて比較したところ、既知アレルゲンと構造的に類似性のある配列を有していなかった。

表 2 プラスミド PV-MSHT4 の作出に用いた供与核酸の構成要素の由来及び機能

構成 DNA	由来及び機能
Right Border(RB)	Ti プラスミド pTiT37 に由来する、ノパリン型 T-DNA の右境界配列 (24bp)を含む DNA 断片。右境界配列は、 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへの T-DNA の伝達の際、伝達の開始点として利用される。
P-eFMV	<i>Figwort mosaic virus</i> (FMV)由来の重複エンハンサー-35S プロモーター。植物体の全組織で恒常的に目的遺伝子を発現させる。尚、FMV はわが国に未発生のウイルスであるが、FMV の近縁ウイルスがアルファルファが属する <i>Medicago</i> 属の植物を宿主とする報告はなく、組換えによって新たなウイルスが生じる可能性は極めて低いと考えられた。
HSP70-Leader	ペチュニア hsp70(熱ショック蛋白質)遺伝子の 5'非翻訳リーダ配列。植物における外来遺伝子の発現量を高めるために用いられる
ctp2	芳香族アミノ酸が合成される葉緑体へ CP4EPSPS 蛋白質を輸送するシロイヌナズナ EPSPS 由来の葉緑体輸送ペプチド。目的蛋白質を細胞質から葉緑体へと輸送する。
改変型 cp4 epsps	<i>Agrobacterium</i> sp. CP4 株の <i>epsps</i> 遺伝子。機能の詳細については p16-17 に記載した。
E9 3'	エンドウの ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase E9 遺伝子の 3'非翻訳領域。mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。
Left Border(LB)	Ti プラスミド pTiA6 に由来する左境界配列(25bp)を含む DNA 断片。左側境界配列は、T-DNA が <i>Agrobacterium tumefaciens</i> から植物ゲノムへ伝達される際の終結点である。
(T-DNA の外側の構成要素)	
ori-V	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 tumefaciens</i> ABI 株においてベクターに自律増殖能を付与する。
ori-322/rop	大腸菌プラスミド pBR322 に由来する複製開始領域であり、ベクターに大腸菌における自律増殖能を付与する。この領域は複製開始点の他に、複製開始の制御に関わる <i>rop</i> 領域及び大腸菌から <i>Agrobacterium tumefaciens</i> への接合伝達に必要な <i>oriT</i> 配列を含む。
Aad	<i>Staphylococcus aureus</i> 由来の 3''(9)-O-アミノグリコシドアデニリルトランスフェラーゼ(AAD)をコードする遺伝子であり、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。

(2) ベクターに関する情報

イ. 名称及び由来

組換えアルファルファ J101 並びに J163 の作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-MSHT4 は、大腸菌(*Escherichia coli*)由来のプラスミド pBR322 等から構築された合成プラスミドベクターである。

ロ. 特性

本組換えアルファルファの作出に用いられた PV-MSHT4 の塩基数は 9,023bp である。大腸菌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大腸菌のトランスポゾン Tn7 に由来する *aad* 遺伝子が T-DNA 領域外に存在している。

本ベクターの感染性は知られていない。

(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法

イ. 宿主内に移入された核酸全体の構成

本組換えアルファルファの作出に用いられたプラスミド・ベクター PV-MSHT4 は、大腸菌由来のプラスミド pBR322 等から構築された合成プラスミドベクターであり、改変型 *cp4 epsps* 遺伝子発現カセット([P-eFMV]-[HSP70-Leader]-[CTP2]-[改変型 *cp4 epsps*]-[E9 3'])を含む(p13の表 2及び p15の図 2参照)。

ロ. 宿主内に移入された核酸の移入方法

プラスミド PV-MSHT4 中の T-DNA 領域をアグロバクテリウム法によって、育種母本群である R2336 系統へ導入した。

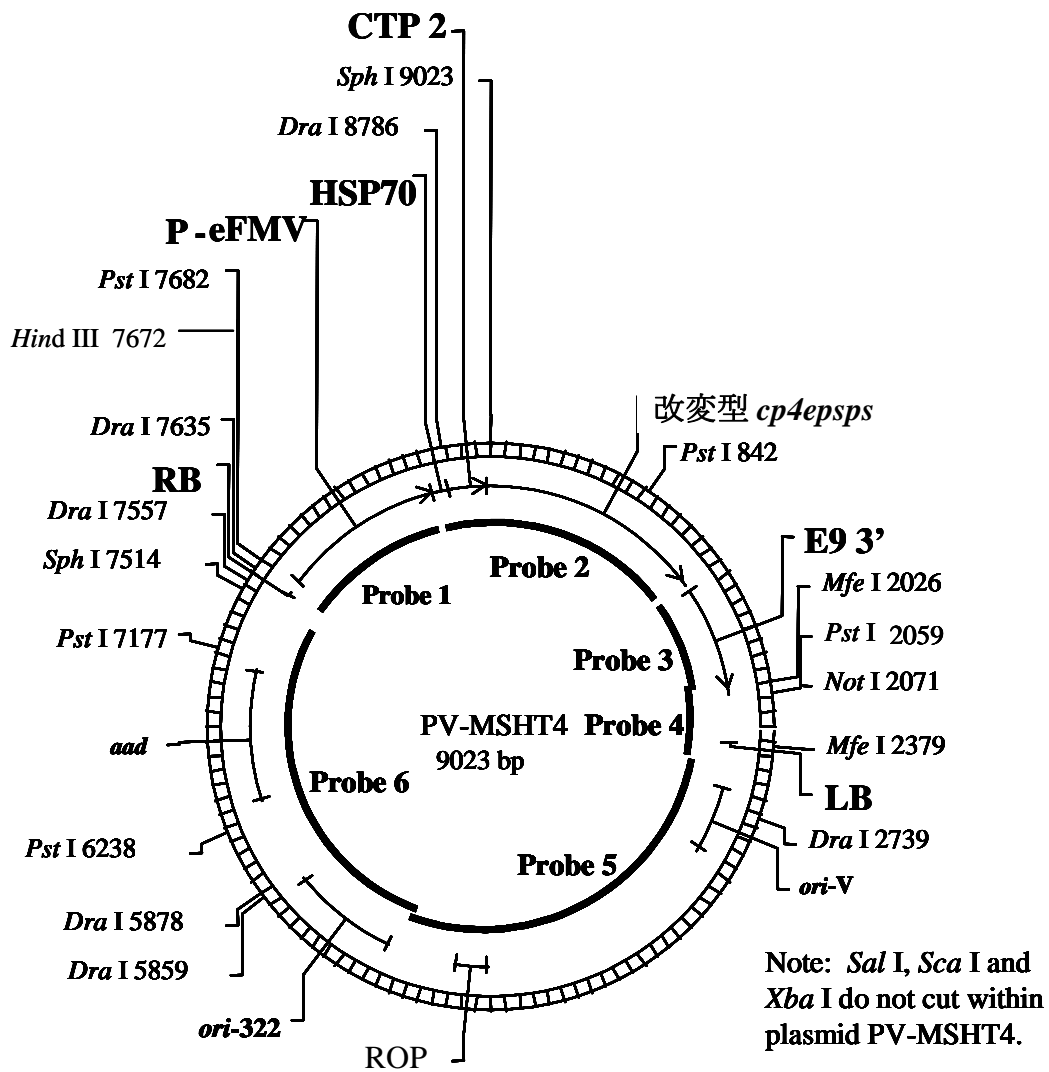


図 2 PV-MSHT4 のプラスミドマップ

組換えアルファルファ J101 及び J163 に導入された T-DNA 領域は上図の RB から時計回りに LB までの領域である。

ハ. 遺伝子組換え生物等の育成の経過

【J101 及び J163 の育成の経過】

アグロバクテリウム法によりプラスミド・ベクターPV-MSHT4中のT-DNA領域をR2336系統の組織切片に導入した後、carbenicillin及びcefotaximeを含む組織培養培地に移して、*A. tumefaciens* ABI株の除菌を行った後、さらにグリホサートを添加した培地に置床し、増殖してきたカルス組織から植物体を再分化させた。この時にアグロバクテリウムの残存が無い事も確認している。得られた再分化個体(=T₀世代)から、グリホサート耐性検定及びサザンブロット分析によって導入遺伝子の確認を行い、グリホサート耐性の付与された52系統を選抜した。そして、1999年から米国、カナダ及びアルゼンチンの延べ70ヶ所で圃場試験を行った。その結果をもとに系統選抜を行い、優良母本個体群を育成、最終的には商品化品種育成のための優良系統として組換えアルファルファJ101系統並びにJ163系統が選抜された。

【J101 x J163 の育成の経過】

本スタック系統アルファルファは、p8で前述したように、J101とJ163の選抜個体群同士を任意交雑したF1集団から系統特異的PCRを用いてJ101由来の改変型*cp4 epsps*遺伝子とJ163由来の改変型*cp4 epsps*遺伝子を有する個体をSyn1世代として、従来の交雑育種法を用いて作出した。

厚生労働省に食品利用のための申請を平成16年8月に行い、現在審査中である。農林水産省には飼料利用のための申請を平成16年8月に行った。

(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

イ. 移入された核酸の複製物が存在する場所
染色体上

ロ. 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

サザンブロット分析による挿入遺伝子の解析の結果、本組換えアルファルファの染色体上の1ヶ所に1コピーのT-DNA領域が組み込まれていることが確認された。また、T-DNA領域以外は挿入されておらず、T-DNA領域内の改変型*cp4 epsps*遺伝子発現カセットも完全な状態で挿入されていた。挿入遺伝子は安定して後代に遺伝していることが複数世代におけるサザンブロット分析によって示された。

ハ. 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

1 コピーのみなので該当しない。

ニ. (6)のイ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

本組換えアルファルファの CP4 EPSPS 蛋白質の発現の安定性に関しては、各世代での除草剤グリホサートに対する耐性により評価している。

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

本組換えアルファルファの作出にはアグロバクテリウム法を用いているが、アグロバクテリウムが残存していない事を確認しているため、移入された DNA 断片が野生動植物等に伝達されるおそれは無い。

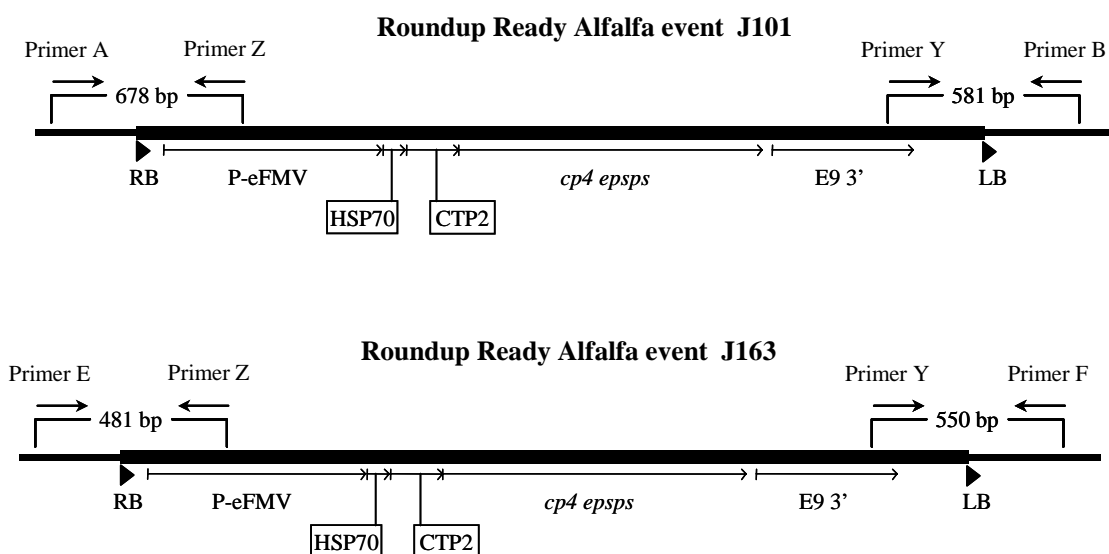


図 3 組換えアルファルファ J101 及び J163 のゲノム中における挿入遺伝子地図

Primer A, B, E, Fはそれぞれアルファルファのゲノムの DNA 配列により構築されたプライマーである。

(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

組換えアルファルファ J101 並びに J163 を検出及び識別するための方法としては、挿入遺伝子及びその周辺の植物ゲノムの DNA 配列をプライマーとした (p17 の図 3 の primer A, B, E, F, Y, Z) 定性的 PCR 法を開発しており、本法により組換えアルファルファ J101 並びに J163 を特異的に検出可能である。

上述の方法をアルファルファの種子 1 粒毎について行うことで、本スタック系統アルファルファを確実に検出及び識別することができる。

(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

本スタック系統アルファルファは親系統である J101、J163 に挿入された遺伝子により、CP4 EPSPS 蛋白質が植物体内において発現していると推測される。第一の 2-(1)-ロで述べたように、CP4 EPSPS 蛋白質と同等の機能を持つ EPSPS 蛋白質は、シキミ酸経路の律速酵素ではないことが示唆されていること、また、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤ラウンドアップ耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物中の芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されていることから、CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられる。また、J101 及び J163 由来の CP4 EPSPS 蛋白質は導入された同一の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子により発現しているものであるため、同一の物であると考えられる。従って、相互作用するとは考えにくい。

従来の交雑育種法により本スタック系統アルファルファの CP4 EPSPS 蛋白質の発現程度が親系統と比較して変動するかどうかを実際に確認した。試験には J101 と J163 の Syn 1 ならびに本スタック系統アルファルファ J101×J163 の Syn 1 を供試した。米国の 6 ヶ所(カリフォルニア州、イリノイ州、アイオワ州、ニューヨーク州、ワシントン州、ウィスコンシン州)のほ場試験において、2001 年と 2002 年にそれぞれ生育期間中に茎葉を 1 回収穫し、茎葉(一番草)における CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を ELISA 法で分析した。尚、カリフォルニア州、イリノイ州、ワシントン州の 3 ヶ所のほ場では 2001 年と 2002 年にそれぞれ 2 回目に収穫できた茎葉(二番草)についても CP4 EPSPS 蛋白質の発現量を分析した。

CP4 EPSPS 蛋白質の計 9 つの収穫草試料における発現量は、J101 において 2001 年は平均 276 $\mu\text{g/g}$ fwt($\mu\text{g/g}$ 新鮮重) (範囲: 220~340 $\mu\text{g/g}$ fwt) 及び 2002 年は平均 238 $\mu\text{g/g}$ fwt (範囲: 160~340 $\mu\text{g/g}$ fwt)、J163 系統において 2001 年は平均 317 $\mu\text{g/g}$ fwt (範囲: 270~380 $\mu\text{g/g}$ fwt) 及び 2002 年は平均 223 $\mu\text{g/g}$ fwt (範囲: 140~340 $\mu\text{g/g}$ fwt) で、J101×J163 では 2001 年は平均 312 $\mu\text{g/g}$ fwt (範囲: 260~390 $\mu\text{g/g}$ fwt) 及び 2002 年は平均 192 $\mu\text{g/g}$ fwt (範囲: 120~310 $\mu\text{g/g}$ fwt) であった(p20の表 3)。これらの発現量において栽培年度、栽培地あるいは系統間で変動が認められたが、本スタック系統アルファルファの CP4

EPSPS 蛋白質の発現量は親系統である J101 及び J163 と同等であり、従来の交雑育種法により発現量が増大する事はないことが確認された。

なお、本スタック系統アルファルファ Syn1 世代では 1 個体あたりの平均の改変型 *cp4 epsps* 遺伝子数は 2.39 であるのに対し、親系統 J101 系統および J161 系統では 1.00 であり、本スタック系統アルファルファにおいては両親系統よりも改変型 *cp4 epsps* 遺伝子数が増加しているが、CP4 EPSPS タンパク質の発現量は増大していない。このような観察結果は本組換えアルファルファに特異的なものではなく、植物においては挿入遺伝子のコピー数とその遺伝子のコードするタンパク質の発現量は正の相関を示さない事が報告されている。植物の遺伝子発現量は転写から最終産物であるタンパク質の発現に至るまでの過程で複雑な制御メカニズムによって調節され、様々な因子が関与するため、遺伝子のコピー数は発現量を決定する重要な因子ではないと考えられる。

以上のことから、本スタック系統アルファルファと宿主の属する分類学上の種であるアルファルファとの相違については、J101、J163 の諸形質を個別に調査した結果を用いて想定した。

表 3 組換えアルファルファ J101、J163 及びスタック系統アルファルファ J101 x J163 における CP4 EPSPS 蛋白質の発現量

		茎葉における CP4 EPSPS 蛋白質の発現量(μg/gf wt)					
		収穫年度					
		2001 年			2002 年		
圃場	収穫草 ¹	J101	J163	J101×J163	J101	J163	J101×J163
カリフォルニア州	一番草	270	320	390	240	220	120
イリノイ州	一番草	260	320	290	270	310	200
アイオワ州	一番草	300	380	290	210	150	180
ニューヨーク州	一番草	270	290	280	220	180	140
ワシントン州	一番草	220	270	330	160	140	120
ウィスコンシン州	一番草	300	330	260	200	140	150
カリフォルニア州	二番草	290	320	340	340	340	280
イリノイ州	二番草	230	330	270	280	290	230
ワシントン州	二番草	340	290	360	220	240	310
	平均 ²	276	317	312	238	223	192
	最小値	220	270	260	160	140	120
	最大値	340	380	390	340	340	310

- 1) 茎葉試料は各圃場から 4 反復(1 反復 49 個体)をバルクで収穫し、分析に供試した。各圃場試料における CP4 EPSPS 蛋白質の発現量は 4 反復平均で示した。
- 2) 6 箇所 9 種類の収穫草の茎葉における CP4 EPSPS 蛋白質の発現量の平均値を示した。

イ. 組換えアルファルファ J101 及び J163 中において改変型 *cp4 epsps* 遺伝子がコードする CP4 EPSPS 蛋白質が発現することにより、除草剤グリホサート耐性が付与される。

ロ. 本組換えアルファルファと Null 型アルファルファについての相違は、平成 14 年 7 月から平成 16 年 2 月まで独立行政法人農業技術研究機構北海道農業研究センターにて行われた隔離ほ場試験の結果に基づいて検討した。なお、Null 型アルファルファとは本組換えアルファルファの育成過程において、BC2 世代から改変型 *cp4 epsps* 遺伝子の分離により得られたグリホサート感受性の個体群である。Null 型アルファルファは個体毎に ELISA 法により CP4 EPSPS 蛋白質が発現していないこと、PCR 法により改変型 *cp4 epsps* 遺伝子が導入されていない事、サザンブロット法によりプラスミド由来の DNA 断片が挿入されていない事を確認している。

アルファルファは自殖弱勢の性質を有するため、本組換えアルファルファの育成及び維持の過程においては複数の従来品種優良個体群との交雑が行われており、本組換えアルファルファと同等の遺伝的バックグラウンドを有する対照品種は存在しない。このため、本試験の対照品種には、遺伝子導入に用いた宿主品種ではなく、供試した本組換えアルファルファと同世代の Null 型アルファルファを選定した。

なお、本組換えアルファルファのわが国の自然環境における生育は明らかでないことから、この他に、マキワカバ及び Rambler の 2 品種を参考品種として供試した。マキワカバは北海道農業研究センターにおいて育成され、北海道の環境条件に適した品種である。一方、Rambler は米国で一般的に栽培されている品種であるが、北海道の環境条件への適応性は低いとされている。

① 形態及び生育の特性

栽培 1 年目の評価項目として 6 項目(発芽揃い、発芽率、葉色、刈取り時の草丈、地上部重、秋の再生草丈)、栽培 2 年目の評価項目として 13 項目{耐寒性(欠株率)、耐寒性(早春の草勢)、草型、茎数、開花期、花色、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈、開花期の草丈}について調査した。調査の結果、J101 の 2 年目の草丈(開花期)及び J163 の 1 年目の秋の再生草丈において、対照の Null 型アルファルファとの間で統計学的有意差が認められたが、その他の項目において差異は認められなかった。

従って、本スタック系統アルファルファでも、宿主の属する分類学上の種であるアルファルファとの間に 2 年目の草丈及び 1 年目の秋の再生草丈で統計学的有意差が認められる可能性があるが、その他の形態及び生育の特性については、宿主の属する分類学上の種であるアルファルファとの間に差異はないと考えられる。

② 生育初期における低温又は高温耐性

次項で述べるように成体において本組換えアルファルファと対照の Null 型アルファルファの越冬性に差異は認められなかったこと、アルファルファは元来多年生であり、本組換えアルファルファは米国でのほ場試験を通じて正常に越冬・越夏し多年生の特性に従来アルファルファとの間で差異は見られなかったことから、生育初期における低温または高温耐性試験は行わなかった。

③ 成体の越冬性又は越夏性

J101 及び J163 と対照の Null 型アルファルファについて、越夏後の再生草の秋期休止性(秋の刈取り後の再生草の草丈の調査)および栽培 2 年目の早春での欠株率、萌芽始め、早春の草勢を調査することにより越冬性を評価したところ、J163 の秋の再生草丈において Null 型アルファルファとの間で統計学的有意差が認められたが、その他の項目では統計学的有意差は認められなかった。従って、J101 は対照の Null 型アルファルファと越冬性に関して差異はなく、J163 は対照の Null

型アルファルファに比較して若干耐寒性が低下する可能性があるものの、越冬性には差異はないと考えられた。また、収穫時の地上部重においても、対照の Null 型アルファルファとの間に統計学的有意差が認められなかったことから、越夏性にも差異はないと考えられた。

従って、本スタック系統アルファルファにおいても、成体の越冬性及び越夏性については宿主の属する分類学上の種のアルファルファとの間に差異はないと考えられる。

④ 花粉の稔性及びサイズ

J101 及び J163 と対照の Null 型アルファルファの開花期の穎花を採取し、ヨード・ヨードカリ染色によって花粉を染色して観察し、稔性及びサイズについて調査したところ、本組換えアルファルファと Null 型アルファルファの間で花粉稔性に統計学的有意差は認められなかった。また、花粉の形状や大きさについても相違は観察されなかった。

従って、本スタック系統アルファルファにおいても、花粉の稔性及びサイズについては宿主の属する分類学上の種のアルファルファとの間に差異はないと考えられる。

⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率

隔離ほ場試験において、隔離ほ場外の栽培アルファルファ等との交雑防止措置として開花期間には花粉を媒介する昆虫が試験区内に侵入する事のないように防虫網をかける必要があったため、種子の生産量については、開花数、同一プロット内で人工他花受粉及び人工自家受粉を行い得られた1莢粒数、1,000粒重を調査することにより評価した。①の形態及び生育の特性で示したように、開花数、1莢粒数、1,000粒重についてJ101及びJ163と対照のNull型アルファルファとの間で統計学的有意差は認められなかった。また、他殖に比べて自殖による1莢粒数はいずれも低く、自家不和合性にも相違の無いことが示された。

脱粒性については、種子稔実後の収穫時にJ101及びJ163とNull型アルファルファの莢を手で握り、裂莢の難易について評価した。その結果、本組換えアルファルファと対照のNull型アルファルファのいずれも裂莢はなく、両者の間に差異は認められなかった。

休眠性及び発芽率については、本組換えアルファルファと対照の Null 型アルファルファのそれぞれの収穫直後の種子を、3 反復各 30 粒ずつ、吸水させたろ紙を敷いたシャーレに入れて 25℃程度のインキュベーター内に静置して発芽率を調査した。また、アルファルファの成熟種子ではしばしば水分吸収を妨げる不浸透性の種皮が形成されることがあるので、耐水性の収穫種子の種皮に傷を入れた種子

についても同様に発芽率を調査した。その結果、無処理種子及び種皮に傷を入れた種子のいずれの発芽率においても、J101 及び J163 と対照の Null 型アルファルファとの間で統計学的有意差は認められなかった。さらに、種皮に傷を入れた種子における発芽試験において、発芽しなかった種子は J101 および J163 と対照の Null 型アルファルファの双方で全て腐敗し、休眠状態にはないことが確認された。従って、種子の休眠性に関しても J101 および J163 と対照の Null 型アルファルファの間に差異はないと考えられる。

従って、本スタック系統アルファルファにおいても、種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率については宿主の属する分類学上の種のアルファルファとの間に差異はないと考えられる。

⑥ 交雑率

前述(p5, 6 の第一、(3)、二、③)のとおり、アルファルファと交雑可能な近縁野生種はわが国には生育していないことから、交雑率の試験は行わなかった。

⑦ 有害物質の産生性

J101及びJ163と対照のNull型アルファルファについて、有害物質の産生性を後作、鋤き込み、土壌微生物相試験を行い調査したところ、統計学的有意差は認められなかった。

アルファルファにはアルファルファ自身及び他の植物種の生育を阻害する水溶性の他感作用物質が、茎葉や根などの植物組織から放出されることが明らかにされているが、その他感物質については同定されていない。J101及びJ163と対照のNull型アルファルファについて、多感作用物質の産生性をサンドイッチ法により調査したところ、試験統計学的有意差は認められなかった。

アルファルファはマメ科植物であり、根には根粒細菌が共生し、根粒を形成する。J101及びJ163と対照のNull型アルファルファにおいて収穫時に各プロットの中央条5個体の根を掘り起こしてそれぞれの個体当たりの根粒数を計測し、根粒数を根1kg当たりに換算して根粒細菌に対する影響を評価したところ、統計学的有意差は認められなかった。

従って、本スタック系統アルファルファにおいても、有害物質の産生性については宿主の属する分類学上の種のアルファルファとの間に差異はないと考えられる。

3 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

(1) 使用等の内容

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

(2) 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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

(3) 国外における使用等に関する情報

2001年に、米国の6箇所のは場においてJ101及びJ163の病虫害感受性についてモニタリングした。モニタリングは干ばつストレス、ステム・ネマトーダ、アブラムシ、アザミウマ、ナガカメムシ、バーティシリウム萎凋病等について行われたが、J101,J163と対照のNull型アルファルファあるいは従来アルファルファ品種間で相違は観察されなかった。

尚、本組換えアルファルファについては、開発者であるモンサント社と Forage Genetics Incorporated 社により、商業栽培の計画を立てる計画である。

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

本スタック系統アルファルファは親系統である J101、J163 を掛け合わせた交配後代品種であり、J101 と J106 の特性を併せ持つ。第一の 2-(1)-ロ-① で述べたとおり、CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられること、本スタック系統アルファルファの CP4 EPSPS 蛋白質の発現量は親系統である J101 及び J163 と同等であり、掛け合わせにより発現量が増大する事はないことが確認されたことから、本スタック系統アルファルファの生物多様性影響の評価は、J101、J163 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

1 競合における優位性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

競合における優位性に関わる諸形質(形態及び生育の特性、花粉の稔性及びサイズ、種子の生産量、発芽率、休眠性及び脱粒性(p23~25 の第一、2-(6)、ロ、①~⑤))を比較検討した。その結果、親系統 J101 の 2 年目の草丈及び J163 の秋の再生草丈について対照の Null 型アルファルファとの間に統計学的有意差が認められたが、その他の項目では対照の Null 型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。

2 年目の草丈について親系統である J101 と対照の Null 型アルファルファとの間で統計学的有意差が認められた。また、1 年目の秋の再生草丈について親系統である J163 と対照の Null 型アルファルファ及び参考品種 Rambler との間で統計学的有意差が認められた。しかし、J101 にの 2 年目の草丈については対照の参考品種であるマキワカバや Rambler の草丈の範囲内に収まっていること、J163 では参考品種マキワカバとの間には統計学的有意差が認められない事から、これらの草丈の差異は従来アルファルファ品種がアルファルファの特性として示す特性の変動範囲内であり、生物学的に有意な差ではなく、これの草丈の差異により競合における優位性に影響が生じるとは考えられない。

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。また、道路整備、公園整備、緑化事業等に伴って海外から導入された農業資材(花木草本種子)に混入していたものが発生していると考えられる路傍や空地、樹園地などで帰化雑草化の事例が観察されている。しかしアルファルファは肥沃で雑草害の少ない土地でない多多年生の栽培作物として持続性を発揮することができず、通常栽培では雑草対策の確立が重要な問題とされているように雑草との競合に弱いこと、一般的に酸性土壌が多く高温多湿で地下水水位の高いわが国の土壌・気象条件はアルファルファの生育に適さないことなどから、わが国の自然条件下で生育した個体が増加して現在の分布が飛躍的に拡大する可能性はないと考えられる。

文献等の調査によれば、実際にはわが国において、アルファルファが問題雑草化した事例は報告されていない。

本組換えアルファルファは除草剤グリホサートに対する耐性の形質を有する。しかし、自然条件下においてはグリホサートが散布されるとは考えにくく、グリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。また、グリホサートの散布が想定されるような雑草害が発生している場所にはアルファルファがまとまって生育しているとは考えられない。よってグリホサート耐性であることが競合における優位性を高めるとは考えられない。

以上のように、本スタック系統アルファルファにおいては、2年目の草丈及び1年目の秋の再生草丈において差異が認められる可能性があり、グリホサート耐性を持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。

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。

(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の判断

以上から、本スタック系統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動植物の特定

親系統である組換えアルファルファ J101 及び J163 と対照の Null 型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、鋤き込み試験、後作試験、サンドイッチ法による試験、根粒形成数調査 (p25, 26 の第一、2-(6)、ロ、⑦)により比

較検討したが、差異は認められなかった。以上の事から、アルファルファは本来多感作用物質を産生する作物であるが、J101 並びに J163 の他感作用物質の産生程度は Null 型アルファルファと同程度であり、従って有害物質の産生性については Null 型アルファルファと差異は認められなかった。

本スタック系統アルファルファは除草剤グリホサートに耐性を持つ CP4 EPSPS 蛋白質を産生する性質を有しているが、本蛋白質が有害物質であるとする報告はない。また、第一の 2-(1)-ロ-①に述べたように、CP4 EPSPS 蛋白質は芳香族アミノ酸を生合成するためのシキミ酸経路を触媒する酵素蛋白質であるが、本経路における律速酵素ではなく、EPSPS 活性が増大しても、本経路の最終産物である芳香族アミノ酸の濃度が高まることはないと考えられている。実際に、モンサント社がこれまでに商品化した除草剤グリホサート耐性作物(ダイズ、ナタネ、ワタ、トウモロコシ)の食品/飼料安全性の評価の過程で、それら組換え作物種子中のアミノ酸組成を調べて、芳香族アミノ酸含量に元の非組換え作物との間で相違のないことが確認されている。従って、CP4 EPSPS 蛋白質が原因で、本スタック系統アルファルファ中に有害物質が産生されるとは考えにくいと判断された。

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の判断

以上から、本スタック系統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を生ずるおそれがないと判断された。

3 交雑性

(1) 影響を受ける可能性のある動植物の特定

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 *M. prostrata* と *M. glomerata* の 2 種 であるが、これらは日本には存在しない。尚、参考として、我が国に自生する *Medicago* 属には、多年生のアルファルファ(*M. sativa* L. subsp.

sativa 並びに *M. sativa* L. subsp. *falcata* L.)及び一年生のウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、キレハウマゴヤシ(*M. laciniata* L.別名 *M. polymorpha* L. var. *laciniata*)、トゲミノウマゴヤシ(*M. ciliaris* L. 別名 *M. polymorpha* L. var. *ciliaris* L.)、ウズマキウマゴヤシ(*M. orbicularis* 別名 *M. polymorpha* L. var. *orbicularis* L.)、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)、モンツキウマゴヤシ(*M. arabica*)、コウマゴヤシ(*M. minima*)、タルウマゴヤシ(*M. truncatula*)、マルミウマゴヤシ(*M. murex*)、カギユウソウ(*M. scutellata* Miller)が存在する。なお、この中で明治以前に移入された種は第一、1、(1)、ハで述べたように一年生のウマゴヤシ(*M. polymorpha*)、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の2種である。

P5~8の第一、1、(3)、ハに上述したように、一年生と多年生の *Medicago* 属の間では人工交雑はできず、また、自然界でも両種の間雑種は確認されていないことから、多年生のアルファルファと一年生の *Medicago* 属は遺伝的に不親和性であると考えられている。実際に、多年生のアルファルファと一年生のウマゴヤシ(*M. polymorpha* L.)の間の交雑にお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。また、アルファルファ(*M. sativa* L.)とコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の間の交雑については、胚発生の開始のみ確認されたものの、正常な胚は形成されず、受精の証拠は得られなかった。

以上の事から、わが国において自生する近縁野生種がアルファルファと自然交雑する可能性はない。従って、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

以上から、本スタック系統アルファルファは交雑性に起因する生物多様性を生ずるおそれがないと判断された。

第三 生物多様性影響の総合的評価

本スタック系統アルファルファは親系統である J101、J163 を掛け合わせた交配後代品種であり、J101 と J106 の特性を併せ持つ。第一の 2-(1)-ロ-① で述べたとおり、CP4 EPSPS 蛋白質は宿主の代謝経路には影響を及ぼさないと考えられること、本スタック系統アルファルファの CP4 EPSPS 蛋白質の発現量は親系統である J101 及び J163 と同等であり、従来の交雑育種法により相互作用はないと推定されたことより、本スタック系統アルファルファの生物多様性影響の評価は、J101、J163 の諸形質を個別に調査した結果を用いて行った。

J101 と J163 と対照の Null 型アルファルファとの間で競合における優位性に関わる諸形質を比較検討した。その結果、2 年目の草丈及び 1 年目の秋の再生草丈を除く全ての項目で統計学的有意差は認められなかった。以上のように、本スタック系統アルファルファにおいては、2 年目の草丈及び 1 年目の秋の再生草丈において差異が認められる可能性があり、除草剤グリホサート耐性を併せ持つが、上記したようにこれらは競合における優位性を高めるほどの形質の変化ではなく、またそれぞれの形質は互いに影響し合うとは考えにくい。従ってこれらの形質を全て併せ持ったとしても、競合における優位性が高まることはないと判断された。以上から、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。

J101 及び J163 と対照の Null 型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、鋤き込み試験、後作試験、サンドイッチ法による試験、根粒形成数調査 (p25, 26 の第一、2-(6)、ロ、⑦)により比較検討したが、差異は認められなかった。また、CP4 EPSPS 蛋白質の植物における発現が、植物の持つ代謝経路に何らかの影響を及ぼす可能性は極めて低く、新たな有害物質を産生するとは考えられない。以上から、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。

わが国にはアルファルファと自然交雑可能な近縁野生種は生育していない。以上から、本スタック系統アルファルファは交雑性に起因する生物多様性を生じるおそれはないと判断された。

よって、総合的評価として、本スタック系統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生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断した。

緊急措置計画書（栽培目的の場合）

平成16年 7月 14日

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4-10-10
銀座山王ビル8階

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性アルファルファ(*cp4 epsps, Medicago sativa L.*) (J101×J163, OECD UI:MON-00101-8×MON-00163-7)（以下、本組換え体という）の第一種使用等において、生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本組換え体に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 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通りである。

個人名・所属は個人情報につき非開示

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

- 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

具体的措置として、特定された問題に応じ、本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること等、必要な措置を実行する。

- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。

緊急措置計画書（食用・飼料用に供する場合）

平成16年 7月 14日

氏名 日本モンサント株式会社
代表取締役社長 山根精一
住所 東京都中央区銀座4-10-10
銀座山王ビル8階

第一種使用規程の承認を申請している除草剤グリホサート耐性アルファルファ(*cp4 epsps, Medicago sativa L.*) (J101×J163, OECD UI:MON-ØØ1Ø1-8×MON-ØØ163-7)(以下、本組換え体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可能性が示唆された場合、弊社は生物多様性影響のリスク評価を実施する。このリスク評価に基づき、生物多様性に及ぼす影響に応じた管理計画を設定し、こうした危険性を軽減する方法の決定への協力などを必要に応じて行う。さらに、特定された危険性の重大性や起こりうる確率から判断して、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合は、当該影響を効果的に防止するため、特定された問題に応じ、以下のことを行う。尚、生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められた場合とは、本組換え体に関して、科学的に我が国の生物多様性に影響を生ずることが立証された場合のことである。

- 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通りである。

個人名・所属は個人情報につき非開示

- 2 第一種使用等の状況の把握の方法

弊社は種子会社等から、第一種使用等の状況に関し、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

生物多様性影響に関して必要に応じて生産国の生産農家や関連団体に情報提供を行い、厳密な使用方法の周知徹底等に努める。

- 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

具体的措置として、特定された問題に応じ、輸入された本組換え体の環境放出が行われないようにすること、環境中に放出された本組換え体があった場合はそれらが環境中で生存しないようにすること、必要に応じて本組換え体が日本に輸入されないようにすること等、必要な措置を実行する。

- 5 農林水産大臣及び環境大臣への連絡体制

生物多様性影響が生ずる可能性が示唆された場合、弊社はそのことを直ちに農林水産省や環境省に報告する。