

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	4
第一 生物多様性影響の評価に当たり収集した情報	4
1 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報	4
(1) 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況	4
① 和名、英名及び学名	4
② 宿主の品種名又は系統名	4
③ 国内及び国外の自然環境における自生地域	4
(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	6
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	8
イ 基本的特性	8
ロ 生息又は生育可能な環境の条件	9
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	10
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	10
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
へ 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	16
イ 構成及び構成要素の由来	16
ロ 構成要素の機能	17
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	17
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	22

③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容	22
(2) ベクターに関する情報.....	27
イ 名称及び由来	27
ロ 特性.....	27
① ベクターの塩基数及び塩基配列	27
② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能	27
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	27
(3) 遺伝子組換え生物等の調製方法.....	27
イ 宿主内に移入された核酸全体の構成	27
ロ 宿主内に移入された核酸の移入方法	27
ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過	28
① 核酸が移入された細胞の選抜の方法	28
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 ウム菌体の残存の有無	28
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	28
(4) 細胞内に移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安 定性.....	31
① 移入された核酸の複製物が存在する場所	31
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	33
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	33
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	33
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	35
(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.....	35
(6) 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違.....	35
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	35
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	36
3	遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報	37
	(1) 使用等の内容	37
	(2) 使用等の方法	37
	(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	38
	(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	39
	(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	39
	(6) 国外における使用等に関する情報	40
第二	項目ごとの生物多様性影響の評価	41
1	競合における優位性	41
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	41
	(2) 影響の具体的内容の評価	42
	(3) 影響の生じやすさの評価	42
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	42
2	有害物質の産生性	42
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	43
	(2) 影響の具体的内容の評価	44
	(3) 影響の生じやすさの評価	44
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	44
3	交雑性	44
	(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定	44
	(2) 影響の具体的内容の評価	45
	(3) 影響の生じやすさの評価	45
	(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断	45
4	その他の性質	45
第三	生物多様性影響の総合的評価	46
	参考文献	48
	緊急措置計画書	59
	モニタリング計画書	61
	隔離ほ場試験計画書	66
	別添資料リスト	77

第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 9 月 13 日

5 農林水産大臣 鹿野 道彦 殿
環境大臣 細野 豪志 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 (CCOMT, <i>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	隔離ほ場における栽培、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	所在地：栃木県那須塩原市千本松 768 番地 名 称：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究 機構 畜産草地研究所隔離ほ場 使用期間：承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで 1 隔離ほ場の施設 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。 (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えアルファルファの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置していると同時に、当該アルファルファの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。 (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風林を設置している。 (5) 播種時及び成熟期には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。また、開花期には試験区を防虫網で覆うことにより昆虫の侵入を防止する。 2 隔離ほ場での作業要領 (1) 本遺伝子組換えアルファルファ及び比較対照のアルファルファ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。 (2) 本遺伝子組換えアルファルファを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該アルファルファが漏出しない構造の容器に入れる。 (3) (2)により運搬又は保管する場合を除き、本遺伝子組換えアルファルファの栽培終了後は、当

	<p>該アルファルファ及び比較対照のアルファルファを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。</p> <p>(4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えアルファルファが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。</p> <p>(5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。</p> <p>(6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。</p> <p>(7) 別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。</p> <p>(8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。</p>
--	---

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(マメ科 *Medicago* 属)(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アルファルファ R2336 系統である。従来アルファルファ 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)。現在では米国、カナダ南部、ヨーロッパ、中国、中南米の南方及び南アフリカを含む温帯地域で広く分布している。世界中の栽培面積は 3,300 万 ha 以上である(OECD, 2005)。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いるが、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)。

30

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、全国に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、生態系への影響が報告また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、

35

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い、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
5 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
アルファは、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(原毛に付着したごみや羊の糞・脂肪)の格納庫
10 付近などでアルファア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; 2010)。また同
県鈴鹿市の帰化植物の調査では、1951 年から 1998 年でアルファアルファは個
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)。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
15 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
るが、港周辺以外での生育は観察されていない(水田, 1998; 横山, 1991)。大
分県では、低地の路傍や空き地でアルファアルファの生育が確認されているが、
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,
20 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とされている(浅沼ら,
1987)。

さらに、わが国においてアルファアルファは、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
25 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, 2002)。

以上のことより、アルファアルファの生育は日本各地で報告されており (浅
沼ら, 1987; 清水ら, 2001)、北海道では定着しているという報告があるもの
30 (北海道, 2010)、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; 太田, 2010; 杉野, 2008)、
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

35

① 国内及び国外における第一種使用等の歴史

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 年にギリシャに、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。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(鈴木, 1992; 上野, 1987)。

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(Steele et al., 2010; Small and Jomphe, 1989)。

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 *subsp. sativa*、*subsp. falcata*、*subsp. coerulea* 及び *subsp. 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 *subsp. x varia*、*subsp. hemicycla* 及び *subsp. 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。アルファルファの黄花種である 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)。

② 主たる栽培地域、栽培方法、流通実態及び用途

アルファルファは米国において最も重要な牧草であり、米国における栽培面積は 2,073 万エーカー(約 810 万 ha)以上である。アルファルファは米国

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-NASS, 2010; USDA, 2007)。

5 わが国では、現在、北海道を中心に栽培されているが、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(鈴木, 1992; 農林水産省, 2004)。
この理由としては、まずアルファルファの栽培における雑草防除の難しさが
挙げられる(鈴木, 1992; 上野, 1987)。アルファルファの幼苗は雑草との競合
10 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を弱体化させ、枯死させることさえある
(Canevari et al., 2007)。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アルファルファの収量が減少する
(Dillehay et al., 2011; Fischer et al., 1988)。

15 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(鈴木, 1992; 上野, 1987; 農林水産省, 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
20 (Canevari et al., 2007; UC IPM, 2010; 鈴木, 1992)。

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
25 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
30 も早く刈取る事が推奨されている(鈴木, 1992)。

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(乾草を粉碎したもの)の形で利用さ
れている(亀岡, 1998)。

35 2010 年のわが国における飼料用栽培種子の輸入量は約 88 トンであり、そ
の内訳は、米国が約 43 トン、イタリアが約 26 トン、フランスが約 12 トン、

オーストラリアが約 6 トンとなっている(財務省, 2011)。また、2010 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 11 万トンであり、その内訳はカナダが約 3.6 万トン、フランスが約 3.1 万トン、オランダが約 1.9 万トン、米国が約 1.9 万トン、スペインが約 0.4 万トン、イタリアが約 0.1 万トンとなっている(財務省, 2011)。

(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。耐冬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冬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冬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、かつ耐冬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)及び耐冬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。耐冬性は 1 から 6 までの 6 段階で評価しており、1 は優れた耐冬性を示し、6 は耐冬性がないことを示す(Hancock, 2009; Putnam et al., 2007)。

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; Hill, 1983; Wilsie, 1958)。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、不均一な集団である。そのため、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)。

5

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°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 1,000~2,000mm 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(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(鈴木, 1992; 上野, 1987)。播種適期は春播きの場合旬間平均気温 9~11°Cで、秋播きの場合は 20°C前後とされる(鈴木, 1992)。

10

15

20

ハ 捕食性又は寄生性

—

25

ニ 繁殖又は増殖の様式

① 種子の脱粒性、散布様式、休眠性及び寿命

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

30

35

種子が拡散される可能性は低下する(Van Deynze et al., 2008)。

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、その場合は土壤中で数年間生存可能となる(Bass et al., 1988)。

- 5 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

10 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(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)の再生の助けとなる(Sheaffer et al., 1988)。

- 15 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

20 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(Campbell and He, 1997; Cooper and Brink, 1940)。

25 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(Quiros and Bauchan, 1988; Lesins, 1961; Lesins, 1962; Lesins, 1970)。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)。

30 わが国に自生する *Medicago* 属はすべて帰化植物であり、アルファルファの他に、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*)
35 の 8 種の自生が報告されている(大橋, 1999; 大橋, 2003)。上述した 8 種はいずれも一年生であるが、コメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)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)。なお、この中で明治以前に持ちこまれた種はウマゴヤシ(*M. polymorpha*)及びコマツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の2種であり、その他6種は明治以降に持ち込まれた。

5

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、
10 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。また、アルファルファ(*M. sativa* L.)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* 属の中でカギユウソウ(*M. scutellata*)や *M. rugosa* は4倍体で、30本の染色体であり、その他の一年生の *Medicago* 属は全て2倍体で、16又は14本の染色体である (Fryer, 1930; Fridriksson and Bolton, 1963; Bauchan and Elgin 1984; McCoy and Bingham, 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などの生殖的障壁も存在する。一年生の *Medicago* 属の
20 *M. arabica*、*M. orbicularis* 及び *M. lupulina* を用いて、アルファルファ(*M. sativa* L.)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(*M. sativa* L.)と一年生のウマゴヤシ(*M. polymorpha*)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, 2004)。一年生の *Medicago* 属のカギユウソウ(*M. scutellata*)及び
25 *M. disciformis* の花粉は、アルファルファ(*M. sativa* L.)の柱頭において、花粉管伸長異常を示した(Sangduen et al., 1983a)。

アルファルファ(*M. sativa* L.)と一年生の *Medicago* 属の *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ユウソウ(*M. scutellata*)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 and 1983b)。これら胚の生育停止は、
30 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(Fridriksson and Bolton, 1963; Cooper and Brink, 1940; Sangduen et al., 1983b)。

35

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(*M. scutellata*)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、得られた交雑種の体細胞染色体数は 30 本から 64 本と不安定であるのに加えて、この 1 例を除いて交雑の成功例は報告されていない(Sangduen et al., 1982; Sangduen et al., 1983a)。

また、アルファルファとコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の交雑に関して、交雑種を得たとする 2 つの報告があるが(Southworth, 1928; Fryer, 1930)、その後の研究においてアルファルファ(*M. sativa* L.)とコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)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)。さらに、Fryer は交雑種を得るのは難しく、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)。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(*M. sativa* L.)とコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)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(*M. sativa* L.)とコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)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(*M. sativa* L.)とコメツブウマゴヤシ(*M. lupulina*)の間で交雑は起こらないと考えられる。

上述のとおり、わが国において、アルファルファの近縁種として一年生の *Medicago* 属 8 種の自生が確認されているが、それらの種とアルファルファは自然条件下において交雑するものではない。

④ 花粉の生産量、稔性、形状、媒介方法、飛散距離及び寿命

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(Barnes and Sheaffer, 1995; Lesins and Lesins, 1979; Quiros and Bauchan, 1988)。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、柱頭は花弁にある溝に隠れ、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(Bohart, 1957; Vansell and Todd, 1946)。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低い昆虫種に限られるため受粉効率が低い(Vansell and Todd, 1946; 前田ら, 1973)。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は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)。

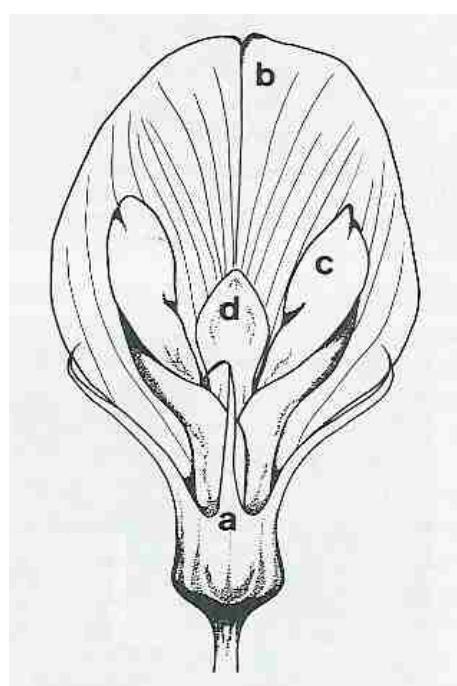


図 1 アルファルファ花きの略図

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)。

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供試し、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、
5 100、200、300、400、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 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
10 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、1000、1500、2000、2640、3960 及び 5280 フィート(約 150~1600m)。その結果、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
20 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., 2007)。
25 花粉源からの距離が 165 フィートから 615 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)。

St. Amand ら (2000)は RAPD マーカーを用いた試験で、こぼれ落ち、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考えられる
30 (Hammon et al., 2006)。

35 上述したように、これまでにさまざまな条件下における花粉の最大飛散距離が報告されている。しかしながら、アルファルファは一般的な栽培環境

下では 10%開花期頃に刈り取りが行われるため、花粉の生産量はわずかであり、種子生産も行われない。

ホ 病原性

5

—

ヘ 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いる。自家中毒の程度は品種により様々である(Chung and Miller, 1995b; 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(Chung and Miller, 1995b; Hegde and Miller, 1990)。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, 2002a)。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, 2002b; 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 週間(Tesar, 1993)から 6 ヶ月(Jennings and Nelson, 2002b)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についても結果に一貫性はなく、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(Sequin 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(Ells and McSay, 1991; Ferreira and Reinhardt, 2010; Hegde and Miller, 1990; Xuan and Tsuzuki, 2002)。アルファルファの組織の他感作用と水溶性抽出物の他感作用は異なることが報告されている(Chung and Miller, 1995a; Chung and Miller, 1995b; Ells and McSay, 1991; Hegde and Miller, 1990)。葉、生殖組織及びそれらの抽出物は根組織、根からの抽出物及び土壌滲出物よりも他感作用が強いことが報告されている(Chung and Miller, 1995a)。

30 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(Chon et al., 2006; Dornbos et al., 1990)。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に存在することが確認されてい

35

る。メディカルピン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(Chon et al., 2006; Dornbos et al., 1990)。

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 (CCOMT)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 CCOMT 遺伝子断片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は二本鎖 RNA(dsRNA)を形成し、RNAiによりアルファルファ内在性の CCOMT 遺伝子の転写を抑制する。CCOMT 蛋白質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 3, p24)。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、その価値に影響する。一方で、高品質の牧草は高値で取引されている。

(1) 供与核酸に関する情報

イ 構成及び構成要素の由来

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(p18) 及び表 1(p19~21) に示した。

5 なお、本組換えアルファルファには、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が導入されており、以下「*CCOMT* 遺伝子断片」とする。

ロ 構成要素の機能

10 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

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 1 (p19~21)に示した通りである。

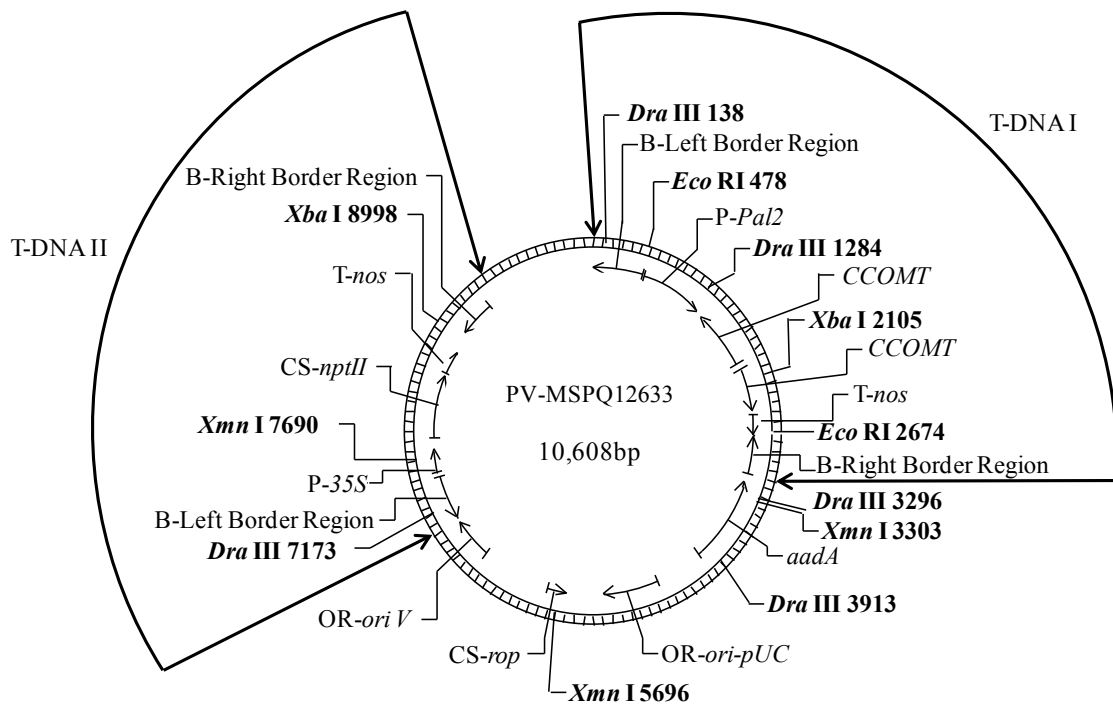


図 2 PV-MSPQ12633 のプラスミドマップ¹

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

¹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 1 供与核酸の構成並びに構成要素の由来及び機能²

構成要素	由来及び機能
T-DNA I 領域	
B ^{注1} -Left Border Region	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界領域を含む <i>Agrobacterium tumefaciens</i> に由来する DNA 断片 (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P ^{注2} - <i>Pal2</i>	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)。植物細胞で恒常的に転写を誘導する。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>CCOMT</i> *	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	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>CCOMT</i>	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	DNA クローニングの際に利用された配列。
T ^{注3} - <i>nos</i>	転写を終結させポリアデニル化を誘導する <i>A. tumefaciens</i> pTi 由来のノパリン合成酵素遺伝子の 3' 非翻訳領域 (Bevan, 1984; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界領域を含む <i>A. tumefaciens</i> に由来する DNA 断片 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。

²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	由来及び機能
外側骨格領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
<i>aadA</i>	トランスポゾン <i>Tn7</i> の 3'(9)- <i>O</i> -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'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	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR ^{注4} - <i>ori-pUC</i>	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	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS ^{注5} - <i>rop</i>	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のコード配列であり、 <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	DNA クローニングの際に利用された配列。
OR- <i>ori V</i>	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	DNA クローニングの際に利用された配列。
T-DNA II 領域	
B-Left Border Region	T-DNA を伝達する際に利用される左側境界領域を含む <i>A. tumefaciens</i> に由来する DNA 断片 (Barker et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
P-35S	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	由来及び機能
T-DNA II 領域	
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
CS- <i>nptII</i>	<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ォトランスフェラーゼ II をコードする遺伝子 (Beck et al., 1982)。植物にネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
T- <i>nos</i>	<i>R. radiobacter</i> T-DNA 由来のノパリン合成酵素 (nos) 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域で、mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する (Bevan, 1984; Fraley et al., 1983)。
Intervening Sequence	DNA クローニングの際に利用された配列。
B-Right Border Region	T-DNA を伝達する際に利用される右側境界領域を含む <i>A. tumefaciens</i> に由来する DNA 断片 (Depicker et al., 1982; Zambryski et al., 1982)。
外側骨格領域	
Intervening Sequence	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)

注⁴OR, Origin of Replication (複製開始領域)

注⁵CS, Coding Sequence (コーディング配列)

* *CCOMT* 遺伝子抑制カセット内の 1,654-1,953 bp と 2,410-2,111 bp は同一の配列である

- 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 1, p19~21)、*CCOMT*遺伝子断片からdsRNAが産生されることで内在性の*CCOMT*遺伝子の転写が抑制される。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、米国食品医薬品局 (FDA) によりGRAS (generally recognized as safe) の認定を受けている (FAO-WHO, 1991; U.S. FDA, 1992)。

10

- ③ 宿主の持つ代謝系を変化させる場合はその内容

15

セルロース及びヘミセルロースから成る一次細胞壁は生長過程の植物細胞の細胞間に存在し、各細胞を取り囲んでいる。細胞の生長が停止するとより厚く、強固な二次細胞壁が一次細胞壁の内側に形成される。二次細胞壁にはセルロース、ヘミセルロース及びリグニンが含まれる。リグニンは二次細胞壁の主要構成成分のひとつであり、植物体の茎を支持するとともに栄養分や水の移動に重要な役割を果たしている。また、病原体の侵入を妨げることにより、病害に対する抵抗性にも寄与していると考えられる(Vance et al., 1980)。

20

アルファルファのリグニンはリグニンモノマーであるコニフェリルアルコール(guaiacyl: G リグニン)、シナピルアルコール(syringal: S リグニン)及びp-クマリルアルコール(p-hydroxyphenyl: H リグニン)の3種からなる (Boerjan et al., 2003)。また、アルファルファのリグニン中にはG リグニンとS リグニンが多く、H リグニンは少ない。これらの3種のリグニンモノマーが重合し三次元網目構造を形成することによりリグニンが生成される。リグニン中の3種のリグニンモノマーの比率は植物の種類や組織により異なることが知られている(Boerjan et al., 2003)。

25

30

アルファルファにおけるリグニン生合成経路を図 3 (p24)に示した。G リグニン及びS リグニンの生合成に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といった二次代謝産物の酸素原子をメチル化する酵素群であるO-メチルトランスフェラーゼが必要である(Lam et al., 2007)。O-メチル

35

トランスフェラーゼの一種であるカフェオイル-CoA-3-O-メチルトランスフェラーゼ(CCOMT)は G リグニンの生合成経路における中間代謝産物であるカフェオイル-CoA をメチル化することによりフェルロイル-CoA を産生する(図 3, p24)。実際に、アルファルファにおいてカフェイン酸-3-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)は S リグニンの生合成に、CCOMT は G リグニンの生合成に
5 関与していることが示され、CCOMT の抑制により S リグニン及び H リグニン量にほとんど影響することなく G リグニンが減少することが示されている(Guo et al., 2001)(図 3, p24)。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、
10 アルファルファのリグニンも減少する。

本組換えアルファルファと同様に、CCOMT を抑制することにより G リグニンを減少させたアルファルファにおいて、リグニン生合成経路及びその下流の経路への影響を評価するため、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関する分析が既に行われている(Chen et al., 2003; Chen et al., 2006)。
15

その結果、CCOMT 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に変化は認められなかった(Chen et al., 2003; Chen et al., 2006)。さらに、フラボノイド配糖体の葉と茎における比率についても違いは認められなかった(Chen et al., 2006)。
20 CCOMT 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。したがって、カフェオイル 3-O-グルコシドの量は少量であると考えられた。さらに、Chen ら (2003)は、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 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には違いが認められなかったことを報告している(Chen et al., 2003)。
25

以上の結果から、アルファルファにおいて CCOMT 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る。
30

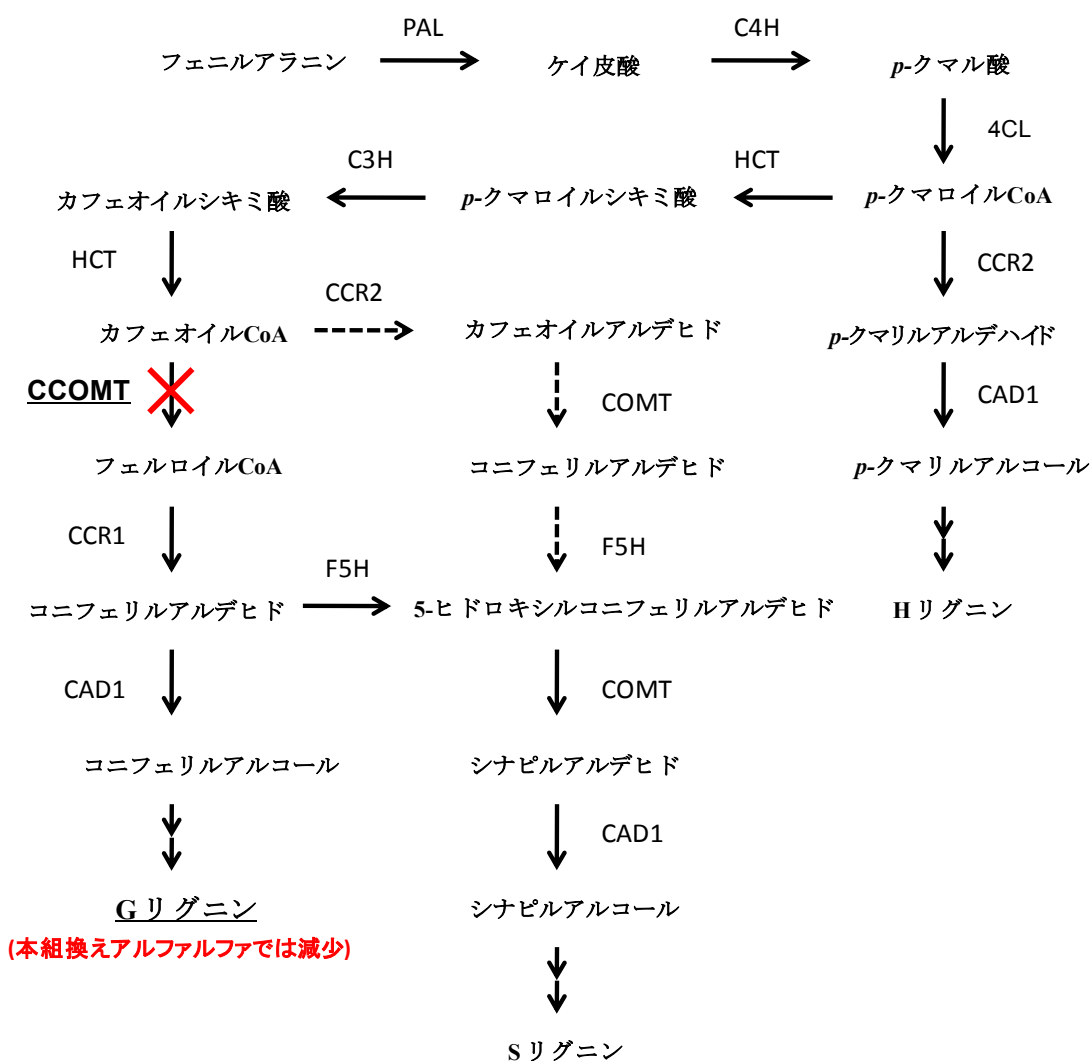


図 3 アルファルファにおけるリグニンの生合成経路³

×は、本組換えアルファルファ種子において内在性酵素 (CCOMT) RNA の翻訳が抑制されることを示す。

-> で示す経路は、非組換えアルファルファでは働きが弱い、CCOMT が抑制された系統では本経路の働きが高まる(Zhou et al 2010)。

CAD: シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ

4CL: 4 クマロイル CoA リガーゼ

C3H: *p*-クマロイル 3-ヒドロキシラーゼ

C4H: *p*-クマロイル 4-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

CCR: シンナモイル CoA レダクターゼ

COMT: カフェイン酸-O-メチルトランスフェラーゼ

HCT: *p*-ヒドロキシシンナモイル, キナ酸シキミ酸 *p*-ヒドロキシシンナモイル
トランスフェラーゼ

F5H: フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ

PAL: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

³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

5 本組換えアルファルファでは内在性の *CCOMT* 遺伝子の転写が抑制されることにより植物体のリグニン含量が減少している。本組換えアルファルファは導入された *CCOMT* 遺伝子断片が dsRNA を形成できるよう逆方向反復の形で導入することにより作出された。導入された遺伝子断片による RNAi により内在性の *CCOMT* 遺伝子の転写が抑制され、リグニン含量が減少する。

10 *CCOMT* 遺伝子の発現がリグニン含量に与える影響を確認するため、植物体における G、S 及び H リグニンの分析を行った。その結果、本組換えアルファルファにおいて、対照の非組換えアルファルファと比較して G リグニンが減少していることが確認された($p < 0.05$; 表 2, p26、別添資料 1 の Table1, p5)。G リグニン含量は本組換えアルファルファでは 58.66 $\mu\text{mol/g}$ cell wall residue (CWR)、対照の非組換えアルファルファでは 80.22 $\mu\text{mol/g}$ CWR であり、本組換えアルファルファでは対照の非組換えアルファルファと比較して G リグニンが
15 26.89%減少していた。

なお、S 及び H リグニン含量に関して、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有意差は認められず、本組換えアルファルファでは G リグニンのみ減少していることが確認された(別添資料 1 の Table1, p5)。

表 2 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 G、S 及び H リグニン含量⁴

分析成分 ($\mu\text{mol/g CWR}$) ¹	本組換え アルファルファ 平均値 (S.E.) ² (範囲)	対照の非組換え アルファルファ ³ 平均値 (S.E.) (範囲)	差 (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)	
			平均値 (S.E.) (範囲)	p-値 ⁴
G リグニン	58.66 (5.37) (49.33 - 66.39)	80.22 (5.37) (64.51 - 93.39)	-21.57 (6.42) (-33.78 - -11.09)	0.002
S リグニン	50.72 (4.85) (42.17 - 61.26)	47.18 (4.85) (37.89 - 51.58)	3.55 (3.25) (-4.15 - 14.34)	0.285
H リグニン	4.93 (0.41) (3.96 - 6.38)	3.63 (0.41) (2.60 - 4.27)	1.31 (0.55) (0.27 - 2.61)	0.062

¹ CWR = Cell Wall Residue: 植物サンプルをクロロホルム/エタノール(2:1, v/v)、メタノール及び水抽出した残渣

² 平均値(S.E.) = 最小二乗平均 (標準誤差)

³ 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。

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

⁴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ベクター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。

ロ 特性

10

① ベクターの塩基数及び塩基配列

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。

15

② 特定の機能を有する塩基配列がある場合は、その機能

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。

20

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

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 1(p19~21) 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(p18) 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、従来アルファルファ R2336 系統の葉組織へ導入した。

ハ 遺伝子組換え生物等の育成の経過

5

① 核酸が移入された細胞の選抜の方法

従来アルファルファ 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。

10

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形質転換に用いたプラスミド・ベクター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プラスミド・ベクターPV-MSPQ12633 の外側骨格領域は存在しなかった (別添資料 2)。このことから、本組換え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 2)。

15

20

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

25

形質転換された再分化個体 (T0) を従来アルファルファ 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。この選抜された個体の後代を導入遺伝子解析及び形態特性調査の対象とし、最終的に商品化系統として KK179 系統を選抜した。

30

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; Hill, 1983; Wilsie, 1958)。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

35

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、不均一な集団である。そのため、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。

本組換えアルファルファの育成図を 図 4(p30) 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後代交配種である。

5

10

【社外秘につき非開示】

15

20

図 4 本組換えアルファルファの育成図

25

30

【社外秘につき非開示】

(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) を従来アルファルファ 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 TaqMan PCR により導入遺伝子の有無を調べた。

15

その結果、実測値と期待値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。導入遺伝子はメンデルの法則に従い分離していることが確認された(表 3, p32; 別添資料 3 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。

表 3 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⁵

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

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 ($p<0.05$)。

⁵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ゲノム中 1 ヶ所に 1 コピーの T-DNAI 領域が組み込まれており(別添資料 4 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 5 の Figure4, p13)。また、T-DNAII 及び外側骨格領域は導入されていないことが確認されている(別添資料 4 の
10 Figure8-10, p43-45)。

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

15 1 コピーなので該当しない(別添資料 4 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

20 2010年に米国の2ヶ所(アイオワ州及びウィスコンシン州)のほ場において、3反復で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(MBC1、Syn1 及び Syn1-Adv1)における地上部の総リグニン含量として酸性デタージェントリグニン⁶(ADL)の分析を行った。

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 4, p34; 別添資料 6 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 4, p34; 別添資料 6 の Table 1, p4)。

なお、隔離ほ場試験期間中に米国において本組換えアルファルファの導入遺伝子から転写された RNA について、世代間での発現の安定性を確認する予定である。
30

⁶ 酸性デタージェント溶液を用いて、試料中のリグニン量を測定した(亀岡, 1998)。

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における酸性デタージェントリグニン含量(2010年、米国)⁷

供試世代	平均値 (%乾燥重) (S.E.) ¹ (範囲)		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差	
	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 ²	平均値 (S.E.) (範囲)	p-値 ³
MBC1	4.37 (0.36) (3.55 - 5.63)	5.31 (0.36) (4.42 - 7.11)	-0.94 (0.27) (-2.09 - 1.16)	0.002
Syn1	4.02 (0.36) (3.30 - 4.31)	4.64 (0.36) (4.15 - 5.39)	-0.62 (0.27) (-1.21 - 0.060)	0.034
Syn1-Adv1	3.91 (0.36) (3.61 - 4.42)	4.62 (0.36) (3.72 - 4.89)	-0.71 (0.27) (-1.15 - -0.060)	0.016

¹ 平均値(S.E.) = 最小二乗平均 (標準誤差)

² 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である R2336 系統から作出した C0-MBC1、C0-Syn1 及び C0-Syn1-Adv1 世代を用いた。

³ 分散分析により統計処理を行った(n=6 (1 サンプル/反復で 6 反復)、p<0.05 で有意)。

⁷ 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PCR法による検出及び識別が可能である(別添資料7)。

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いて、葉の一部(リーフディスク)を用いて検定できる。

15

本法の信頼性を確認するにあたり、1植物体から1つのリーフディスクを採取し、それらを本法により分析することで、植物体が本組換えアルファルファの陽性サンプル若しくは陰性サンプルかどうかを確認した。次に、陽性サンプルと確認された植物体のリーフディスクから46サンプルを、同じく陰性サンプルと確認された植物体のリーフディスクから134サンプルを採取し、

20 それらをさらに本法で分析した。その結果、陽性サンプル46サンプル中46サンプルが陽性反応を示し、陰性サンプル134サンプル中134サンプルが陰性反応を示した。これらの偽陰性率及び偽陽性率は許容基準である5%以内に収まっていた。

25

(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

30

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

35 リグニンが減少することにより、アルファルファのリグニンも減少する。

- 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

5

本組換えアルファルファの宿主は従来アルファルファ R2336 系統であり、導入遺伝子は *CCOMT* 遺伝子断片である。

10 アルファルファ(*M. sativa* L.)と交雑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、これらは日本には存在しない。

15 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、病害に対する抵抗性が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。

20 さらに、本組換えアルファルファと別系統の *CCOMT* 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* 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; 25 Chen et al., 2006)。さらに、二次代謝産物であるフラボノイド配糖体の葉と茎における比率についても違いは認められなかった(Chen et al., 2006)。また、*CCOMT* 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。したがって、30 カフェオイル 3-O-グルコシドの量は少量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* 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* が抑制されることにより、35 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、本組換えアルファルファの隔離ほ場試験を行うに当たっては、生理学的又は生態学的特性についてのデータを用いずに生物多様性影響評価が可能であると判断した。

5

なお、本組換えアルファルファの隔離ほ場試験では、生理学的又は生態学的特性に関わる以下の項目を調査する予定である。

- 10 ① 形態及び生育の特性(一年目：播種日(月日)、発芽揃い(月日)、発芽率(%)、葉色、草丈(cm)、地上部重及び秋の再生草丈(cm)、二年目：耐寒性(欠株率)、耐寒性(萌芽始め)、耐寒性(早春の草勢)、草型、茎数、開花始め(月日)、開花期(月日)、花色、開花数、草丈(cm)、裂莢程度、地上部重、一莢粒数、1000粒重)、② 生育初期における低温又は高温耐性、③成体の越冬性及び越夏性、④ 花粉の稔性及びサイズ、⑤ 種子の生産量、脱粒性、休眠性及び発芽率、
15 ⑥有害物質の産生性(土壌微生物相試験、鋤込み試験及び後作試験)

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

20

隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

(2) 使用等の方法

25

所在地：栃木県那須塩原市千本松 768 番地

名称：独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構

畜産草地研究所隔離ほ場

使用期間：承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで

30

1 隔離ほ場の施設

- (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 35 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えアルファルファの種子等を洗浄によって除去するための洗

い場を設置しているとともに、当該アルファルファの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。

- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を減少させるための防風林を設置している。
- (5) 播種時及び成熟期には防鳥網などを用いた鳥害防止策を講じる。また開花期には試験区を防虫網で覆うことにより昆虫の侵入を防止する。

2 隔離ほ場での作業要領

- 10 (1) 本遺伝子組換えアルファルファ及び比較対照のアルファルファ以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを最小限に抑える。
- (2) 本遺伝子組換えアルファルファを隔離ほ場の外に運搬し、又は保管する場合は、当該アルファルファが漏出しない構造の容器に入れる。
- 15 (3) (2)により運搬又は保管をする場合を除き、本遺伝子組換えアルファルファの栽培終了後は、当該アルファルファ及び比較対照のアルファルファを隔離ほ場内にすき込む等により、確実に不活化する。
- (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに本遺伝子組換えアルファルファが隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- 20 (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- (6) (1)から(5)までに掲げる事項を第一種使用等を行う者に遵守させる。
- 25 (7) 別に定めるモニタリング計画に基づき、モニタリングを実施する。
- (8) 生物多様性影響が生ずるおそれがあると認められるに至った場合は、別に定める緊急措置計画書に基づき、速やかに対処する。
- 30 (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

別に定めるモニタリング計画書に基づき、モニタリングを実施する。

- (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

申請書に添付した緊急措置計画書を参照。

5

- (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

—

(6) 国外における使用等に関する情報

5 これまで 2007-2011 年の間に米国、カナダにおいて延べ 79 カ所のほ場において
試験が行われているが(表 5, p40)、非組換えアルファルファと比較して生物多様性
影響を生じるおそれがあるような相違は報告されていない。

10 なお、本組換えアルファルファの海外における申請予定は表 6 (p40)のとおりで
ある。

15 表 5 海外における本組換えアルファルファのほ場試験の試験時期、ほ場数及び
国名

20 【社外秘につき非開示】

25 表 6 海外における本組換えアルファルファの申請予定

30 【社外秘につき非開示】

第二 項目ごとの生物多様性影響の評価

1 競合における優位性

5

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

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(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; 太田, 2010; 杉野, 2008)、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。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., 2007; 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し(Bagavathiannan et al., 2011)、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., 2007; 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。そのため、わが国では、現在、北海道を中心に栽培されているが、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(鈴木, 1992; 農林水産省, 2004)。

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, 2002)。また、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いるが、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)。

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。

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、病害や害虫に

対する抵抗性が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。

5 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、隔離ほ場試験の形態及び生育特性区においては、慣行法に準じて病虫害防除等を行い、開花期には植物体に防虫網を被せることから、病虫害に
10 対する抵抗性が影響を及ぼすとは考えにくい。また、隔離ほ場試験において、病害及び害虫発生状況の調査試験区では病虫害の防除を行わないが、供試個体数が少ないことから仮に病虫害の発生が認められた場合でも影響は限定されると考えられる。よって、病害及び害虫発生状況の調査により、野生動植物等に影響を及ぼすとは考えにくい。

15

以上のことから、本組換えアルファルファを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

20 (2) 影響の具体的内容の評価

—

(3) 影響の生じやすさの評価

25

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

30 以上のことから、本組換えアルファルファは、限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

35 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

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(Ells and McSay, 1991; Ferreira and Reinhardt,
5 2010; Hegde and Miller, 1990; Xuan and Tsuzuki, 2002)。アルファルファの組織
の他感作用と水溶性抽出物の他感作用は異なることが報告されている(Chung
and Miller, 1995a; Chung and Miller, 1995b; Ells and McSay, 1991; Hegde and
Miller, 1990)。葉、生殖組織及び抽出物では根組織、根からの抽出物及び土壤
滲出物よりも他感作用が強いことが報告されている(Chung and Miller, 1995a)。

10 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
(Chon et al., 2006; Dornbos et al., 1990)。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
認められた土壤中で存在することが確認されている。メディカルピンの添加
15 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 (Chon et al., 2006; Dornbos et al., 1990)。

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
20 ファの内在性遺伝子である *CCOMT* 遺伝子の一部であり(表 1, p19~21)、
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
の転写が抑制される。

本組換えアルファルファとは別系統の *CCOMT* 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
25 産物について調査が行われた研究報告によると、*CCOMT* 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)。さらに、二次代謝産物であるフラボノイド配糖体の葉と茎における比
率についても違いは認められなかった(Chen et al., 2006)。また、*CCOMT* を抑
30 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。したがって、カフェオイ
ル 3-*O*-グルコシドの量は少量であると考えられた。さらに、水溶性フェノー
35 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*
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* 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。

5 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。

10 以上のことから、本組換えアルファルファを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

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

—

20 (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限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

25 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

30 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 (Quiros and Bauchan, 1988; Small and Jomphe, 1989; Chandra et al., 2011; Michaud et al., 1988)、これらは日本には自生していない (大橋, 1999; 大橋, 2003)。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種は特定されなかった。

35

(2) 影響の具体的内容の評価

—

5 (3) 影響の生じやすさの評価

—

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

10

以上のことから、本組換えアルファルファは限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場で使用する範囲内では、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。

15 4 その他の性質

—

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。また、アルファルファの幼植物は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すること、またアルファルファがわが国の湿潤気候と酸性土壌には適さないことなどの理由により、わが国での栽培面積はおよそ 9,000ha 前後とあまり普及していない。

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。また、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いるが、有害雑草リストにはアルファルファの記載はない。

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判断された。

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。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、病害に対する抵抗性が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るが、隔離ほ場試験の形態及び生育特性区においては、慣行法に準じて病虫害防除等を行い、開花期には植物体に防虫網を被せることから、病虫害に対する抵抗性が影響を及ぼすとは考えにくい。また、隔離ほ場試験において、病害及び害虫発生状況の調査試験区では病虫害の防除を行わないが、供試個体数が少ないことから仮に病虫害の

発生が認められた場合でも影響は限定されると考えられる。よって、病害及び害虫発生状況の調査により、野生動植物等に影響を及ぼすとは考えにくい。

したがって、本組換えアルファルファを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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* 遺伝子の転写が抑制される。

本組換えアルファルファとは別系統の *CCOMT* 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* 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。

以上のことから、本組換えアルファルファを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

以上のことから、本組換えアルファルファを限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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は限定された環境で一定の作業要領を備えた隔離ほ場における栽培、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為の範囲内では、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。

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.

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.

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.

Barnes, D.K. and C.C. Sheaffer. 1995. Alfalfa. Pages 205-216 in *Forages: An Introduction to Grassland Agriculture*. Volume 1. Fifth Edition. 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.

Bauchan, G. R. and J. H. Elgin, Jr. 1984. A new chromosome number for the genus *Medicago*. *Crop Science* 24: 193-195.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.

Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acid Research* 12: 8711-8721.

Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 54: 519-546.

Bohart, G.E. 1957. Pollination of alfalfa and red clover. *Annual Review of Entomology*

2: 355-380.

Campbell, T.A. and Y. He. 1997. Factorial analysis of self-incompatibility in alfalfa. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 69-73.

Canevari, M., R.N. Vargas and S.B. Orloff. 2007. Weed Management in Alfalfa. *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean Desert Zones*, University of California.

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*: in Press.

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.). *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.

Chung, I.-M. and D.A. Miller. 1995a. Effect of alfalfa plant and soil extracts on germination and growth of alfalfa. *Agronomy Journal* 87: 762-767.

Chung, I.-M. and D.A. Miller. 1995b. Differences in autotoxicity among seven alfalfa cultivars. *Agronomy Journal* 87: 596-600.

Cooper, D.C. and R.A. Brink. 1940. Partial self-incompatibility and the collapse of fertile ovules as factors affecting seed formation in alfalfa. *Journal of Agricultural Research* 60: 453-472.

Cramer, C., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S. Dildine, G.P. Bolwell, R. Dixon, C. Lamb and W. Schuch. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and

structure. *Plant Molecular Biology* 12: 367-383.

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.

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.

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.

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

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.

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, Jr. (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

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*

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 Res.* 13: 7095-7106.

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. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.

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.

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

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.

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.

Hancock, D.W., G.D. Buntin, L.O. Ely, L.R. C., G.L. Heusner and R.L. Stewart. 2009. Alfalfa Management in Georgia. The university of Georgia Cooperative Extension.

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.

- Hill, R.R. 1983. Heterosis in population crosses of alfalfa. *Crop Science* 23: 48-50.
- Inoue, K., V.J.H. Sewalt, G. Murray Ballance, W. Ni, C. Sturzer and R.A. Dixon. 1998. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-*O*-methyltransferase and maffeoyl coenzyme A 3-*O*-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology* 117: 761-770.
- Jennings, J.A. and C.J. Nelson. 2002a. Zone of autotoxic influence around established alfalfa plants. *Agronomy Journal* 94: 1104-1111.
- Jennings, J.A. and C.J. Nelson. 2002b. Rotation interval and pesticide effects on establishment of alfalfa after alfalfa. *Agronomy Journal* 94: 786-791.
- Lam, K.C., R.K. Ibrahim, B. Behdad and S. Dayanandan. 2007. Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* 50: 1001-1013.
- 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.
- 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.
- Lesins, K.A. and I. Lesins. 1979. Evolution in *Medicago*. Pages 46-58 in *Genus Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Kluwer Academic Publishers Group, The Hague, Netherlands.
- McCoy, T. J. and 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., Madison, Wisconsin.

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.

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.

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. Series on the Safety of Novel Foods and Feeds. Paris, France, Organisation for Economic Co-operation and Development, .

Oldemeyer, R.K. 1956. Interspecific hybridization in *Medicago*. *Agronomy Journal* 48: 584-585.

Putnam, D.H., S.B. Orloff and L.R. Teuber. 2007. Choosing an Alfalfa variety. *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean Desert Zones*, University of California.

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., Madison, Wisconsin.

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 R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

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. 1983a. Pollen germination and pollen tube growth following self-pollination and intra- and interspecific pollination of *Medicago* species. *Euphytica* 32: 527-534.

Sangduen, N., G. L. Kreitner, and E.L. Sorensen. 1983b. Light and electron microscopy of embryo development in an annual x perennial *Medicago* species cross. *Canadian Journal of Botany*. 61: 1241-1257.

Schrotenboer A. C., M. S. Allen and C. M Malmstrom. 2011. Modification of native grasses for biofuel production may increase virus susceptibility. *Global change biology bioenergy* 3: 360-374.

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.

Sheaffer, C.C., G.D. Lacefield and V.L. Marble. 1988. Cutting schedules and stands. Pages 411-437 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

Small, E. and M. Jomphe. 1989. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67: 3260-3294.

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.

St. Amand, P.C., D.Z. Skinner and R.N. Peaden. 2000. Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 107-114.

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.

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* sequence. *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.

Teuber, L.R. and M.A. Brick. 1988. Morphology and anatomy. Pages 125-162 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. 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.

Teuber, L.R., S. Mueller, A.V. Deynze, S. Fitzpatrick, J.R. Jagler and J. Arias. 2007. Seed-to-seed and hay-to-seed pollen mediated gene flow in alfalfa Page 204, North Central Weed Science Society Proceedings, Champaign, Illinois.

UC-IPM. 2010. UC IPM pest management guidelines - Alfalfa. Statewide IPM Program, Agriculture and Natural Resources, University of California, Oakland, California.

<http://www.ipm.ucdavis.edu/PDF/PMG/index.html>

[Accessed August 24, 2011]

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>

[Accessed October 19, 2011]

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]

U.S. FDA. 1992. Statement of policy: Foods derived from new plant varieties. *Federal Register*: 22984-23005.

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.

USDA-NASS. 2010. Noncitrus fruits and nuts: 2009 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].

USDA. 2007. 2007 census of agriculture. AC-07-A-51. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

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.

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

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

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

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

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

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.

Zhou R, Jackson L, Shadle G, Nakashima J, Temple S, Chen F and Dixon RA. 2010. Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17803-17808.

浅沼昌平、狩山俊悟、榎本敬、小島裕子 1987 岡山県の帰化植物 倉敷市立自然史博物館 倉敷市

上野昌彦 1987 16 飼肥料作物 マメ科 アルファルファ Pages 762-763 第2次増訂改版 農学大辞典. 野口ら (編) 株式会社 養賢堂 東京

大分県植物誌刊行会 1989 新版 大分県植物誌 大分県

太田久次 1999 鈴鹿市の帰化植物 有限会社 ムツミ企画 津市

太田久次 2010 三重県帰化植物誌 有限会社 ムツミ企画 津市

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 Page 194 新装版 日本の野生植物 草本 II 離弁花類 佐竹ら (編) 株式会社 平凡社 東京

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 Page 113 日本の帰化植物 清水建美 (編) 株式会社 平凡社 東京

亀岡暄一 1998 アルファルファ アルファルファミール Page 14 新編 飼料ハンドブック 社団法人 日本科学飼料協会 東京

財務省 2011 財務省貿易統計 財務省

<http://www.customs.go.jp/toukei/info/index.htm> [Accessed April 4, 2011].

清水矩宏、森田弘彦、廣田伸七 2001 ムラサキウマゴヤシ Page 138 日本帰化植物写真図鑑 -Plant invader 600種- 清水ら (編) 全国農村教育協会 東京

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 富士市

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 札幌

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

農林水産省 農林水産技術会議事務局 2004 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

北海道 2010 北海道の外来種リスト -北海道ブルーリスト 2010-

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 Page 121-125 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 盛岡

水上優子、神戸三智雄 2004 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 Pages 49-50 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

水田光雄 1998 神戸港の帰化植物調査(完結) 兵庫の植物8号 兵庫県植物誌研究会 神戸市

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 兵庫県植物誌研究会 神戸市

緊急措置計画書
(畜産草地研究所隔離ほ場)

平成 23 年 9 月 13 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 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

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おそれがあると、科学的根拠に基づき立証された場合、以下の措置を執ることとする。

- 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とおりである。

平成 23 年 9 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 河内研究農場 農場長
	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 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	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

* : 管理責任者

2 第一種使用等の状況の把握の方法

第一種使用等の状況は、畜産草地研究所隔離ほ場実験従事者から得られた情報により把握する。

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

実験従事者に直接口頭で伝える。

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、本組換え体を隔離ほ場内で鋤き込むか焼却するなどして隔離ほ場外への本組換え体の放出が行われないようにすること、隔離ほ場周辺をモニタリングすることにより本組換え体が隔離ほ場外へ放出されていないことを確認すること等、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

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おそれが見込まれた場合、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。

モニタリング計画書
(畜産草地研究所隔離ほ場)

平成 23 年 9 月 13 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 東京都中央区銀座四丁目 10 番 10 号

1. 実施体制及び責任者

「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。)」のモニタリングについて、現時点での実施体制及び責任者は以下に示すとおりである。

平成 23 年 9 月現在

社内委員	
*	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 河内研究農場 農場長
	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 バイオ規制・環境部 油糧作物担当課長
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	日本モンサント株式会社 バイオ規制・環境部
	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

* : 管理責任者

2. モニタリングの対象となる野生動植物等の種類の名称

我が国に *Medicago sativa* L.(アルファルファ)と交雑可能な野生種は存在しない。ただし、*Medicago sativa* L.(アルファルファ)自身が我が国において帰化植物として存在している。よって、*Medicago sativa* L.(アルファルファ)をモニタリングの対象とする。

3. モニタリングを実施する場所及びその場所における対象となる野生動植物等の生息又は生育状況

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。

本組換えアルファルファの開花期間中には試験区を防虫網で覆うことにより昆虫の侵入を抑止する。虫媒抑止確認のために隔離ほ場周辺 10m の範囲内においてモニタリングを実施する。

4. モニタリングの期間

本組換えアルファルファの栽培期間中とする。

5. 実施時期、頻度その他のモニタリングの方法

Medicago sativa L.(アルファルファ)自身が我が国において野生化している。

しかし、栽培期間中には防虫網を被せることで虫媒を低減ことが出来る。隔離ほ場試験では、防虫網による虫媒の低減を考慮した上でモニタリングを行う範囲を設定した。

- 1) 本組換えアルファルファの開花期間中に、隔離ほ場周辺 10m 以内に開花している *M. sativa* L.が生育しているかどうかを確認する。確認された場合は、位置情報及び個体数を記録する。隔離ほ場周辺の利用状況を示す地図を別添 1 として添付した。
- 2) 位置情報を記録した *M. sativa* L.が種子をつけていた場合は、各集団 1 つ当たり最低 50 粒の種子をサンプリングする。
- 3) 収集された *M. sativa* L.種子に *CCOMT* 遺伝子断片が移行しているかどうかを 1 粒ごとに検定する。検定方法は収集されたサンプルの量等を考慮して適宜決定する。

6. モニタリングの結果の解析の方法

交雑検定の結果を基に、遺伝子組換えアルファルファから自生アルファルファへの距離に依存した自然交雑の有無・頻度を解析する。

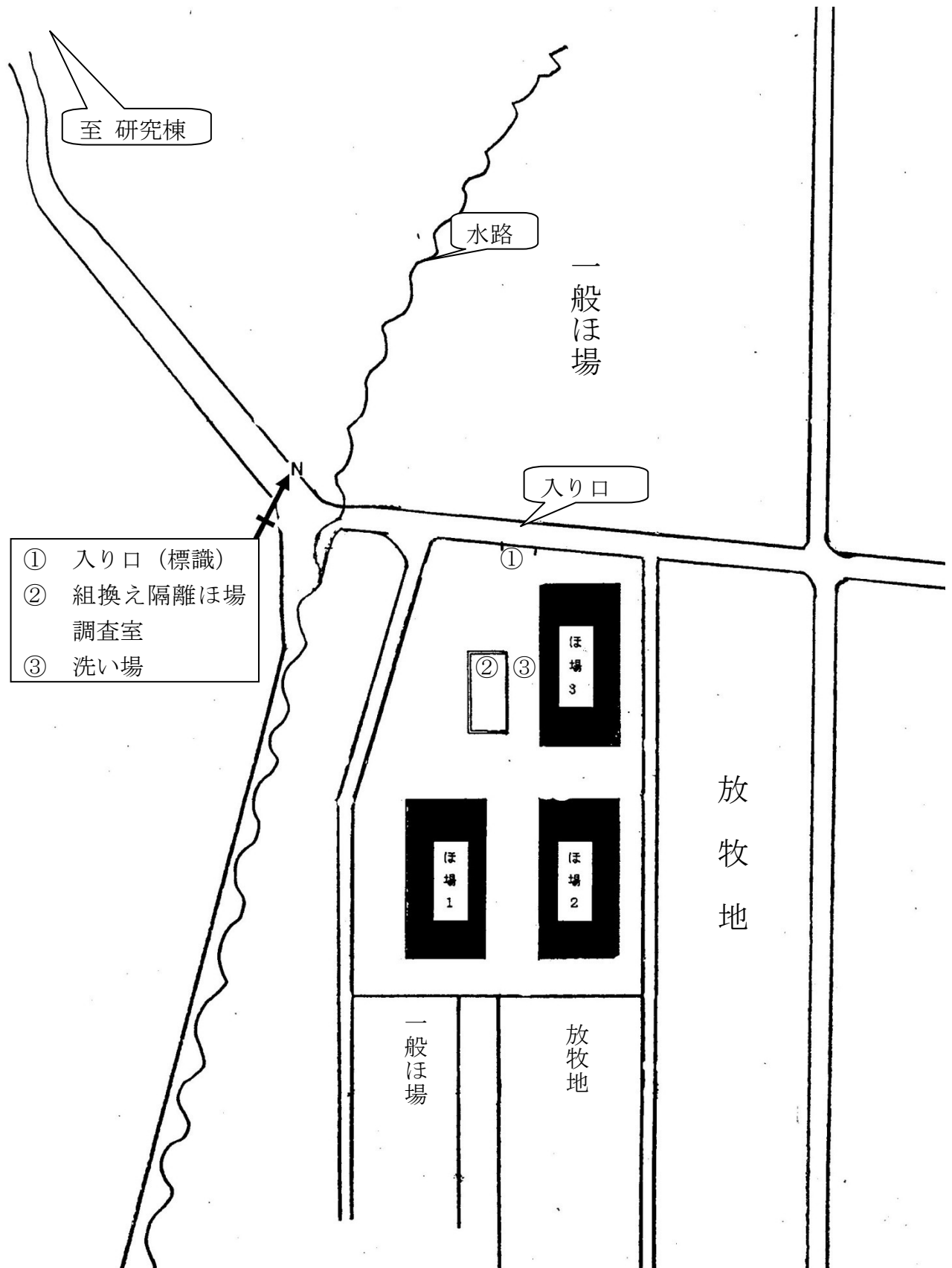
7. 農林水産大臣及び環境大臣への結果の報告の方法

本組換えアルファルファの第一種使用規程(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)の申請時の最終試験報告書中にモニタリング結果を記載し、報告する。

8. その他必要な事項

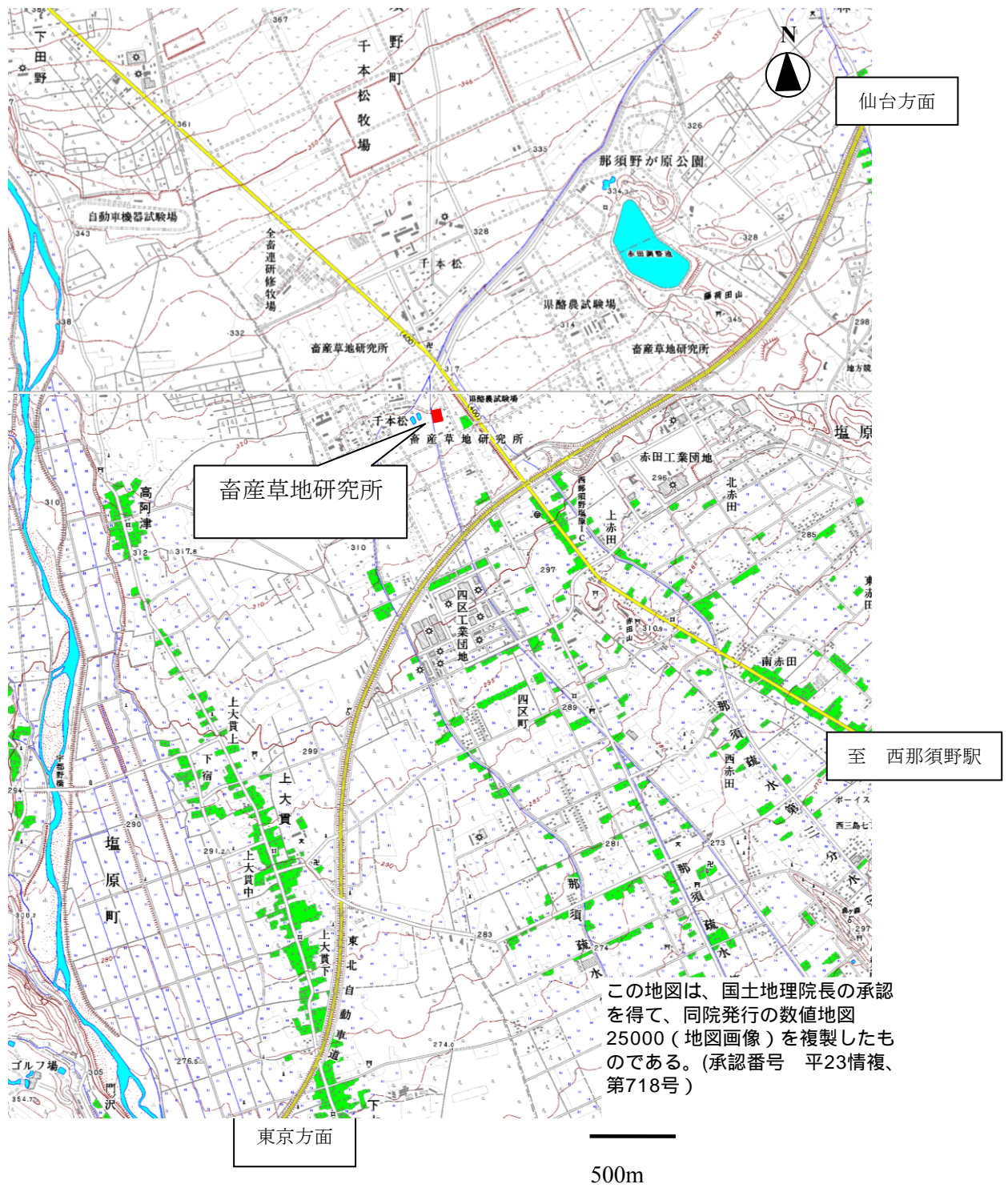
モニタリングの期間中に採取されたアルファルファから *CCOMT* 遺伝子断片が検出される等、当該遺伝子断片のアルファルファへの移行が認められ、若しくはその疑いがある場合にあつては、農林水産省及び環境省とモニタリングの期間等について協議を行うものとする。

別添1⁸



⁸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

別添2 畜産草地研究所隔離ほ場の位置⁹



⁹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

低リグニンアルファルファ KK179 の隔離ほ場試験計画書

第一部 隔離ほ場試験における受容環境

5 I. 隔離ほ場の所在地等

1. 名称

10 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
畜産草地研究所那須研究拠点隔離ほ場

2. 住所

15 栃木県那須塩原市千本松 768 番地

3. 電話番号

0287-37-7252

20 4. 地図

図 1 (p72)を参照

25 II. 責任者等

1. 隔離ほ場試験の責任者

畜産草地研究所 草地研究監 【個人情報につき非開示】

30 2. 隔離ほ場管理責任者

畜産草地研究所 飼料作物研究領域上席研究員 【個人情報につき非開示】

35 III. 試験期間

承認日から平成 28 年 5 月 31 日まで

IV. 隔離ほ場施設概要

部外者の立ち入りを禁止するためのフェンス（高さ 1.6m）、立ち入り禁止であること及び管理責任者を明示するための標識、組換え隔離ほ場調査室、及び洗い場を設置している（図 2, p73）。

5

V. 使用面積等

1. 隔離ほ場全体の面積

10 45a (4,500 m²)

2. 試験に使用する面積

4.5a (450 m²)

15

3. 試験の配地図

図 3 (p74)を参照

20 VI. 隔離ほ場の周辺環境

1. 地形

栃木県の北端、関東平野に位置する（図 1, p72）。

25

2. 周辺の土地利用状況

周辺は、試験ほ場、雑木林、採草地、放牧地、道路、用水路（隔離ほ場のフェンスから 19m）として利用されている。

30

3. 周辺の環境保護区の名称と隔離ほ場からの距離

隔離ほ場境界より半径 1km 以内に環境省の定める自然保護地域（国立公園、国定公園、原生自然環境保全地域等）はない。なお、上記の自然保護地域のうち、隔離ほ場に最も近いのは日光国立公園であり、隔離ほ場からの距離は約 7km である。

35

4. 気象条件等

隔離ほ場の最寄りである気象情報観測地点・栃木県黒磯アメダス観測所（栃木県那須塩原市埼玉）の気象データの平均値を表 1（p68）に示した。（気象庁統計情報ホームページよりダウンロード、2011年6月23日アクセス）。なお2010年の平均気温は13.1度、降水量1,959mmであった。

5

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/view/nml_amd_ym.php?prec_no=41&prec_ch=%93%C8%96%D8%8C%A7&block_no=0329&block_ch=%8D%95%88%E9&year=&month=&day=&elm=normal&view=

表 1 栃木県黒磯アメダス観測所(栃木県那須塩原市埼玉)における気象データの平年値

10

要素	降水量	平均気温	最高気温	最低気温	平均風速	日照時間
	(mm)	(°C)	(°C)	(°C)	(m/s)	(時間)
統計期間	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1981～2010	1987～2010
資料年数	30	30	30	30	30	24
1月	31.5	0.6	5.4	-4.2	2.2	154.4
2月	39.0	1.2	6.1	-3.7	2.4	158.4
3月	80.1	4.3	9.7	-0.9	2.5	177.8
4月	110.9	10.1	15.9	4.2	2.4	177.8
5月	140.6	15.0	20.5	9.5	2.1	163.4
6月	173.4	18.7	23.4	14.4	1.7	116.9
7月	238.4	22.2	26.8	18.6	1.5	110.2
8月	247.7	23.5	28.4	19.8	1.5	127.1
9月	229.5	19.7	24.3	15.9	1.7	110.3
10月	136.4	14.0	18.9	9.2	1.9	132.0
11月	74.2	8.1	13.5	2.8	1.9	144.3
12月	35.0	3.1	8.4	-1.9	2.1	153.9
年	1526.1	11.7	16.8	7.0	2.0	1722.6

10

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

5. 台風の襲来歴

① 平年値

5 気象庁ホームページ気象統計情報によると、隔離ほ場のある関東甲信越地方への台風接近数¹¹の平年値は、3.1 回である（気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2011 年 6 月 23 日）

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/average/average.html>

② 過去 10 年間の隔離ほ場周辺への台風の接近回数

10 関東甲信地方に接近し¹¹、かつ隔離ほ場最寄りの観測地点（栃木県那須塩原市 黒磯アメダス観測所）において日ごとの最大風速が 15m/s を超えた回数¹²を隔離ほ場周辺への台風の接近回数とした。過去 11 年の隔離ほ場周辺への台風の接近回数は 0 回であった（気象庁ホームページ気象統計情報ページ、アクセス 2012 年 1 月 12 日：

15 http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/kanto_koshin.html

<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/generation/generation.html>

<http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php>)

6. 過去 10 年におけるほ場冠水の経験とその程度

20

過去にはほ場が冠水したことはない。

7. 過去 10 年における強風(風速 15m/s 以上) の経験とその程度・頻度

25

2006 年 4 月 3 日(18.3m/s), 4 月 9 日(15.2m/s), 12 月 27 日(17.7m/s),
12 月 29 日(15.2m/s)

2007 年 1 月 7 日(15.1m/s), 5 月 11 日(16.6m/s)

2008 年 2 月 23 日(17.6m/s), 5 月 6 日(15.8m/s), 12 月 26 日(16.7m/s)

30

2009 年 1 月 10 日(18.1m/s), 2 月 8 日(15.8m/s), 2 月 16 日(15.3m/s), 3 月 14 日
(15.7m/s), 3 月 21 日(15.3m/s), 3 月 23 日(15.7m/s),

4 月 15 日(15.8m/s), 5 月 14 日(18.4m/s),

2010 年 4 月 14 日(15.0m/s), 2011 年 4 月 28 日(15.5m/s), 12 月 4 日(16.1m/s)

（畜産草地研究所那須研究拠点隔離ほ場内に設置されている風速計にて測定）

強風によって栽培中の作物が倒伏したことはない。

¹¹台風の中心が茨城県、栃木県、群馬県、埼玉県、千葉県、東京都（島しょ部を除く）、神奈川県、山梨県、長野県のいずれかの気象官署から 300km 以内に入った場合を「関東甲信地方に接近した台風」としている。

（台風の統計資料（気象庁）：<http://www.data.jma.go.jp/fcd/yoho/typhoon/statistics/accession/index.html>）

¹²台風の強風域の定義が平均風速 15m/s であることによる。

（気圧配置 台風に関する用語(気象庁): http://www.jma.go.jp/jma/kishou/known/yougo_hp/haichi2.html）

8. 市町村が策定するハザードマップの位置付け

隔離ほ場周辺は浸水地域に該当しない。

5

9. 周辺地域における鳥獣害の発生状況

2004年に隔離ほ場から約800m離れた生産ほ場で熊によるトウモロコシの食害発生があった。2005年以降は被害はない。なお隔離ほ場で鳥獣害が発生したことはない。

10

VII. 隔離ほ場周辺の生物相

1. 遺伝子組換え農作物を、隔離ほ場で栽培等を行うことによって、影響を受ける可能性のある野生動植物及びその中に希少種が含まれる場合はその名称等

15

なし

2. 交雑可能な近縁野生種及びその中に希少種が含まれている場合はその名称等

20

わが国には交雑可能な野生種は存在しない。

ただし、自生している *Medicago sativa* L.(アルファルファ)自身が交雑可能な帰化植物である。

25

なお、平成23年6月の時点で隔離ほ場周囲半径10mの範囲でアルファルファの有無を調査したが、生育は確認されなかった。

VIII. 栽培管理等

30

1. 隔離ほ場の栽培履歴

隔離ほ場における栽培履歴は図4(p75)に示した通りである。

35

2. 気象災害時の対応

気象災害が起こった場合、まず試験区域における被害状況を確認し、必要と判断した場合には緊急措置計画書に従って速やかに対策を講ずるが基本的には畜産草地研究所那須研究所のマニュアルに準ずる。

3. 栽培終了後の利用計画（ボランティア植物の監視を含む）

5 ボランティア植物の発生を確認した場合、ただちに隔離ほ場内に鋤き込む等の適切な手段で処分する。なお、翌年は休耕する。

4. 隔離ほ場試験における生物多様性影響の安全対策に関する措置

- 10 (1) 部外者の立入りを防止するため、隔離ほ場を取り囲むようにフェンスを設置している。
- (2) 隔離ほ場であること、部外者は立入禁止であること及び管理責任者の氏名を明示した標識を見やすい所に掲げている。
- 15 (3) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等に付着した土、本遺伝子組換えアルファルファの種子等を洗浄によって除去するための洗い場を設置しているとともに、当該アルファルファの隔離ほ場の外への流出を防止するための設備を排水系統に設置している。
- (4) 隔離ほ場周辺には、花粉の飛散を防止するための防風林を設置している。
- (5) 鳥害を防ぐために、常時、防鳥網を設置する。また開花期には防虫網で覆うことにより虫媒を防止する。

20

5. 作業要領

- (1) 試験実施中の組換え作物及び比較対照の作物以外の植物が、隔離ほ場内で生育することを極力防止する。
- 25 (2) 組換え作物を隔離ほ場の外に運搬し、また保存する場合は、当該作物が漏出しない構造の容器に入れる。
- (3) (2)により運搬または保存する場合を除き、組換え作物の栽培終了後は、当該作物及び比較対照作物を隔離ほ場に鋤込むこと等により、確実に不活化する。
- 30 (4) 隔離ほ場で使用した機械、器具、靴等は、作業終了後、隔離ほ場内で洗浄すること等により、意図せずに組換え作物が隔離ほ場の外に持ち出されることを防止する。
- (5) 隔離ほ場が本来有する機能が十分に発揮されるように、設備の維持及び管理を行う。
- 35 (6) 1)から5)に掲げる事項を第1種使用等を行う者に遵守させる。

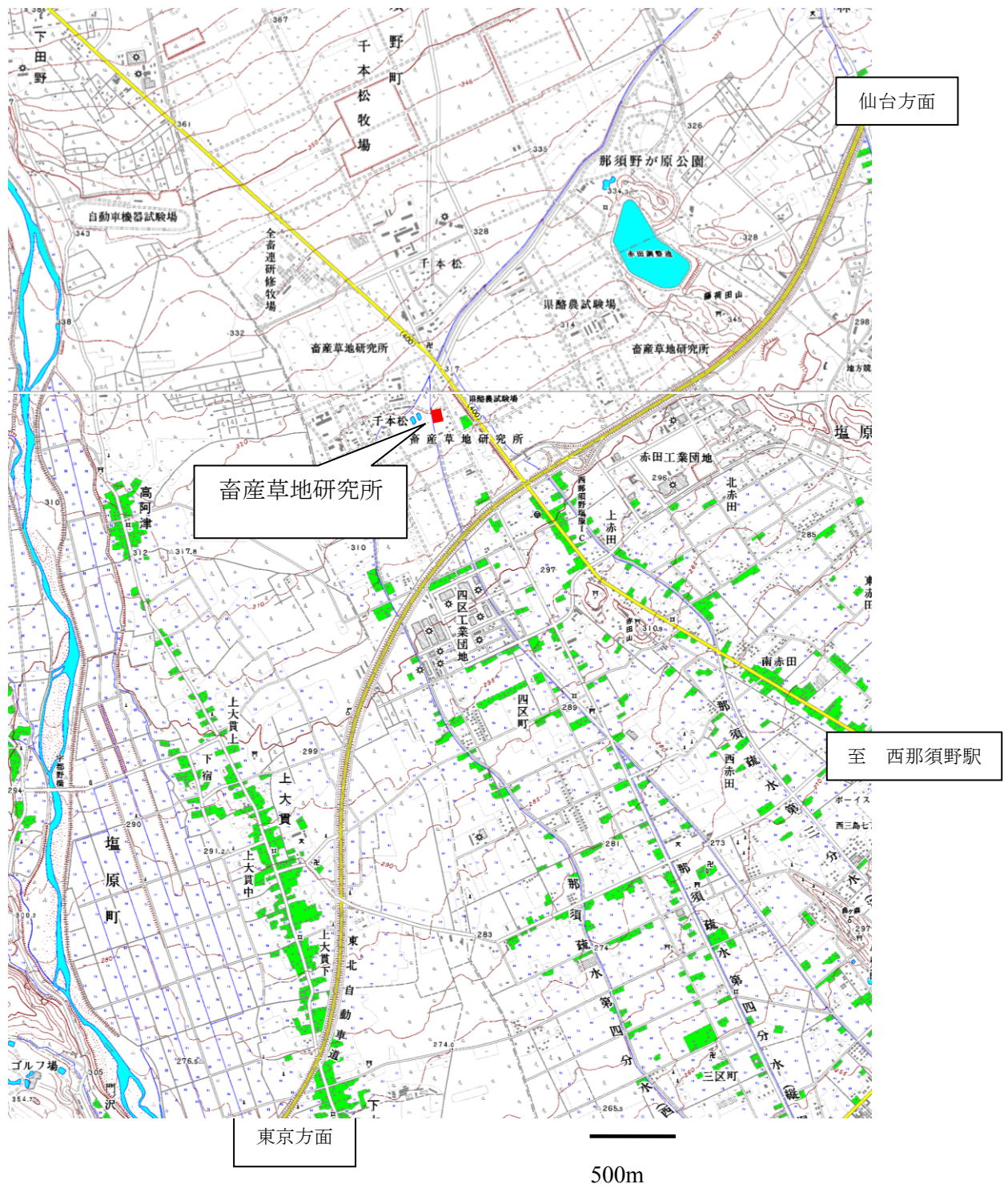


図1 隔離ほ場周辺図(畜産草地研究所)¹³

この地図は、国土地理院長の承認を得て、同院発行の2万5千分の1地形図を複製したものである

¹³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

5



10

15

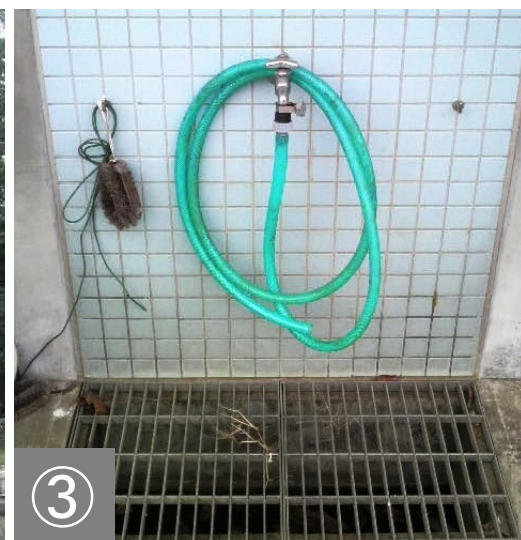


図2 隔離ほ場の設備 (畜産草地研究所)¹⁴

20

- ① 立ち入り禁止であること及び管理責任者を明示するための標識
- ② 組換え体隔離ほ場調査室 (収穫物の秤量や花粉の調査等を行う)
- ③ 洗い場

¹⁴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

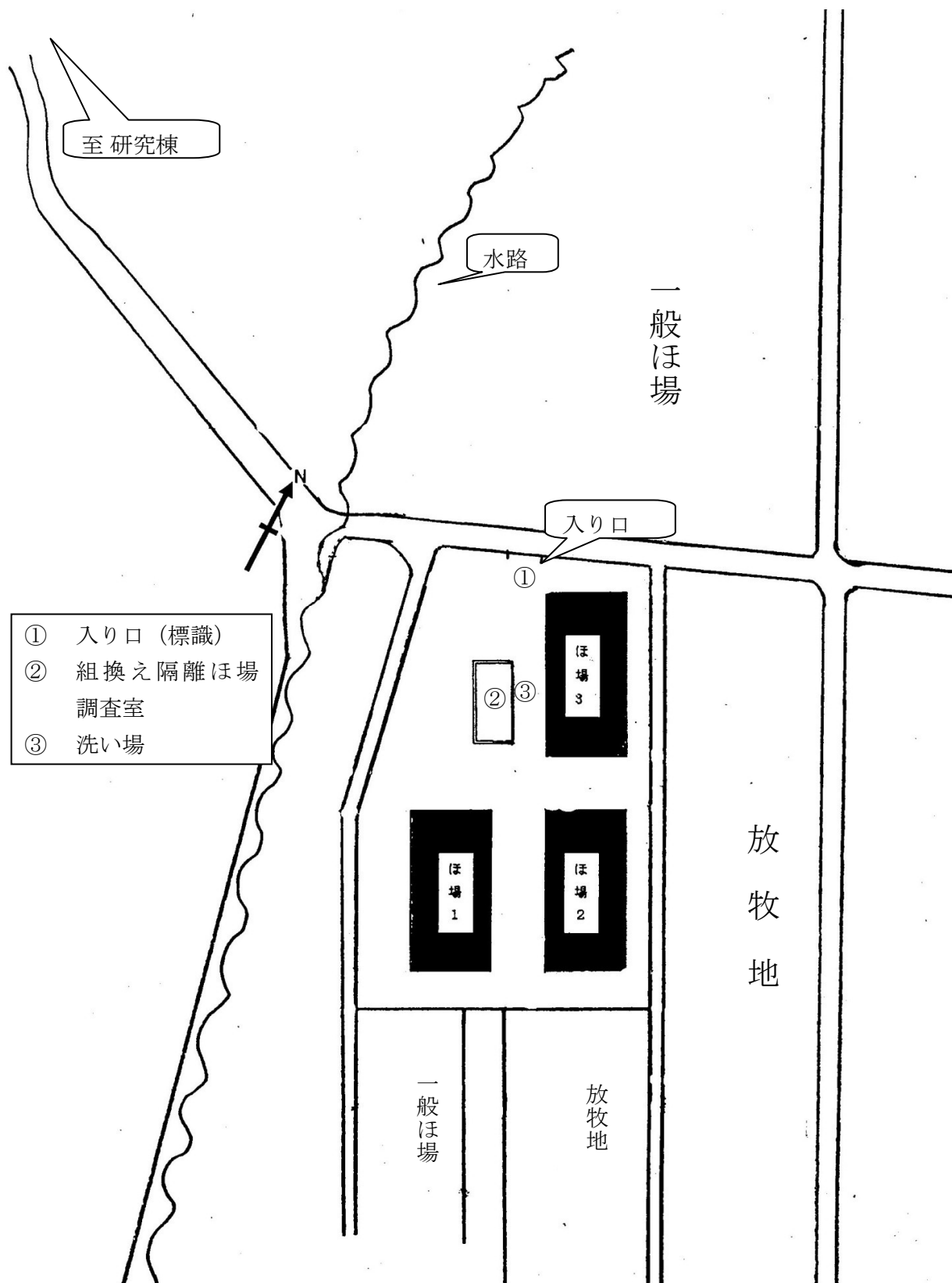


図3 隔離ほ場配置図(畜産草地研究所)¹⁵

今回の試験ではほ場2(4.5a)を使用

¹⁵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

ほ場No.	作物	栽培期間(2008年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								←
No.2	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								←
No.3	非遺伝子組換えトウモロコシ					←							
No.3	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								←

ほ場No.	作物	栽培期間(2009年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								
No.2	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								
No.3	非遺伝子組換えヘアリーベッチ				→								
No.3	遺伝子組換えトウモロコシ								←				→
No.3	非遺伝子組換えトウモロコシ								←				→

ほ場No.	作物	栽培期間(2010年)											
		1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
No.1	なし(休閑)												
No.2	遺伝子組換えトウモロコシ							←					→
No.2	非遺伝子組換えトウモロコシ							←					→
No.3	なし(休閑)												

図 4 隔離ほ場における栽培履歴 (畜産草地研究所)¹⁶

5

¹⁶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

第二部 隔離ほ場での試験計画

【社外非につき非開示】

別添資料リスト

- 別添資料 1 Lignin composition of forage from KK179 alfalfa (RAR-2011-0135)
(社外秘)
- 別添資料 2 Summary of PCR analysis to confirm the absence of Agrobacterium
used to produce KK179 (社外秘)
- 別添資料 3 Heritability of the KK179 insert in the MBC2, MBC3, and Syn1
Populations (RPN-2010-0705) (社外秘)
- 別添資料 4 Molecular Characterization of Reduced Lignin Alfalfa KK179
(MSL0023299) (社外秘)
- 別添資料 5 Stability of the DNA insert in KK179 across multiple generations for
Japan stage3 (REG-2011-0081) (社外秘)
- 別添資料 6 Lignin analysis of forage from multiple generations of KK179 alfalfa
(RAR-2011-0129) (社外秘)
- 別添資料 7 Alfalfa KK179-2 EndPoint TaqMan PCR with PUB Internal Control
(BQ-QC-10768-01) (社外秘)