

組換え DNA 技術応用飼料の安全性確認

低リグニンアルファルファ KK179 系統

**平成 26 年 8 月 27 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料の概要	3
III	審議内容	4
	1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項	4
5	(1) 遺伝的素材に関する事項	4
	(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項	4
	(3) 飼料の構成成分等に関する事項	4
	(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項	4
	2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	5
10	3 宿主に関する事項	5
	(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項	5
	(2) 遺伝的先祖に関する事項	5
	(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項	5
	(4) 寄生性及び定着性に関する事項	6
15	(5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項	6
	(6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項	6
	(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項	6
	(8) 飼料に利用された歴史に関する事項	7
	(9) 飼料の安全な利用に関する事項	7
20	(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項	7
	(11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項	7
	4 ベクターに関する事項	7
	(1) 名称及び由来に関する事項	7
	(2) 性質に関する事項	7
25	(3) 薬剤耐性に関する事項	8
	(4) 伝達性に関する事項	8
	(5) 宿主依存性に関する事項	8
	(6) 発現ベクターの作成方法に関する事項	8
	(7) 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項	8
30	5 挿入遺伝子に関する事項	8

	(1) 供与体に関する事項.....	8
	(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項.....	9
	(3) 構造に関する事項.....	9
	(4) 性質に関する事項.....	10
35	(5) 純度に関する事項.....	15
	(6) コピー数に関する事項.....	15
	(7) 安定性に関する事項.....	15
	(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項.....	16
	(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	16
40	(10) 外来のオープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項.....	16
	6 組換え体に関する事項.....	16
	(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項.....	16
	(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項.....	17
45	(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項.....	17
	(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項.....	17
	(5) 宿主との差異に関する事項.....	17
	(6) 外界における生存及び増殖能力に関する事項.....	18
	(7) 生存及び増殖能力の制限に関する事項.....	18
50	(8) 不活化法に関する事項.....	18
	(9) 外国における認可等に関する事項.....	18
	(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項.....	19
	(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項.....	19
55	7 2 から 6 までに掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項.....	19
	IV 審議結果.....	19
	V 参考文献及び参考資料.....	19

「低リグニンアルファルファ KK179 系統」に係る安全性確認

I はじめに

60 低リグニンアルファルファ KK179 系統（以下「KK179 アルファルファ」という。）について、平成 26 年 2 月 7 日付けで遺伝子組換え飼料としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

65 II 確認対象飼料の概要

飼料名 : 低リグニンアルファルファ KK179 系統
性 質 : 低リグニン
申請者 : 日本モンサント株式会社
開発者 : Monsanto Company

70 KK179 アルファルファは、飼料の消化性に対して負の影響を及ぼすリグニンの含量を減少させるため、アルファルファ由来のカフェオイル CoA-3-O-メチルトランスフェラーゼ遺伝子（以下「*CCOMT* 遺伝子」という。）の部分的な配列（以下「*CCOMT* 遺伝子断片」という。）が導入されたアルファルファである。

75 *CCOMT* 遺伝子から産生されるカフェオイル CoA-3-O-メチルトランスフェラーゼ（以下「*CCOMT* たん白質」という。）は、リグニンの主要なサブユニットであるグアヤシルリグニン（以下「G リグニン」という。）の生合成に関わるが、KK179 アルファルファでは、*CCOMT* 遺伝子断片によって生じる RNAi¹により、ジーンサイレンシング²が誘導され、アルファルファ内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されている。その結果、KK179 アルファルファでは、同じ生育期の非組換えアルファルファと比較し、G リグニンの含量が減少し、リグニンの含量が減少している。

80 また、KK179 アルファルファの作出過程において、抗生物質ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する *Escherichia coli* のトランスポゾン Tn5 由来の *nptII* 遺伝子が導入され、形質転換体の選抜マーカーとして利用されている。なお、形質転換体の選抜以降の育成過程において、*nptII* 遺伝子を持たない個体を選抜しているため、KK179 アルファルファに *nptII* 遺伝子は含まれていない。

85 KK179 アルファルファと非組換えアルファルファを比較したところ、遺伝子組換え操作により付与された上の性質を除き、差異は認められなかった。このため、KK179 アルファルファに付与された性質について安全性を評価し

¹ RNAi (RNA interference, RNA 干渉) は、真核生物における遺伝子発現調節機構の一つ。

概要：①二本鎖 RNA(dsRNA)が Dicer と呼ばれる酵素により切断され、21~26 塩基の siRNA (small interfering RNA)が形成される。②siRNA は RNAi-induced silencing complex (RISC)と結合した後、標的となる相補的な配列を持つ mRNA と結合する。③RISC により、siRNA と結合した mRNA は分解され、たん白質の産生が阻害される (Siomi and Siomi, 2009)。

RNAi は特異性が高く、遺伝子の発現抑制効果も高いことから、特定の形質の付与や遺伝子の機能の解析に利用されている (Kusaba, 2004)。

² ジーンサイレンシング：遺伝子からたん白質の発現が抑制されること。遺伝子抑制ともいう。

たところ、飼料として安全上問題となる点は認められなかった。したがって、飼料として摂取する家畜等の健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

なお、アルファルファは主にヘイバール及びペレットの形態で飼料として使用されている。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

(1) 遺伝的素材に関する事項

KK179 アルファルファの宿主は、マメ科 (*Fabaceae*) *Medicago* 属に属する *Medicago sativa* L. の非組換えアルファルファ R2336 系統である。

KK179 アルファルファには、アルファルファに由来する *CCOMT* 遺伝子断片が導入されている。また、KK179 アルファルファを作出する過程で選抜マーカーとして使用された NPTII たん白質をコードする *nptII* 遺伝子は、*E. coli* のトランスポゾン Tn5 由来である。ただし、形質転換体の選抜以降の育成過程において、遺伝的分離により *nptII* 遺伝子を持たない個体を選抜しているため、KK179 アルファルファは *nptII* 遺伝子を持たない。

KK179 アルファルファ中に導入された *CCOMT* 遺伝子断片の転写産物によって生じる RNAi により、ジーンサイレンシングが誘導され、アルファルファ内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されている。

(2) 家畜等の安全な飼養経験に関する事項

アルファルファは、家畜等の飼料として利用された長い歴史があり (Church, 1984、Van Keuren and Matches, 1988、Higginbotham *et al.*, 2008)、飼料設計において重要な役割を果たしている。

(3) 飼料の構成成分等に関する事項

KK179 アルファルファ及び非組換えアルファルファの構成成分等の分析値及び文献値は明らかとなっており、比較が可能である (Tava *et al.*, 1993、Rosenthal and Nkomo, 2000、OECD, 2005、参考資料 14,15)。

(4) 既存種と新品種との使用方法の相違に関する事項

KK179 アルファルファでは、*CCOMT* 遺伝子断片による RNAi により、ジーンサイレンシングが誘導され、アルファルファ内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されることにより地上部におけるリグニン含量が減少している。この点を除けば、KK179 アルファルファは非組換えアルファルファと差異はなく、①収穫時期 (成熟程度)、②家畜等の摂取 (可食) 部位、③家畜等の摂取量、④調製及び加工方法についても非組換えアルファルファとの相違はない。

(1) ~ (4) により、KK179 アルファルファの飼料としての安全性評価においては、非組換えアルファルファとの比較が可能であると判断された。

2 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

リグニンは反すう動物の飼料の消化性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、反すう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。KK179 アルファルファは、地上部に蓄積されるリグニン含量を同時期に収穫した非組換えアルファルファと比較して低減させることを目的に作出された。

一般にアルファルファは生育するに従い、リグニンの蓄積量が増加し、飼料としての品質が低下することが知られている (Reddy *et al.*, 2005、Burns, 2011)。

KK179 アルファルファの地上部におけるリグニン含量は、同様の生産条件下で数日早く収穫された非組換えアルファルファにおける含量と同等になると予想されることから、生産者は KK179 アルファルファを非組換えアルファルファと比較して数日遅らせて収穫することができると期待される。なお、KK179 アルファルファの飼料としての利用方法については、非組換えアルファルファと相違ない。

3 宿主に関する事項

(1) 学名、品種、系統名等の分類学上の位置付けに関する事項

宿主は、マメ科 (*Fabaceae*) *Medicago* 属に属する *M. sativa* L. の非組換えアルファルファ R2336 系統である。

(2) 遺伝的先祖に関する事項

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 (OECD, 2005)、農業の普及につれ、地中海地域、北アフリカ、中東、ヨーロッパのほぼ全域、シベリア、北インド及び中国で自生するようになった (Michaud *et al.*, 1988、Quiros and Bauchan, 1988)。

アルファルファは、マメ科 *Medicago* 属に属する亜種 *sativa* の野生種が栽培化されたものである。

(3) 有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファは、サポニン、縮合タンニン、フィトエストロゲン等の有害生理活性物質を含む (OECD, 2005)。

これらの化合物の中ではサポニンが主たるもので、ソヤサポゲノール類 (soyasapogenol)、ザンハ酸グリコシド (zanhic acid glycosides) 及びメジカゲン酸 (medicagenic acid) が量的に最も重要である (Massiot *et al.*, 1988、Massiot *et al.*, 1991、Oleszek *et al.*, 1992)。サポニンのうち、毒性を示す可能性があるのはザンハ酸グリコシド及びメジカゲン酸であると考えられており、症状としては口腔と消化管の炎症、膜透過性の上昇及び急性症例として溶血現象などが挙げられる (Oleszek, 1996)。またサポニンは独特の泡立ち特性により反芻胃の鼓脹の原因にも関与している (Marston *et al.*, 2000)。高濃度の易消化性のたん白質及び炭水化物とマメ科植物のサポニンが同時に反芻胃内に存在した場合、泡を形成し、発酵ガスを滞留させる原因となる (Tanner *et al.*, 1995)。胃の鼓脹のリスクを抑え

るため、別の飼料を給餌したうえで放牧に出すなど、多数の方策が採られている (Cangiano *et al.*, 2008)。

170 縮合タンニンとは、飼料に含まれるたん白質に結合能を持つことが知られているが、アルファルファでの含量は極めて少ないと考えられる (Barry and McNabb, 1999)。

175 フィトエストロゲンは、マメ科植物を給餌した家畜の生殖機能に悪影響を及ぼすことが知られている。主な症状は不妊であり、牛や羊などの反芻動物が最も影響を受けやすい (Stob, 1983、Howarth, 1988)。アルファルファ中の含量という点でこの種類の化合物で最も重要な物質はクメストロールである (OECD, 2005)。もう一つの主要な物質はイソフラボノイドで、アルファルファが生育中に病害ストレスを受けることにより誘導される (Latunde-Dada and Lucas, 1985)。

180 カナバニンは、アルファルファをはじめ、ほとんどのマメ科植物の種子及びスプラウトに貯蔵される二次代謝産物である。種子及びスプラウトに含まれるカナバニンは L-カナバニンの形態で存在し、ヒト及び動物で毒性を示す可能性のある異常型たん白質形成の原因となる L-アルギニンの構造類似体である (Rosenthal and Nkomo, 2000)。なお、ヒトにおいて、カナバニンは全身の紅斑性狼瘡を誘発する可能性があると考えられている (Malinow *et al.*, 1982、Akaogi *et al.*, 2006)。

185

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

アルファルファは種子植物であり、アルファルファが家畜等に寄生又は定着することはない。

190 (5) ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

アルファルファに感染する病原体は知られているが (Frate and Davis, 2008、Westerdahl and Frate, 2008、Undersander *et al.*, 2011)、これらが家畜等に対して病原性を示すことは知られていない。

195 (6) 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

200 アルファルファは、農業が普及するにつれ、地中海地域、北アフリカ、中東、ヨーロッパのほぼ全域、シベリア、北インド及び中国で自生するようになった (Michaud *et al.*, 1988、Quiros and Bauchan, 1988)。米国では全 50 州においてアルファルファの自生が確認されている (USDA-APHIS, 2010) が、米国においてアルファルファは雑草とみなされておらず、有害雑草リストにはアルファルファの記載はない (USDA-AMS, 2011)。

205 我が国では、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)。しかし、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 (浅沼ら, 1987、大分県植物誌刊行会, 1989、杉野, 2008、太田, 2010)。

(7) 有性生殖周期及び交雑性に関する事項

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るが、自家不和合性で

210 あり、受精及び結実には他殖による交配が必要である。自家受粉では、花粉の発
芽率が低下し、正常な花粉管伸長が起こらず、胚の生育停止により他家受粉と比
較して種子数が減少する (Cooper and Brink, 1940、Campbell and He, 1997)。

なお、わが国においてアルファルファと交雑可能な近縁野生種は知られていな
い。

215 (8) 飼料に利用された歴史に関する事項

アルファルファは、乳牛、肉牛、羊及び山羊といった反すう動物に加え、馬、
豚、鶏及びウサギといった非反すう動物のすぐれた飼料として利用された長い歴
史があり (Church, 1984、Van Keuren and Matches, 1988、Higginbotham *et al.*,
2008)、飼料設計において重要な役割を果たしている。

220 我が国では、2011 年度に、約 14.3 万トンのアルファルファ (ミール、ペレット
及びヘイキューブの全てを含む) が配合飼料の原料として用いられており、肉牛用、
乳牛用等の飼料の原料として利用されている (農林水産省生産局畜産部畜産振興課、
2012)。

225 (9) 飼料の安全な利用に関する事項

アルファルファには、サポニン等の有害生理活性物質が含まれているが、給餌
において適切に管理され、安全に利用されている。

(10) 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

230 アルファルファは種子繁殖する植物であり、その生育には排水が良く、肥沃な
耕地を好む (鈴木, 1992)。また、雑草との競合に弱いことから、生育初期には雑草
管理の行き届いた清潔な耕地を必要とする (鈴木, 1992)。アルファルファは、除草
剤や耕起等の物理的方法により容易に防除される。

235 (11) 近縁種の有害生理活性物質の生産に関する事項

アルファルファと交雑可能であると考えられる近縁種は、多年生の *Medicago* 属
の *M. prostrata*、*M. cancellata* 及び *M. saxatilis* の 3 種である (Lesins, 1961、
Lesins, 1962、Lesins, 1970、Quiros and Bauchan, 1988)。これら 3 種の有害生
理活性物質の産生性に関する報告はない。なお、これら 3 種のいずれもわが国に
240 は自生していない (大橋, 1999)。

4 ベクターに関する事項

(1) 名称及び由来に関する事項

245 ベクター F は KK179 アルファルファの作出に用いられた導入用プラスミド PV-
MSPQ12633 の中間プラスミドである。なお、ベクター F の構成要素とその由来及
び機能は明らかとなっている。

(2) 性質に関する事項

ベクター F の塩基数は 8,412 bp である。また、ベクター F の全塩基配列、制限

250 酵素切断部位、構成要素、その由来及び機能は明らかになっており（参考資料 1）、
既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

（3）薬剤耐性に関する事項

255 ベクターF には、抗生物質スペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付
与するトランスポゾン Tn7 由来のアミノグリコシド改変酵素 3''(9)-O-ヌクレオチ
ジルトランスフェラーゼ (AAD) の細菌プロモーター及びコード配列である *aadA*
遺伝子とネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II をコードし、ネオマイシ
ン及びカナマイシンに対する耐性を付与する *nptII* 遺伝子が含まれている。両遺伝
260 子は、*E. coli* 及び *Rhizobium radiobacter* (*Agrobacterium tumefaciens*) 中での
選択マーカーとして利用された。

（4）伝達性に関する事項

ベクターF 及びその構築に用いられた中間プラスミドには、プラスミドの伝達を
可能とする配列は含まれていない。

265

（5）宿主依存性に関する事項

ベクターF には、広宿主域プラスミド RK2 に由来する複製開始領域 *oriV* と、
pUC プラスミドに由来する複製開始領域 *ori-pUC* が組み込まれているが、植物や
家畜等で増殖することは出来ない。なお、導入遺伝子の解析の結果、KK179 アル
270 ファルファには、これらの領域を含む導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の外側
骨格領域は導入されていないことが確認されている。

（6）発現ベクターの作成方法に関する事項

KK179アルファルファの作出には、導入用プラスミドPV-MSPQ12633を用いて
275 いる(参考資料2)。導入用プラスミドは、中間プラスミドB~F及び遺伝子断片A1を
用いて作出されており（参考資料3）、*CCOMT*遺伝子発現抑制カセットを含むT-
DNAI領域及び*nptII*遺伝子発現カセットを含むT-DNAII領域を有している。

（7）発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

280 T-DNAI 及び T-DNAII 領域を含む導入用プラスミド PV-MSPQ12633 が、ア
グロバクテリウム法によりアルファルファに導入されている。

5 挿入遺伝子に関する事項

（1）供与体に関する事項

285 ① 名称、由来及び分類に関する事項

KK179 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
(*M. sativa* L.) に由来する。また、KK179 アルファルファを作出する過程で選
抜マーカーとして使用された *nptII* 遺伝子は、*E. coli* のトランスポゾン Tn5 に
由来する。

290

② 安全性に関する事項

CCOMT 遺伝子断片の供与体であるアルファルファ (*M. sativa* L.) は長く飼料として利用された歴史がある。

nptII 遺伝子の供与体である *E. coli* は実験用生物として長年にわたり安全に使用されているとともに、最も生態が解明されている生物の 1 つであり、その全塩基配列は明らかとなっている (Blattner *et al.*, 1997)。 *E. coli* は、国内外の安全性ガイドラインにおいて、広範囲の遺伝子クローニングや発現ベクターを普及する上で安全な生物として分類されており、たん白質生産など多数の商業用途にも使用されている (Bogosian and Kane, 1991)。

(2) 遺伝子の挿入方法に関する事項

非組換えアルファルファ R2336 系統の葉組織と導入用プラスミド PV-MSPQ12633 を含むアグロバクテリウムを共置培養することにより形質転換を行った。3 日間の培養後、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移し葉組織をカルス育成することにより、形質転換されていない植物細胞及びアグロバクテリウム菌体を除去した。

その後、カルスから細分化させ、得られた再分化個体 (T0) を雄性不稔の非組換えアルファルファ Ms208 系統と掛け合わせるにより F1 世代を作出した。F1 世代の個体において、T-DNAI 領域を持ち、T-DNAII 領域を持たない個体をサザンブロット分析及び PCR 分析により選抜した。その中から、形態特性及び導入遺伝子解析の結果に基づき、低リグニンの形質を持つ KK179 アルファルファを最終的な商品化系統として選抜した。

(3) 構造に関する事項

① プロモーターに関する事項

CCOMT 遺伝子発現抑制カセットは、*Pal2* プロモーターによりその発現が制御されている。*Pal2* プロモーターはインゲンマメ (*Phaseolus vulgaris*) 由来のフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) をコードする *Pal2* 遺伝子のプロモーターで、植物細胞内で転写を誘導する (Cramer *et al.*, 1989)。導管化を促す内在性の信号に呼応し、成熟植物内のリグニン沈積部位において特異的に発現する (Leyva *et al.*, 1992、Guo *et al.*, 2001)。

nptII 遺伝子発現カセットは、*35S* プロモーターによりその発現が制御されている。*35S* プロモーターはカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の *35S* RNA 由来のプロモーター及びリーダー配列で (Odell *et al.*, 1985)、植物細胞内で転写を誘導する。

② ターミネーターに関する事項

CCOMT 遺伝子発現抑制カセット及び *nptII* 遺伝子発現カセットのターミネーターは、ノパリン合成酵素 (NOS) をコードしている *R. radiobacter* (*A. tumefaciens*) pTi 由来の *nos* 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり (Fraley *et al.*, 1983、Bevan, 1984)、*CCOMT* 遺伝子発現抑制カセット及び *nptII* 遺伝子発現

カセットからの mRNA の転写を終結させ、ポリアデニル化を誘導する。

③ 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の各構成要素の機能は既に明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まない。

(4) 性質に関する事項

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 の挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能について表 1 に示した。*CCOMT* 遺伝子及び *nptII* 遺伝子の機能については詳細を表外に記載した。

表 1 挿入 DNA の各構成要素、由来及び機能

構成要素	由来及び機能
<i>CCOMT</i> 遺伝子発現抑制カセット (T-DNA I)	
<i>Pal2</i> プロモーター	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 (PAL) をコードする <i>Pal2</i> 遺伝子のプロモーターで、植物細胞内で転写を誘導する (Cramer <i>et al.</i> , 1989)。
<i>CCOMT</i> 遺伝子断片 ³	アルファルファ (<i>Medicago sativa</i> L.) 由来のカフェオイル CoA 3- <i>O</i> -メチルトランスフェラーゼをコードする <i>CCOMT</i> 遺伝子のコード配列の断片であり (Inoue <i>et al.</i> , 1998)、発現抑制カセットの一部を担う。
<i>CCOMT</i> 遺伝子断片 ³	アルファルファ (<i>Medicago sativa</i> L.) 由来のカフェオイル CoA 3- <i>O</i> -メチルトランスフェラーゼをコードする <i>CCOMT</i> 遺伝子のコード配列の断片であり (Inoue <i>et al.</i> , 1998)、発現抑制カセットの一部を担う。
<i>nos</i> ターミネーター	NOS をコードしている <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来の <i>nos</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり、ポリアデニル化を誘導する (Fraley <i>et al.</i> , 1983、Bevan, 1984)。
<i>nptII</i> 遺伝子発現カセット (T-DNA II、KK179 アルファルファには存在しない)	
<i>35S</i> プロモーター	カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の <i>35S</i> RNA 由来のプロモーター及びリーダー配列 (Odell <i>et al.</i> , 1985) で、植物細胞内で転写を誘導する。
<i>nptII</i> 遺伝子	<i>E. coli</i> のトランスポゾン Tn5 由来のネオマイシンフォスフトランスフェラーゼ II (NPT II) をコードする <i>neo</i> 遺伝子のコード

³ T-DNAI 領域は 2 つの *CCOMT* 逆方向反復配列が存在し、1 つめの *CCOMT* 逆方向反復配列における 1,654 から 1,953 番目の配列 (センス鎖) は、2 つ目の *CCOMT* 逆方向反復配列における 2,111 から 2,410 番目の配列 (アンチセンス鎖) の逆相補的配列である。センス鎖とアンチセンス鎖の間の配列は dsRNA 形成時にループ構造をとる。

	配列 (Beck <i>et al.</i> , 1982b) で、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する (Fraley <i>et al.</i> , 1983)。
<i>nos</i> ターミネーター	NOS をコードしている <i>R. radiobacter</i> (<i>A. tumefaciens</i>) pTi 由来の <i>nos</i> 遺伝子の 3' 末端非翻訳領域であり、ポリアデニル化を誘導する (Fraley <i>et al.</i> , 1983、Bevan, 1984)。

345 ① *CCOMT* 遺伝子の機能

非組換えアルファルファ及び KK179 アルファルファにおけるリグニンの生合成経路を図 1 及び図 2 に記載した。

350 リグニンは、分子量の大きい重合性分子で、主に 3 種のリグニンサブユニット (*p*-ヒドロキシフェニルリグニン (H リグニン)、G リグニン及びシリングルリグニン (S リグニン)) からなる(Boerjan *et al.*, 2003、Vanholme *et al.*, 2010)。各リグニンの相対比率は、植物の種類や組織により異なるが、非組換えアルファルファでは、G リグニン及び S リグニンが最大で 95%となる。

355 *CCOMT* 遺伝子がコードする CoA-3-*O*-メチルトランスフェラーゼ (*CCOMT* たん白質) は、G リグニンの生合成において、カフェオイル CoA をメチル化してフェルロイル CoA を産生する。また、フェルロイル CoA の代謝産物である 5-ヒドロキシコニフェリルアルデヒドは S リグニンの生合成においても前駆物質となるが、*CCOMT* たん白質の関わる反応経路以外からも供給されるため、*CCOMT* たん白質の酵素活性が低下しても S リグニン生合成は継続される。この生合成は、CCR2 たん白質により、カフェオイル CoA からカフェオイルアルデヒドへの変換を経て行われる(Zhou *et al.*, 2010)。

360 KK179 アルファルファでは、*CCOMT* 遺伝子断片の転写産物によって起こる RNAi により、ジーンサイレンシングが誘導され、内在性 *CCOMT* 遺伝子の発現を抑制することで、G リグニン含量が減少する(Boerjan *et al.*, 2003)。この *CCOMT* 遺伝子発現の抑制による影響は、G リグニンの含量の低下に限定されることが報告されている(Chen *et al.*, 2006)。

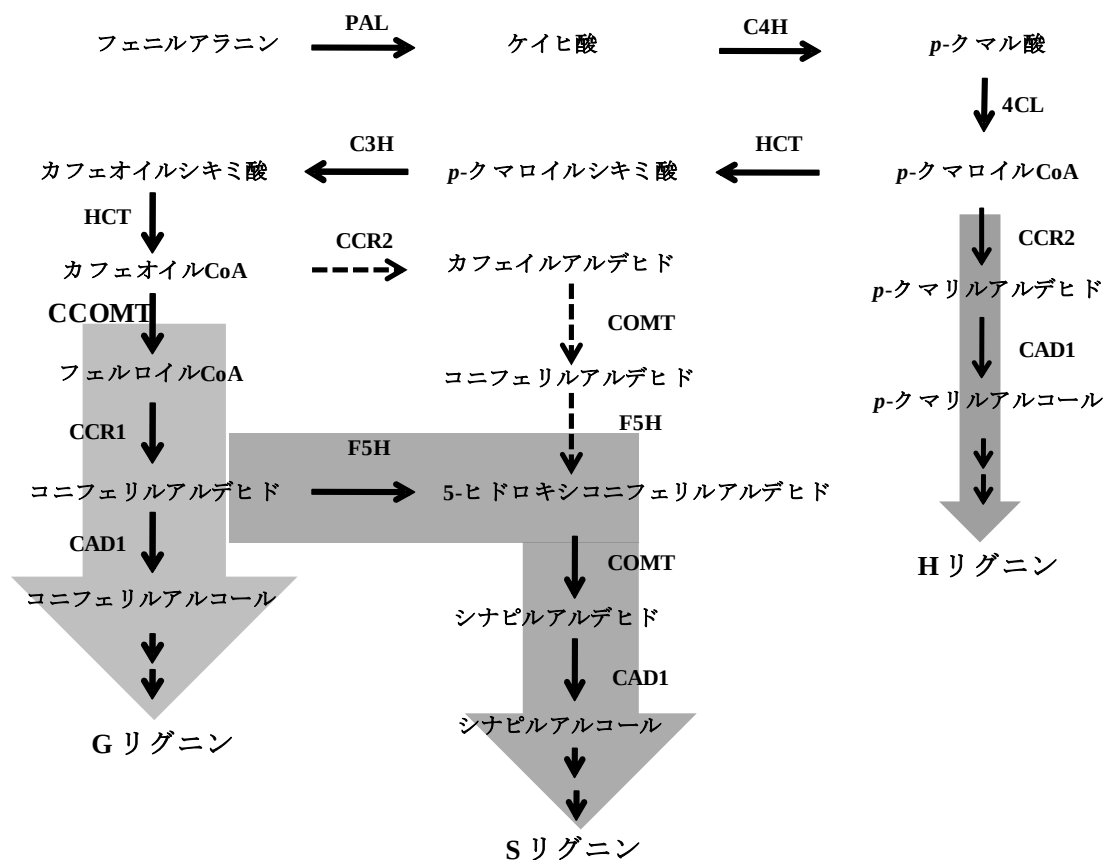
365 KK179 アルファルファの地上部において、リグニンサブユニット (H リグニン、G リグニン、S リグニン) の組成分析を行った結果、対照の非組換えアルファルファと比較して KK179 アルファルファの G リグニン含量及び HGS リグニン⁴に占める G リグニン含量の統計学的に有意な減少が確認された(表 1、表 2、参考資料 4)。

370 さらに、KK179 アルファルファの地上部における G リグニンが減少したことによるリグニンの減少を確認するため、リグニン含量として酸性デタージェントリグニンを測定した結果、対照の非組換えアルファルファと比較してリグニン含量の統計学的に有意な減少が確認された(表 3、参考資料 5)。

375 なお、KK179 アルファルファの地上部のリグニン含量が、同時に栽培された非組換え商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であったことについては、アルファルファは一般的に自家不和合性であり(Cooper *et al.*,

⁴ HGS リグニンは、H リグニン、G リグニン及び S リグニンを個別に測定し、合計したもの。

1940)、複数の系統の多交雑により作出されているため、各個体は多様な表現形質を示す(Rumbaugh *et al.*, 1988)ことによると考えられた。



PAL: フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

C4H: ケイヒ酸 4-ヒドロキシラーゼ

4CL: 4-ヒドロキシケイヒ酸 CoA リガーゼ

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

C3H: p-クマル酸 3-ヒドロキシラーゼ

CCOMT: カフェオイル CoA-3-O-メチルトランスフェラーゼ

COMT: カフェイン酸-O-メチルトランスフェラーゼ

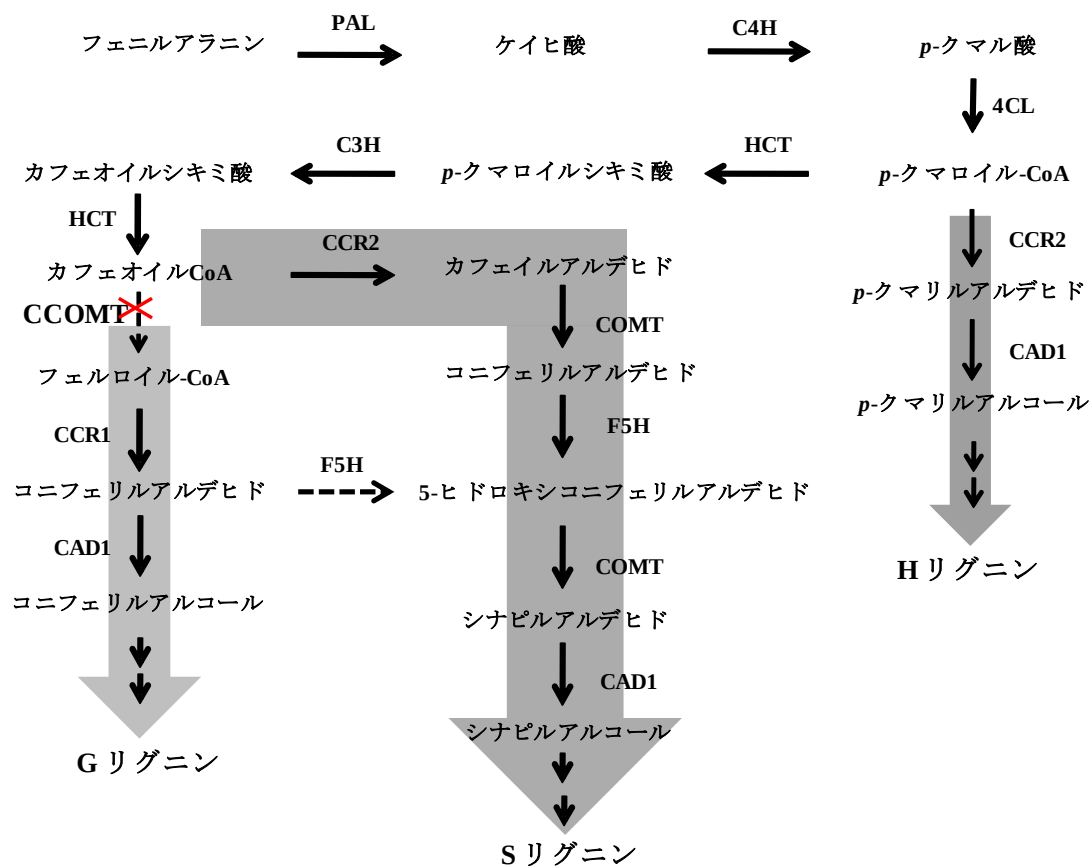
CCR1, CCR2: シンナモイル CoA レダクターゼ

F5H: フェルラ酸 5-ヒドロキシラーゼ

CAD1: シンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ

CCR2 はフェルロイル CoA により阻害を受けるため (Zhou *et al.*, 2010)、CCOMT たん白質によりフェルロイル CoA が生成される非組換えアルファルファでは CCR2 の酵素活性は抑制される。灰色の網掛けは各リグニン・サブユニットの生合成段階を示す。

図 1 非組換えアルファルファにおけるリグニンの生合成経路



✕ は、本組換えアルファルファにおいて内在性酵素（CCOMT たん白質）の産生が抑制されることを示す。

KK179 アルファルファでは、*CCOMT* 遺伝子断片の転写産物によって生じる RNAi により CCOMT たん白質の産生が抑制されることから、フェルロイル CoA が減少すると考えられる。それによりフェルロイル CoA による障害が軽減することで CCR2 の酵素活性が上昇し、カフェオイル CoA を基質としてカフェイルアルデヒドが産生されると予想される (Zhou *et al.*, 2010)。この経路により、最終産物として S リグニンが産生される。

図 2 KK179 アルファルファにおけるリグニンの生合成経路

表 1 KK179 及び対照の非組換えアルファルファのリグニン含量

分析成分 (単位) ¹	KK179 アルファルファ	対照品種	有意差 (p-値) ³	商業品種
	平均値 (S.E.) ² (範囲)	平均値 (S.E.) (範囲)		(範囲) [99%T.I.] ⁴
G リグニン	68.10 (9.48) (21.17~134.96)	83.72 (9.40) (33.11~131.40)	0.027*	8.83, 176.39 (25.34~153.11)
S リグニン	55.96 (8.83) (9.82~87.67)	50.41 (8.78) (12.20~91.89)	0.302	0, 120.96 (5.64~110.93)
H リグニン	5.05 (0.45) (2.20~10.84)	3.88 (0.43) (0.58~5.49)	0.077	1.59, 6.91 (0.29~8.26)

¹単位: リグニン (μmol/g 細胞壁残渣) ²S.E.: 標準誤差 ³p 値: p<0.05 のとき有意差あり(*)⁴99%T.I.: 95%の信頼度で商業品種集団の 99%が含まれるように定めた範囲

400

表 2 KK179 及び対照の非組換えアルファルファのリグニン含量 (HGS リグニンに占める割合)

分析成分 (単位) ¹	KK179 アルファルファ	対照品種	有意差 (p-値) ³	商業品種
	平均値 (S.E.) ² (範囲)	平均値 (S.E.) (範囲)		99%T.I. ⁴ (範囲)
G リグニン	53.69 (1.87) (44.92~63.78)	61.69 (1.87) (56.88~70.56)	<0.001*	46.69, 76.44 (50.02~76.69)
S リグニン	42.09 (2.35) (26.98~52.01)	35.24 (2.35) (24.60~40.26)	<0.001*	17.39, 53.32 (17.07~46.14)
H リグニン	4.22 (0.54) (2.04~9.78)	3.07 (0.54) (0.34~5.18)	0.001*	0, 6.74 (0.18~6.23)

¹単位: リグニン(%HGS リグニン) ²S.E.: 標準誤差 ³p 値: p<0.05 のとき有意差あり(*)⁴99%T.I.: 95%の信頼度で商業品種集団の 99%が含まれるように定めた範囲

405

表 3 KK179 及び対照の非組換えアルファルファのリグニン含量

分析成分 (単位) ¹	KK179 アルファルファ	対照品種	有意差 (p-値) ³	商業品種
	平均値 (S.E.) ² (範囲)	平均値 (S.E.) (範囲)		99%T.I. ⁴ (範囲)
リグニン	5.39 (0.64) (2.73~7.60)	6.93 (0.64) (2.23~10.10)	0.004*	1.39, 12.54 (1.70~10.03)

¹単位: リグニン(%総乾燥重) ²S.E.: 標準誤差 ³p 値: p<0.05 のとき有意差あり(*)⁴99%T.I.: 95%の信頼度で商業品種集団の 99%が含まれるように定めた範囲

410

② *nptII* 遺伝子の機能

415 ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II (NPTII たん白質) は形質転換体の
の選抜マーカーとしての機能を有する (De Block *et al.*, 1984、Horsch *et al.*,
1984)。NPTII たん白質はアミノグリコシド系抗生物質であるネオマイシン及
びカナマイシンなどを ATP によりリン酸化して不活化する。そのため、
NPTII たん白質を発現する細胞はアミノグリコシドに暴露されても、生存す
420 ることができる。一般に植物細胞の形質転換効率は低く、成功率は 1 万~10
万分の 1 程度であるが (Fraley *et al.*, 1983、Horsch *et al.*, 1984)、NPTII た
ん白質をコードする *nptII* 遺伝子を *CCOMT* 遺伝子発現抑制カセットと共に
挿入することにより、形質転換後の選抜を容易にすることができる。

(5) 純度に関する事項

425 T-DNAI 及び T-DNAII 領域内に目的外の遺伝子の混入ないことは、塩基配列解
析により確認されている。

(6) コピー数に関する事項

430 KK179 アルファルファに導入された遺伝子のコピー数を決定し、T-DNAI 領域、
T-DNAII 領域及び導入用プラスミド由来の外側骨格配列の有無を確認するため、
サザンブロット分析を行った。その結果、KK179 アルファルファはゲノム中の 1
か所に 1 コピーの T-DNAI 領域を持ち、導入用プラスミドの T-DNAII 領域及び外
側骨格配列が存在しないことが確認された (参考資料 6)。

435 また、挿入 DNA の構成を確認し、挿入 DNA とその近傍配列の塩基配列を決定
するため、塩基配列解析を行った。その結果、挿入 DNA と導入用プラスミド PV-
MSPQ12633 の T-DNAI の各構成要素の塩基配列が同一であることが確認された
(参考資料 6)。

440 さらに、KK179 アルファルファの挿入 DNA の挿入部位の近傍配列を非組換え
アルファルファ中の塩基配列と比較した結果、KK179 アルファルファの挿入
DNA の挿入部位において、アルファルファ内在性配列に 102 bp の欠損が認めら
れた。しかし、近傍及び欠損配列の BLASTn 及び BLASTx 解析の結果、挿入
DNA の導入による既知の内在性遺伝子の破壊はないと考えられた (参考資料 7)。

(7) 安定性に関する事項

445 KK179 アルファルファにおける挿入遺伝子の複数世代にわたる安定性を確認す
るため、4 世代の KK179 アルファルファから得られた DNA を用いて、サザンブ
ロット分析を行った。その結果、挿入遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝し
ていることが確認された (参考資料 8)。

450 また、KK179 アルファルファにおいて、導入された *CCOMT* 遺伝子断片の転写
産物によって生じる RNAi により、複数世代にわたり、安定的にリグニン含量が
低下していること確認するため、3 世代の KK179 アルファルファの地上部を用い
て、リグニン含量として酸性デタージェントリグニンの測定を行った。その結果、
複数世代にわたり安定してリグニン含量が低下していることが確認された (参考資

料 9)。

455 さらに、挿入遺伝子の分離様式を確認するために、複数世代にわたる分離比の
カイ二乗検定による期待値との比較を実施したところ、挿入遺伝子が、メンデル
の法則に従って後代に遺伝していることが確認された(参考資料 10)。

(8) 発現部位、発現時期及び発現量に関する事項

460 KK179 アルファルファにおいて、内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されて
いることを確認するため、KK179 アルファルファ及び非組換えアルファルファの
地上部及び根を用いてノーザンブロット分析により測定した。その結果、KK179
アルファルファにおける *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制されていることが確認され
た(参考資料 11)。

465

(9) 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

導入用プラスミド PV-MSPQ12633 には、ネオマイシン及びカナマイシンに対
する耐性を付与する *nptII* 遺伝子 (Fraley *et al.*, 1983) が T-DNAII 領域に存在し
ているが、この T-DNAII 領域は KK179 アルファルファの育種過程において分離
470 されているため KK179 アルファルファ中に *nptII* 遺伝子は含まれていない。なお、
KK179 アルファルファ中に *nptII* 遺伝子が導入されていないことは、サザンブ
ロット分析によって確認された(参考資料 6)。

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

475

KK179 アルファルファの挿入 DNA とその両近傍配列の境界領域におけるオー
プンリーディングフレーム (ORF) の形成の有無を確認するため、6 つの読み枠
でストップコドン (TGA、TAG、TAA) からストップコドンまでの連続する 8 ア
ミノ酸以上の ORF 検索を行った結果、10 個の ORF が検出された (参考資料 12)。
480 これら 10 個の ORF について、既知の毒性たん白質等との相同性検索を行った結
果、相同性は認められなかった。

また、KK179 アルファルファ中の挿入 DNA について、既知の毒性たん白質等
との相同性検索を行った結果、相同性は認められなかった (参考資料 13)。

485 6 組換え体に関する事項

(1) 組換え DNA 操作により新たに獲得された性質に関する事項

KK179 アルファルファでは、導入された *CCOMT* 遺伝子断片によって生じる
RNAi により、ジーンサイレンシング が誘導される。その結果、内在性の
CCOMT 遺伝子の発現が抑制され、地上部におけるリグニン含量が減少する。こ
490 の点を除けば、KK179 アルファルファは非組換えアルファルファとその形態及び
生育特性において相違は認められず、飼料としての利用方法も変わらない。

(2) 遺伝子産物の毒性に関する事項

495 KK179 アルファルファには、*CCOMT* 遺伝子断片が導入されており、RNAi が
起こる際には dsRNA が形成されるが、dsRNA は構造的にリボソームでの翻訳が
阻害されるため、新たなたん白質が産生されることは考えにくく(Kozak, 1989)、
本項に関する検討は必要ないと判断された。なお、ジーンサイレンシングを誘導
500 させるために転写された RNA は内在性の RNase により分解されることが知られ
ている(Waterhouse *et al.*, 2003, Baulcombe, 2004)。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

505 *CCOMT* 遺伝子断片については、たん白質に翻訳されているとは考えにくいた
め、本項に関する検討は必要ないと判断された。

(4) 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項

510 KK179 アルファルファでは、*CCOMT* 遺伝子断片によって生じる RNAi により
内在性の *CCOMT* 遺伝子の発現が抑制される。*CCOMT* 遺伝子の発現が抑制され
ることにより、*CCOMT* たん白質の酵素活性が低下し、G リグニン含量が減少す
る。KK179 アルファルファでは、非組換えアルファルファと比較し、G リグニン
515 含量のみが低下し、その他の構成成分の差異は生じていないこと、また、*CCOMT*
遺伝子はアルファルファに存在する他のメチルトランスフェラーゼの塩基配列との
相同性が低いことから、KK179 アルファルファにおける *CCOMT* 遺伝子断片の転
写産物によって生じる RNAi は、*CCOMT* 遺伝子の発現を特異的に抑制している
と考えられ、目的外の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

(5) 宿主との差異に関する事項

520 KK179 アルファルファ及び非組換えアルファルファとの構成成分の差異を評価
するため、米国の 6 か所のほ場において栽培された KK179 アルファルファ及び対
照の非組換えアルファルファの地上部を用いて、①主要構成成分、②アミノ酸、
③ミネラル類、④有害生理活性物質の分析を行った(参考資料 14,15)。また、各ほ
場で 4 品種ずつ合計 14 品種の非組換え商業品種を同時に栽培し、同様に分析を行
った(参考資料 14,15)。

525 ① 主要構成成分

地上部の水分、炭水化物、粗たん白質、灰分、粗脂肪、酸性デタージェント
繊維、酸性デタージェントリグニン及び中性デタージェント繊維について分析
した結果、いずれの成分も対照の非組換えアルファルファと同等又は自社商業
品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

530

② アミノ酸

地上部の各アミノ酸について分析した結果、いずれのアミノ酸も対照の非組
換えアルファルファと同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間
の範囲内であった。

535

③ ミネラル

地上部の各ミネラルについて分析した結果、いずれのミネラルも対照の非組換えアルファルファと同等又は自社商業品種の分析値から計算された許容区間の範囲内であった。

540

④ 有害生理活性物質

地上部の有害生理活性物質として、カナバニン及びサポニン（総バヨゲニン、総ヘデラゲニン、総メジカゲニク酸、総ソヤサポゲノール B、総ソヤサポゲノール E、総ザンハ酸及び総サポニン）並びにその他の成分として、フェルラ酸、遊離フェニルアラニン、総ポリフェノール及び *p*-クマル酸について分析した結果、いずれの有害生理活性物質及びその他の成分も対照の非組換えアルファルファと同等又は自社商業品種から得られた分析値の範囲内であった。

545

550

以上の結果から、KK179 アルファルファには、非組換えアルファルファと比較し、意図したリグニン含量の減少を除き、構成成分の差異は生じていないことが確認された。

（6）外界における生存及び増殖能力に関する事項

555

2007 年～2012 年の間に、米国の延べ 136 か所で行われたほ場試験において、KK179 アルファルファの生存及び増殖能力は非組換えアルファルファとの間に相違は認められなかった。

（7）生存及び増殖能力の制限に関する事項

560

KK179 アルファルファの生存・増殖能力は非組換えアルファルファとの間に相違は認められなかった。

（8）不活化法に関する事項

565

KK179 アルファルファは、物理的防除（耕耘）や化学的防除（感受性を示す除草剤の使用）など、アルファルファを枯死させる従来の方法で不活化される。

（9）外国における認可等に関する事項

570

2011 年 11 月、カナダ保健省（Health Canada）に食品としての、また、カナダ食品検査庁（CFIA）に環境・飼料としての安全性審査の申請が行われた。

2012 年 11 月、米国農務省（USDA）に環境としての安全性審査の申請が行われた。

2013 年 4 月、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関（FSANZ）において食品の輸入のための安全性審査の申請が行われた。

2013 年 12 月、米国食品医薬局（FDA）において食品・飼料としての安全性審査が終了した。

575

(10) 作出、育種及び栽培方法に関する事項

KK179 アルファルファの栽培方法は非組換えアルファルファとの相違はない。

(11) 種子の製法及び管理方法に関する事項

580 KK179 アルファルファの種子の製法及び管理方法は非組換えアルファルファとの相違はない。また、KK179 アルファルファの各世代の種子は保管されている。

7 2 から 6 までは掲げる資料により飼料の安全性に関する知見が得られていない場合は、次に掲げる試験のうち必要な試験の成績に関する事項

585 該当しない。

IV 審議結果

590 低リグニンアルファルファ KK179 系統について、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、飼料として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断した。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Akaogi, J., T. Barker, Y. Kuroda, D.C. Nacionales, Y. Yamasaki, B.R. Stevens, W.H. Reeves and M. Satoh. 2006. Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 5: 429-435.
2. Barry, T.N. and W.C. McNabb. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition* 81: 263-272.
3. Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
4. Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss and H. Schaller. 1982b. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-336.
5. Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.
6. Blattner, F.R., G. Plunkett, C.A. Bloch, N.T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J.D. Glasner, C.K. Rode, G.F. Mayhew, J. Gregor, N.W. Davis, H.A. Kirkpatrick, M.A. Goeden, D.J. Rose, B. Mau and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462.
7. Boerjan, W., J. Ralph and M. Baucher. 2003. Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* 54: 519-546.
8. Bogosian, G. and J.F. Kane. 1991. Fate of recombinant *Escherichia coli* K-12 strains in the environment. *Advances in Applied Microbiology* 36: 87-131.
9. Burns, J.C. 2011. Advancement in Assessment and the Reassessment of the Nutritive Value of Forages. *Crop Science* 51: 390-402.
10. Campbell, T.A. and Y. He. 1997. Factorial analysis of self-incompatibility in alfalfa.

Canadian Journal of Plant Science 77: 69-73.

11. Cangiano, C.A., A.R. Castillo, J.N. Guerrero and D.H. Putnam. 2008. Alfalfa grazing management. Pages 281-297 in *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. C.G. Summers and D.H. Putnam (eds.). University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, California.
12. 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.
13. Church, D.C. 1984. Table of contents. Pages iii-iv in *Livestock Feeds and Feeding*. Second Edition. O & B Books, Inc., Corvallis, Oregon.
14. 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.
15. Cramer, C.L., K. Edwards, M. Dron, X. Liang, S.L. Dildine, G.P. Bolwell, R.A. Dixon, C.J. Lamb and W. Schuch. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Molecular Biology* 12: 367-383.
16. De Block, M., L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell and P. Zambryski. 1984. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *The EMBO Journal* 3: 1681-1689.
17. Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, P.R. Sanders, J.S. Flick, S.P. Adams, M.L. Bittner, L.A. Brand, C.L. Fink, J.S. Fry, G.R. Galluppi, S.B. Goldberg, N.L. Hoffman and S.C. Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4803-4807.
18. Frate, C.A. and R.M. Davis. 2008. Alfalfa diseases and management. Pages 155-174 in *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. C.G. Summers and D.H. Putnam (eds.). University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, California.
19. 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.
20. Higginbotham, G.E., C.L. Stull, N.G. Peterson, A.V. Rodiek, B.A. Reed and J.N. Guerrero. 2008. Alfalfa utilization by livestock. Pages 265-279 in *Irrigated Alfalfa Management for Mediterranean and Desert Zones*. C.G. Summers and D.H. Putnam (eds.). University of California Agriculture and Natural Resources, Oakland, California.
21. Horsch, R.B., R.T. Fraley, S.G. Rogers, P.R. Sanders, A. Lloyd and N. Hoffmann. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science* 223: 496-498.
22. Howarth, R.E. 1988. Antiquality factors and nonnutritive chemical components. Pages 493-514 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.

23. Inoue, K., V.J.H. Sewalt, G.M. Ballance, W. Ni, C. Stürzer and R.A. Dixon. 1998. Developmental expression and substrate specificities of alfalfa caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in relation to lignification. *Plant Physiology* 117: 761-770.
24. Kozak, M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 5134-5142.
25. Latunde-Dada, A.O. and J.A. Lucas. 1985. Involvement of the phytoalexin medicarpin in the differential response of callus lines of lucerne (*Medicago sativa*) to infection by *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 26: 31-42.
26. Leyva, A., X. Liang, J.A. Pintor-Toro, R.A. Dixon and C.J. Lamb. 1992. *cis*-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *Plant Cell* 4: 263-271.
27. Malinow, M.R., E.J. Bardana, B. Pirofsky, S. Craig and P. McLaughlin. 1982. Systemic lupus erythematosus-like syndrome in monkeys fed alfalfa sprouts: Role of a nonprotein amino acid. *Science* 216: 415-417.
28. Marston, A., J.-L. Wolfender and K. Hostettmann. 2000. Analysis and isolation of saponins from plant material. Pages 1-12 in *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants*. W. Oleszek and A. Marston (eds.). Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
29. Massiot, G., C. Lavaud, V. Besson, L. Le Men-Olivier and G. Van Binst. 1991. Saponins from aerial parts of alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 78-82.
30. Massiot, G., C. Lavaud, D. Guillaume and L. Le Men-Olivier. 1988. Reinvestigation of the sapogenins and prosapogenins from alfalfa (*Medicago sativa*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 902-909.
31. 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, Ed. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.
32. 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.
33. OECD. 2005. Consensus document on compositional considerations for new varieties of alfalfa and other temperate forage legumes: Key feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. ENV/JM/MONO(2005)13. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, France.
34. Oleszek, W. 1996. Alfalfa saponins: Structure, biological activity, and chemotaxonomy. Pages 155-170 in *Saponins Used in Food and Agriculture*. Volume 405. G.R. Waller and K. Yamasaki (eds.). Plenum Press, New York, New York.
35. Quiros, C.F. and G.R. Baughan. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. Pages 93-124 in *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds.). American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wisconsin.

36. Reddy, M.M.S., F. Chen, G. Shadle, L. Jackson, H. Aljoe and R.A. Dixon. 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L.) Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 16573 - 16578.
37. Rosenthal, G.A. and P. Nkomo. 2000. The natural abundance of L-canavanine, an active anticancer agent, in alfalfa, *Medicago sativa* (L.). Pharmaceutical Biology 38: 1-6.
38. Rumbaugh, M.D., J.L. Caddell 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.
39. Stob, M. 1983. Naturally occurring food toxicants: Estrogens. Pages 81-100 in CRC Handbook of Naturally Occurring Food Toxicants. M. Rechcigl (ed.). CRC Press, Inc., Boca Roton, Florida.
40. Tanner, G.J., P.J. Moate, L.H. Davis, R.H. Laby, Y. Li and P.J. Larkin. 1995. Proanthocyanidins (condensed tannin) destabilise plant protein foams in a dose dependent manner. Australian Journal of Agricultural Research 46: 1101-1109.
41. Tava, A., W. Oleszek, M. Jurzysta, N. Berardo and M. Odoardi. 1993. Alfalfa saponins and sapogenins: Isolation and quantification in two different cultivars. Phytochemical Analysis 4: 269-274.
42. 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.
43. 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].
44. Van Keuren, R.W. and A.G. Matches. 1988. Pasture production and utilization. Pages 515-538 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.
45. Vanholme, R., B. Demedts, K. Morreel, J. Ralph and W. Boerjan. 2010. Lignin biosynthesis and structure. Plant Physiology 153: 895-905.
46. Waterhouse, P.M. and C.A. Helliwell. 2003. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. Nature Reviews Genetics 4: 29-38.
47. Zhou, R., L. Jackson, G. Shadle, J. Nakashima, S. Temple, F. Chen and R.A. Dixon. 2010. Distinct cinnamoyl CoA reductases involved in parallel routes to lignin in *Medicago truncatula*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 17803-17808.

48. 浅沼昌平・狩山俊悟・榎本敬・小畠裕子 1987 岡山県の帰化植物 倉敷市立自然史博物館 岡山
49. 大分県植物誌刊行会 1989 新版 大分県植物誌 大分
50. 太田久次 2010 三重県帰化植物誌 ムツミ企画 三重
51. 大橋広好 1999 マメ科 【10】 ウマゴヤシ属 1 ムラサキウマゴヤシ. 新装版 日本の野生植物 草本 II 離弁花類 佐竹 義輔・大井 次三郎・北村 四郎・亙理俊次・富成 忠夫(編) 平凡社 東京 p.194
52. 杉野孝雄 2008 静岡県の帰化植物 富士常葉大学附属環境防災研究所 静岡
53. 鈴木信治 1992 マメ科牧草 アルファルファ(ルーサン) —その品種・栽培・利用— 雪印種苗株式会社 北海道

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Information on Vector F
2. Sequence of Genetic Elements in PV-MSPQ12633
3. PV-MSPQ12633 Plasmid Lineage
4. Amended Report for MSL0023982: Composition of Lignin of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024403)
5. Analyses of Lignin in Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0024120)
6. Molecular Characterization of Reduced Lignin Alfalfa KK179 (MSL0023299)
7. Bioinformatics Evaluation of the DNA Sequences Flanking the Insertion Site in KK179: BLASTn and BLASTx Analyses (MSL0024257)
8. Stability of the DNA Insert in KK179 Across Multiple Generations (MSL0023312)
9. Lignin Analysis of Forage from Multiple Generations of KK179 Alfalfa (RAR-2012-0129)
10. Heritability of the KK179 insert in the MBC2, MBC3, and Syn1 Populations (RPN-2010-0705)
11. Analysis of the Endogenous CCOMT RNA Level in Alfalfa KK179 (MSL0023329)
12. Bioinformatics Evaluation of DNA Sequences Flanking the 5' and 3' Junctions of Inserted DNA in KK179: Assessment of Putative Polypeptides (MSL0023975)
13. Bioinformatics Evaluation of the Transfer DNA Insert in KK179 Utilizing the AD_2012, TOX_2012 and PRT_2012 Databases (MSL0024048)
14. Composition Analyses of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0023847)
15. Analyses of Saponin Levels of Forage from KK179 Alfalfa Grown in the United States during the 2011 Growing Season (MSL0023980)