

生物多様性影響評価検討会での検討の結果

- 1 名称：青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-Sirius, Bombyx mori*) (GN13×GCS13)

第一種使用等の内容：隔離飼育区画における幼虫の飼育（3齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為

申請者：国立研究開発法人農業生物資源研究所、群馬県蚕糸技術センター

昆虫分科会は、申請者から提出された生物多様性影響評価書に基づき、第一種使用規程に従って本遺伝子組換えカイコの第一種使用等をする場合の生物多様性影響に関する申請者による評価の内容について検討を行った。主に確認した事項は以下のとおりである。

(1) 生物多様性影響評価の結果について

本組換えカイコは、

① 青色蛍光絹繊維蛋白質を産生する *HC-Sirius* 遺伝子（オワンクラゲ由来の緑色蛍光蛋白質を改変した青色蛍光蛋白質 *Sirius2* 及びカイコ由来のフィブロイン H 鎖蛋白質との融合蛋白質をコード）及び選抜マーカーとしてカイコ由来の *KMO* 遺伝子（1齢幼虫の体色を褐色にするキヌレニン酸化酵素をコード）が組み込まれたドナープラスミド(pBac[A3KMO]_HC-Sirius)

② *piggyBac* 転移酵素遺伝子が組込まれたヘルパープラスミド(pHA3PIG)

をそれぞれカイコの受精卵（胚）に顕微注入することにより、目的遺伝子（*HC-Sirius* 遺伝子及び *KMO* 遺伝子）が染色体上に1コピー組み込まれた2つの系統（ホモ個体）を交雑することにより得られた雑種第一代である。目的遺伝子の伝達及び発現の安定性については、それぞれの系統の継代及び雑種第一代（本組換えカイコ）においてサザンハイブリダイゼーション法及び繭の形質により確認されている。なお、染色体上に *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在しないことが PCR 法により確認されている。

(ア) 競合における優位性

宿主が属する生物種であるカイコは、我が国において長年にわたり飼育されてきたが、これまでカイコが野外に逸出して自然環境下で繁殖したとの報告はない。

また、仮に、カイコが自然環境下に放出されたとしても、

- ① 幼虫はほとんど移動できないため、餌となる桑に到達することができないこと
- ② カイコは近縁野生種であるクワコ (*Bombyx mandarina*) と異なり、幼虫は擬態しないため、外敵となる野鳥や昆虫に速やかに捕食されてしまうこと
- ③ 成虫が発生した場合でも、飛ぶことができないため、野鳥や昆虫に捕食される可能性が高いこと

から自然環境下で繁殖することは想定し難い。

さらに、本組換えカイコでは、絹糸腺で青色蛍光絹繊維蛋白質が、全身で皮膚色を変化させるキヌレニン酸化酵素が発現するが、これらの蛋白質が幼虫の運動性を高めたり、成虫に飛翔能力を付与したりすることは考え難い。

本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコとの間で形態及び生育の特性（幼虫の体重、孵化歩合、幼虫の行動範囲、営繭率、産卵範囲、産卵数、繭重、繭層重、幼虫期間及び脱皮回数）を比較したところ、幼虫体重（2及び3齢期）、幼虫の行動範囲、営繭率、産卵範囲及び産卵数について統計学的有意差が認められたが、これらのうち、競合における優位性に係ると考えられる幼虫の行動範囲、営繭率及び産卵数については本組換えカイコのほうが劣る結果となった。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した

(イ) 捕食性

カイコは幼虫期に人為的に与えられた^{そうよう}桑葉のみを摂食し、桑葉以外の植物や昆虫を摂食することはなく、成虫期には摂食や飲水は一切行わない。本組換えカイコでは、幼虫期に絹糸腺で青色蛍光絹繊維蛋白質が、全身で皮膚色を変化させるキヌレニン酸化酵素が発現するが、これらの蛋白質が本組換えカイコの食性に変化を与えるとは考え難い。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、捕食性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(ウ) 有害物質の産生性

宿主が属する生物種であるカイコが、野生動植物等の生息又は生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

また、養蚕農家では、一般的に飼育中に生じた桑葉の残渣、カイコの糞及び死体等を敷地内の穴や桑畑に廃棄しているが、それら残渣等が野生動植物等に有害性をもたらしたとの報告もない。

本組換えカイコが産生する青色蛍光絹繊維蛋白質及びキヌレニン酸化酵素は、既知の有毒蛋白質やアレルゲンと類似のアミノ酸配列を有さないことが確認されている。また、青色蛍光絹繊維蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考え難い。さらに、キヌレニン酸化酵素は高い基質特異性を有しており、宿主の代謝系に作用して新たに有害物質を産生するとは考え難い。

実際に、本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコの糞や死体をそれぞれ土壌に混合し、ブロッコリーの発芽・生育及び土壌微生物に与える影響を比較検討したところ、本組換えカイコ及び非組換えカイコとの間に統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(ウ) 交雑性

我が国には、カイコと交雑可能な近縁野生種としてクワコが生息しており、影響を受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

我が国の自然環境下において本組換えカイコとクワコが交雑した場合、本組換えカイコ由来の *HC-Sirius* 遺伝子及び *KMO* 遺伝子が当該交雑個体からクワコ集団に浸透し、定着する可能性が想定される。

カイコとクワコはいずれもメス成虫が放出する性フェロモン（ボンビコール）が同じであるため、自然環境下においてカイコのメス成虫が発した性フェロモンに誘引されて野生のクワコのオス成虫が飛来し、交尾する可能性が考えられる。一方、カイコのオス成虫は、飛翔能力が無いため、仮に自然環境下で野生のメスのクワコが発した性フェロモンを感知したとしても、当該クワコに到達することができず、交尾するとは考え難い。

実際に、日本各地で採集したクワコと、カイコの様々な系統について、ミトコンドリアゲノムの *cox1* (cytochrome c oxidase I) 遺伝子の遺伝的多型を解析したところ、クワコにカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められなかった。交雑第1代目は、カイコのミトコンドリアゲノムを有することになることから、少なくとも、現在の養蚕の現場においてカイコとクワコの交雑は起きていないか、極めて稀であると考えられた。

本申請では、本組換えカイコを3齢幼虫期以降から繭の形成まで飼育し、繭はその後、冷凍により不活化することから、これら過程において成虫が発生する可能性は極めて低い。万一、成虫が発生したとしても本組換えカイコのメス成虫は飛翔能力が無く、隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室（以下「各蚕室」という。）の内側全体又は開放する窓や戸に4mm目以下の網が張られていることから、各蚕室外からクワコのオス成虫が侵入することは無いため、交尾する機会は得られない。仮に、餌となる桑葉に付着してクワコ幼虫や繭が各蚕室内に侵入したとしても、本組換えカイコとクワコは外見や行動特性が異なることから容易に区別でき、侵入したクワコを捕殺することが可能である。また、各蚕室内でクワコのオス成虫が存在し、本組換えカイコのメス成虫と交尾したとしても、各蚕室内には網が張られているため、産卵は各蚕室内に限られ、飼育終了後は各蚕室内を清掃することから、卵は孵化前に全て回収し、不活化することが可能である。

一方、飼育残渣については粉砕機による粉砕処理を行うこととしており、仮に、本組換えカイコの幼虫や蛹が残渣に残存していたとしても、上蔟から7日以内の粉砕処理により不活化することが可能である。

このように、本申請における使用の範囲内で、本組換えカイコが成虫となって野外に放出される可能性は低く、日本国内に生息する野生のクワコと交雑するとは考え難い。

以上のことから、本申請の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価を踏まえた結論

以上より、本組換えカイコは、限定された環境で一定の作業要領を踏まえた隔離飼育区画における幼虫の飼育（3 齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為では、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

2 名称：橙色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-mKO, Bombyx mori*) (GN2×GCS2)

第一種使用等の内容：隔離飼育区画における幼虫の飼育（3齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為

申請者：国立研究開発法人農業生物資源研究所、群馬県蚕糸技術センター

昆虫分科会は、申請者から提出された生物多様性影響評価書に基づき、第一種使用規程に従って本遺伝子組換えカイコの第一種使用等をする場合の生物多様性影響に関する申請者による評価の内容について検討を行った。主に確認した事項は以下のとおりである。

(1) 生物多様性影響評価の結果について

本組換えカイコは、

① 橙色蛍光絹繊維蛋白質を産生する *HC-mKO* 遺伝子（ヒラタクサビライシ由来の橙色蛍光蛋白質 *mKO* 及びカイコ由来のフィブロイン H 鎖蛋白質との融合蛋白質をコード）及び選抜マーカーとしてオワンクラゲ由来の *EGFP* 遺伝子（緑色蛍光蛋白質をコード）が組み込まれたドナープラスミド (*pBac[3×P3-EGFPafm]_HC-mKO*)

② *piggyBac* 転移酵素遺伝子が組込まれたヘルパープラスミド(*pHA3PIG*)

をそれぞれカイコの受精卵（胚）に顕微注入することにより、目的遺伝子（*HC-mKO* 遺伝子及び *EGFP* 遺伝子）が染色体上に1コピー組み込まれた2つの系統（ホモ個体）を交雑することにより得られた雑種第一代である。目的遺伝子の伝達及び発現の安定性については、それぞれの系統の継代及び雑種第一代（本組換えカイコ）においてサザンハイブリダイゼーション法及び繭の形質により確認されている。なお、染色体上に *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在しないことが PCR 法により確認されている。

(ア) 競合における優位性

宿主が属する生物種であるカイコは、我が国において長年にわたり飼育されてきたが、これまでカイコが野外に逸出して自然環境下で繁殖したとの報告はない。

また、仮に、カイコが自然環境下に放出されたとしても、

- ① 幼虫はほとんど移動できないため、餌となる桑に到達することができないこと
- ② カイコは近縁野生種であるクワコ (*Bombyx mandarina*) と異なり、幼虫は擬態しないため、外敵となる野鳥や昆虫に速やかに捕食されてしまうこと
- ③ 成虫が発生した場合でも、飛ぶことができないため、野鳥や昆虫に捕食される可能性が高いこと

から自然環境下で繁殖することは想定し難い。

さらに、本組換えカイコでは、絹糸腺で橙色蛍光絹繊維蛋白質が、眼で緑色蛍光蛋白質が発現するが、これらの蛋白質が幼虫の運動性を高めたり、成虫に飛翔能力を付与したりすることは考え難い。

本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコとの間で形態及び生育の特性（幼虫の体

重、孵化歩合、幼虫の行動範囲、営繭率、産卵範囲、産卵数、繭重、繭層重、幼虫期間及び脱皮回数)を比較したところ、幼虫の体重(4及び5齢期)、営繭率、産卵範囲及び孵化歩合について統計学的有意差は認められたが、これらのうち、競合における優位性に係ると考えられる営繭率及び孵化歩合については本組換えカイコのほうが劣る結果となった。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、競合における優位性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した

(イ) 捕食性

カイコは幼虫期に人為的に与えられた桑葉^{そうよう}のみを摂食し、桑葉以外の植物や昆虫を摂食することはなく、成虫期には摂食や飲水は一切行わない。本組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺で橙色蛍光絹繊維蛋白質を、眼で緑色蛍光蛋白質をそれぞれ発現するが、これらの蛋白質が本組換えカイコの食性に变化を与えるとは考え難い。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、捕食性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(ウ) 有害物質の産生性

宿主が属する生物種であるカイコが、野生動植物等の生息又は生育に悪影響を及ぼすような有害物質を産生するとの報告はない。

また、養蚕農家では、一般的に飼育中に生じた桑葉の残渣やカイコの糞、死体等を敷地内の穴や桑畑に廃棄しているが、それら残渣等が野生動植物等に有害性をもたらしたとの報告もない。

本組換えカイコが産生する橙色蛍光絹繊維蛋白質及び緑色蛍光蛋白質は、既知の有毒蛋白質やアレルギーと類似のアミノ酸配列を有さないことが確認されている。また、橙色蛍光絹繊維蛋白質及び緑色蛍光蛋白質は酵素活性を持たず、宿主の代謝系に作用して有害物質を産生するとは考え難い。

実際に、本組換えカイコ及び対照の非組換えカイコの糞や死体をそれぞれ土壌に混合し、ブロッコリーの発芽・生育及び土壌微生物に与える影響を比較検討したところ、本組換えカイコ及び非組換えカイコとの間に統計学的有意差は認められなかった。

以上のことから、本申請の範囲内では、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されず、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(ウ) 交雑性

我が国には、カイコと交雑可能な近縁野生種としてクワコが生息しており、影響を

受ける可能性のある野生動物としてクワコが特定された。

我が国の自然環境下において本組換えカイコとクワコが交雑した場合、本組換えカイコ由来の *HC-mKO* 遺伝子及び *EGFP* 遺伝子が当該交雑個体からクワコ集団に浸透し、定着する可能性が想定される。

カイコとクワコはいずれもメス成虫が放出する性フェロモン（ボンビコール）が同じであるため、自然環境下においてカイコのメス成虫が発した性フェロモンに誘引されて野生のクワコのオス成虫が飛来し、交尾する可能性が考えられる。一方、カイコのオス成虫は、飛翔能力が無いため、仮に自然環境下で野生のメスのクワコが発した性フェロモンを感知したとしても、当該クワコに到達することができず、交尾するとは考え難い。

実際に、日本各地で採集したクワコと、カイコの様々な系統について、ミトコンドリアゲノムの *cox1* (cytochrome c oxidase I) 遺伝子の遺伝的多型を解析したところ、クワコにカイコのミトコンドリアゲノムが流入した痕跡は認められなかった。交雑第1代目は、カイコのミトコンドリアゲノムを有することになることから、少なくとも、現在の養蚕の現場においてカイコとクワコの交雑は起きていないか、極めて稀であると考えられた。

本申請では、本組換えカイコを3齢幼虫期以降から繭の形成まで飼育し、繭はその後、冷凍により不活化することから、これら過程において成虫が発生する可能性は極めて低い。万一、成虫が発生したとしても本組換えカイコのメス成虫は飛翔能力が無く、隔離飼育区画内のパイプハウス蚕室及びプレハブ蚕室（以下「各蚕室」という。）の内側全体又は開放する窓や戸に4mm目以下の網が張られていることから、各蚕室外からクワコのオス成虫が侵入することは無いため、交尾する機会は得られない。仮に、餌となる桑葉に付着してクワコ幼虫や繭が各蚕室内に侵入したとしても、本遺伝子組換えカイコとクワコは外見や行動特性が異なることから容易に区別でき、侵入したクワコを捕殺することが可能である。また、各蚕室内でクワコのオス成虫が存在し、本遺伝子組換えカイコのメス成虫と交尾したとしても、各蚕室内には網が張られているため、産卵は各蚕室内に限られ、飼育終了後は各蚕室内を清掃することから、卵は孵化前に全て回収し、不活化することが可能である。

一方、飼育残渣については粉碎機による粉碎処理を行うこととしており、仮に、本組換えカイコの幼虫や蛹が残渣に残存していたとしても、上蔟から7日以内の粉碎処理により不活化することが可能である。

このように、本申請における使用の範囲内で、本組換えカイコが成虫となって野外に放出される可能性は低く、日本国内に生息する野生のクワコと交雑するとは考え難い。

以上のことから、本申請の範囲内では、交雑性に起因する生物多様性影響が生ずるおそれはないとの申請者による結論は妥当であると判断した。

(2) 生物多様性影響評価を踏まえた結論

以上より、本組換えカイコは、限定された環境で一定の作業要領を踏まえた隔離飼育区画における幼虫の飼育（3齢幼虫期以降から繭の形成まで）並びに繭の生産、保管、

運搬、不活化処理及び廃棄並びにこれらに付随する行為では、我が国における生物多様性に影響が生ずるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。