

生物多様性影響評価検討会における検討の結果

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、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13）

第一種使用等の内容：

カイコの繭糸の生産を目的とした、①幼虫（3 齢幼虫期以降のものに限る。以下同じ。）の飼育、②繭の生産及び加工、③幼虫及び繭の保管、運搬及び廃棄並びに①から③までに付随する行為

申請者：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

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青色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ（GN13、GCS13、GN13×GCS13、GN13×MCS4、GN13×支 146 号、日 137 号×GCS13）（以下、本組換えカイコという）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 青色蛍光蛋白質—フィブロイン H 鎖融合蛋白質を産生する *HC-Sirius* 遺伝子及び選抜マーカーとしてキヌレニン酸化酵素蛋白質をコードする *KMO* 遺伝子が組み込まれたドナープラスミド(pBac [A3KMO]_HC-Sirius)
- ② *piggyBac* 転移酵素蛋白質をコードする *piggyBac transposase* 遺伝子が組み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、*HC-Sirius* 遺伝子及び *KMO* 遺伝子（以下「目的遺伝子」という。）が染色体上に 1 コピー組み込まれていることが、遺伝子の分離様式により確認されている。

目的遺伝子の伝達の安定性については、サザンハイブリダイゼーション法により確認されている。また、目的遺伝子の発現の安定性については、繭の外観形質により確認されている。ただし、*piggyBac* 転移酵素遺伝子については、本組換えカイコの染色体上に組み込まれていないことが PCR 法により確認されている。

（1）競合における優位性

カイコは、我が国では長年飼育されてきた歴史があるが、これまでに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、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ず、生存できないこと
- ② カイコの体色は白色を呈し、外敵となる野鳥や昆虫に容易に発見され捕食されてしまうこと
- ③ 仮に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

れる可能性が高く、交尾する機会が少ないことから自然環境下で生息又は繁殖する可能性は低い。

本組換えカイコは、絹糸腺で青色蛍光蛋白質—フィブロインH鎖融合蛋白質が発現するが、カイコ幼虫の運動性を高めたり、カイコ成虫に飛翔能力を付与したりすることはないことから、カイコの競合における優位性を高めることはないと考えられた。また、組換え個体の選抜マーカーであるキヌレニン酸化酵素も、1齢幼虫の皮膚を褐色にさせるにすぎず、2齢以降の幼虫の皮膚は白色で非組換えカイコと区別できないため、本組換えカイコも非組換えカイコと同様に屋外では他の昆虫等によって容易に捕食されると考えられること等から、自然条件下で生存・繁殖する可能性は低く、競合における優位性が高まることはない。

組換えカイコ〔GN13×GCS13〕及び非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕の生理学的特性について調査した結果、幼虫体重（2齢及び3齢）、幼虫の行動範囲、営繭率、産卵範囲、産卵数については組換えカイコ〔GN13×GCS13〕が、非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕に比べて統計学的に有意に小さく、幼虫体重（1齢、4齢、5齢）、繭重と繭層重、孵化歩合については組換えカイコ〔GN13×GCS13〕と非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕との間で有意差は認められなかった。幼虫期間については組換えカイコ〔GN13×GCS13〕が、非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕に比べて雌雄ともに統計学的に有意に長かったが、その差は0.2～0.4日程度であり、このことが組換えカイコ〔GN13×GCS13〕の競合における優位性を高めるとは考えられない。

その他の組換えカイコ系統GN13、GCS13、〔GN13×MCS4〕、〔GN13×支146号〕及び〔日137号×GCS13〕については、孵化歩合、幼虫期間、繭重、繭層重及び産卵数は、いずれも非組換えカイコ系統日137号、支146号、MCS4、〔日137号×MCS4〕、〔日137号×支146号〕の品種間差の範囲内であると考えられた。〔日137号×GCS13〕の営繭率は、どの非組換えカイコよりも高かったが、その差は〔日137号×MCS4〕よりも0.5%高い程度であった。その他の組換えカイコGN13、GCS13、〔GN13×MCS4〕、〔GN13×支146号〕の営繭率は、非組換えカイコ系統の品種間差の範囲内であると考えられた。

また、隔離飼育区画において、組換えカイコ〔GN13×GCS13〕と非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕の生理学的特性について調査したところ、繭重、繭層重については組換えカイコ〔GN13×GCS13〕が、非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕に比べて小さい場合が多く、幼虫期間については組換えカイコ〔GN13×GCS13〕と非組換えカイコ〔日137号×MCS4〕で同じだった。

なお、GN13及びGCS13は〔GN13×GCS13〕の親系統であり、〔GN13×MCS4〕はGN13と宿主系統MCS4との交配後代、〔GN13×支146号〕はGN13と実用品種の支146号との交配後代、〔日137号×GCS13〕は実用品種の日137号とGCS13との交配後代であり、また、これらの系統は同じイベント由来の組換えカイコであることから、〔GN13×GCS13〕の生理学的特性と大きく変わらないと考えられる。

以上のことから、本組換えカイコの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。

(2) 捕食性

カイコの幼虫は与えられた桑葉のみを摂食し、桑葉以外の植物や昆虫等を摂食することはなく、成虫は摂食や飲水は一切行わない。

本組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺で青色蛍光蛋白質—フィブロイン H 鎖融合蛋白質、全身でキヌレニン酸化酵素が発現するが、これら蛋白質は昆虫の捕食性を高めることはないと考えられた。

以上のことから、本組換えカイコの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。

(3) 有害物質の産生性

カイコは、我が国では長年飼育されてきた歴史を有するが、これまで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有害物質を産生したとの報告はない。養蚕農家では飼育中に生じた残渣等を桑畑等に廃棄することが一般的に行われているが、これら飼育残渣等が野生動植物等に有害性をもたらしたとの報告はない。本

組換えカイコが産生する青色蛍光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、本組換えカイコは幼虫期に青色蛍光蛋白質—フィブロインH鎖融合蛋白質として青色蛍光蛋白質Sirius2を絹糸腺で発現するが、多くの生物の遺伝子組換えにおいて選抜マーカーなどとして用いられている緑色蛍光蛋白質GFPにアミノ酸置換を導入したものであり、蛋白質としての特性から考えても、土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えることはないと考えられた。また、選抜マーカーとして全身でキヌレニン酸化酵素を発現するが、カイコを始め多くの動物に内在する酵素であり、これも土壤中に混入した場合に他の生物に影響を与えることはないと考えられた。また、組換えカイコ [GN13×GCS13] 及び非組換えカイコ [日137号×MCS4] の糞や死体を土壤中に混合し、ブロッコリーの発芽・生育や土壤微生物に与える影響を調査したところ、本組換えカイコと非組換えカイコとの間で統計学的な有意差は認められなかった。

これらのことから、本組換えカイコが、対照の非遺伝子組換えカイコに比べ、有害物質の産生性が高まるとはならないと考えられた。

以上のことから、本組換えカイコの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。

(4) 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植物等としてクワコが特定された。

すなわち、本組換えカイコと野生のクワコの交雑によって、その後、当該雑種が繁殖して、本組換えカイコに導入した *HC-Sirius* 遺伝子及び *KMO* 遺伝子がクワコ集団に浸透・定着する可能性が考えられる。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が同一であるため、自然環境下でカイコメス成虫が放出した性フェロモンにクワコオス成虫が誘引されて交尾する可能性が考えられる。一方、カイコ成虫は雌雄ともに飛翔できないほか、カイコのオス成虫がクワコのメス成虫の性フェロモンを感知して交尾行動を起こしたとしても、カイコのオス成虫はフェ

ロモン源にむかって小刻みにジグザグ歩行をしながら進むこととなるため、野外の桑樹の幹を歩いて登り、樹上のクワコのメス成虫と交尾することはないと考えられる。

我が国では、過去、全国各地で養蚕が行われていたが、これまで自然環境下でカイコとクワコの雑種が見つかったとの報告はない。また、現在カイコを飼育している養蚕農家5戸（群馬県前橋市）の周辺で3年間に渡ってフェロモントラップを用いて捕獲したクワコ 3,750 頭を調査した結果でも、カイコとクワコの交雑個体は見つからなかった。さらに以前に養蚕が行われていた地域を中心として全国各地で捕獲したクワコのオス成虫のミトコンドリア *cox1* 遺伝子型 (7,708 頭) や核ゲノム *CAD* 遺伝子型 (1,019 頭) などを解析した結果においても、カイコからクワコへの遺伝子流入は見つからなかった。このことから、カイコとクワコの交雑個体又はその雑種後代が我が国の自然環境下において生息又は繁殖する可能性は極めて低いことが示唆された。これは、

- ① 一般的な農家でのカイコの飼育が3～4 齢幼虫から繭の形成までの幼虫及び蛹の段階に限定されるほか、収穫された繭（蛹を含む。）は製糸工場で熱乾燥処理されて不活化されるため、通常の農家では、開放的な飼育環境下で交尾可能な成虫を取り扱うことがないこと
- ② カイコ幼虫の運動性はきわめて低く、餌（桑葉）がなくても移動しないことから、飼育室の外に逃亡することはなく、仮に野外に出たとしても桑樹に到達して生育することもなく、鳥や昆虫等にも容易に捕食されて生き残ることがきわめて難しいこと
- ③ 飼育残渣の中に幼虫や繭が残されて成虫が羽化したとしても、カイコ成虫は飛翔能力が全くなく歩行能力もきわめて低いため、鳥や昆虫等に容易に捕食されて生き残ることがきわめて難しいこと
- ④ 仮に、それら野生動物の捕食を免れてカイコのオス成虫が野外に生じたとしても、飛翔能力が全くなく、樹上にいるクワコのメス成虫が発する性フェロモンを感知して、その方向に移動しようとしても到達できないため交尾は不可能であること
- ⑤ 仮に、野生動物の捕食を免れてカイコのメス成虫が野外に生じたとしても、飛翔能力が全くなく歩行能力もきわめて低いため、飼育残渣の中に休眠卵を産下するに過ぎず、万一そこから交雑第一代の幼虫が孵化しても、周囲に新鮮な桑葉はなく、また、周辺の桑樹に到達して生存する可能性が低いことがその原因と考えられる。

実際、こうした原因を確認するため行った隔離飼育試験等の結果では、

- ① 飼育中のカイコ成虫発生の可能性については、隔離飼育試験において飼育室内で成虫が生じたことはなく、飼育残渣についても、網で覆って管理したり、粉碎処理したりすることにより、クワコとの交雑は認められなかった。
- ② 野生動物による捕食の可能性については、カイコの4 齢幼虫 500 頭と5 齢幼虫 800 頭を屋外で飼育したところすべて鳥や昆虫に捕食されて成虫が生じることがなく、カイコのメス成虫 200 頭を屋外に置いた場合も、アリ類による攻撃を受けて体が分断されることなどによりすべてが死亡した。

③ 仮にカイコのメス成虫とクワコのオス成虫の偶発的な交尾が生じ、カイコのメス成虫が飼育室内又は野外に置かれた飼育残渣内で産卵したとしても、カイコのメス成虫はまったく飛翔できず、歩行能力も弱いなど、きわめて狭い範囲に産卵すると思われる。それら交雑卵から幼虫が孵化することを想定して、実際に野外の桑樹から2 mの地面に交雑個体の孵化幼虫 2,964 頭を置き、その後の生存調査を行ったが、桑樹まで到達し桑葉を摂食して生育した個体はまったく観察されなかった。

また、本組換えカイコが、絹糸腺で発現する青色蛍光蛋白質—フィブロイン H 鎖融合蛋白質及び全身で発現するキヌレニン酸化酵素蛋白質は、カイコの繁殖能力、移動性を高めたり飛翔能力を付与したりすることはないため、対照の非組換えカイコと比べて、交雑性が高まることはないと考えられる。

これらのことから、野外で本組換えカイコの成虫が生じる可能性は低く、また、仮に、野生のクワコとの交雑が生じたとしても、当該雑種が生存し続けることは困難であると考えられることから、野生のクワコ集団中に本組換えカイコに導入した *HC-Sirius* 遺伝子及び *KMO* 遺伝子が浸透・定着する可能性は極めて低いと考えられた。

さらに、本組換えカイコの飼育にあたっては、別に定める第一種使用等による飼育等要領（以下「飼育等要領」という。）にしたがってクワコとの交雑防止に万全を期すため、飼育室は窓等に4 mm目以下の網を張れる構造とし、また繭を収穫した後も飼育室を閉め切るか網で覆うことにより、野外からのクワコ成虫の侵入を防止する措置を執ることとしている。また、カイコの幼虫や繭（蛹）が混入している可能性がある飼育残渣については、4 mm目以下の網で覆って管理するか粉碎機によって粉碎すること等により、確実に不活化してクワコとの交雑を防止する措置を執ることとしている。さらに、飼育等要領を守って適切に飼育管理できる生産者（別途定める基準により選定した者）に限って使用を許可することとしている。

加えて、交雑個体が生じていないかを確認するための方法として、本遺伝子組換えカイコの飼育開始後には、別に定めるモニタリング計画書に基づいて、学識経験者の助言等を踏まえ毎年モニタリング実施要領を作成し、実際の飼育規模等に応じた適切なモニタリングを実施することとしている。

以上のことから、本組換えカイコの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、本組換えカイコを第一種使用規程に従って使用した場合に、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の結論は妥当であると判断した。