

## 生物多様性影響評価検討会での検討の結果

名称：緑色蛍光タンパク質含有絹糸生産カイコ (*HC-EGFP*, *Bombyx mori*) (HC-EGFP ぐんま × HC-EGFP200)

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：独立行政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

本遺伝子組換えカイコは、緑色蛍光絹繊維タンパク質を産生する *HC-EGFP* 遺伝子（カイコ由来のフィブロイン H 鎖タンパク質の中央部をオワンクラゲ (*Aequorea victoria*) 由来の緑色蛍光タンパク質に置換した融合タンパク質をコード）及び選抜マーカーとして本遺伝子組換えカイコの眼に赤色蛍光タンパク質を発現する *DsRed2* 遺伝子（イソギンチャクモドキ類 (*Discosoma* sp.) 由来の改変型赤色蛍光タンパク質 遺伝子）がそれぞれ組み込まれたドナープラスミド（pBac[3xP3-DsRed2afm]\_HC-EGFP）と、当該ドナープラスミド中の目的領域をカイコゲノム中に挿入するための *piggyBac* 転移酵素を発現する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）に顕微注入し作成されている。

本遺伝子組換えカイコには、*HC-EGFP* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子が染色体上に 1 コピー組み込まれ、後代系統において安定的に伝達されていることが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、当該遺伝子が、後代系統において安定的に発現していることが RNA の発現、繭の緑色蛍光及びカイコの眼における赤色蛍光の発現によりそれぞれ確認されている。なお、本遺伝子組換えカイコ中に *piggyBac* 転移酵素遺伝子が存在しないことが PCR 法で確認されていることから、ヘルパープラスミドは残存していないと考えられる。

#### (1) 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、

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、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、

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、本遺伝子組換えカイコで発現する緑色蛍光タンパク質や赤色蛍光タンパク質は、それぞれ絹糸腺や眼において蛍光を発現する以外に、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もない。また、非遺伝子組換えカイコと本遺伝子組換えカイコにおける、孵化率、<sup>えいけんりつ</sup> 営繭率（繭を作った幼虫の割合）、幼虫の行動範囲を比較したところ有意差が認められず、幼虫体重、産卵数、産卵範囲等については、本遺伝子組換えカイコの方が統計学的に有意に小さい結果となった。

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。

## (2) 捕食性

カイコは幼虫期に人為的に与えられた<sup>そうよう</sup> 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、成虫期には摂食や飲水は一切行わない。本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺で緑色蛍光タンパク質を、眼で赤色蛍光タンパク質をそれぞれ発現するが、これら2つのタンパク質が本遺伝子組換えカイコの食性に変化を与え難い。

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。

## (3) 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等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。

本遺伝子組換えカイコは、幼虫期に絹糸腺で緑色蛍光タンパク質を、眼で赤色蛍光タンパク質を発現するが、これら2つのタンパク質は、遺伝子組換え体の選抜マーカーに通常用いられ、これまで生物に対する毒性は認められていない。また、既知の有毒タンパク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。さらに、本遺伝子組換えカイコ及び非遺伝子組換えカイコの糞や死体をそれぞれ土壌に混合し、プロッコリーの発芽、生育や土壌微生物に与える影響を比較検討したところ、本遺伝子組換えカイコと非遺伝子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。

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。

#### (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遺伝子組換えカイコとクワコが交雑した場合、本遺伝子組換えカイコ由来の *HC-EGFP* 遺伝子及び *DsRed2* 遺伝子が当該交雑体からクワコの集団に浸透し、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（ボンピコール）が同じため、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、交尾する可能性は考え難い。

また、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 *coxI* (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持つ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、極めてまれであると考えられる。

本申請では、本遺伝子組換えカイコを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。また、万一、成虫が発生したとしても本遺伝子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等から、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、本遺伝子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、上蔭から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、本遺伝子組換えカイコが成虫となって野外に放出されることは考え難く、日本国内に生息する野生のクワコと交雑する可能性は極めて低いと考えられた。

さらに、万が一、本遺伝子組換えカイコとクワコが交雑したとしても、当該雑種

は幼虫期に絹糸腺で緑色蛍光タンパク質を、眼で赤色蛍光タンパク質をそれぞれ発現するにすぎず、それらの発現が自然条件下において競合における優位性を高めることはないと予想されるため、当該雑種がクワコの集団において優占化するとは考え難い。

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、本遺伝子組換えカイコは、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。