

食品添加物の指定要請添付資料
Cryseobacterium proteolyticum 9670 株由来の
プロテイングルタミナーゼ

天野エンザイム株式会社

2006年9月22日
(2010年5月7日改定)

資料概要

目次

1. 名称	2
2. 用語の定義	2
3. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料.....	2
(1) 起源又は発見の経緯	
(2) 外国における使用状況	
(3) 関連酵素の自然界での存在	
(4) 類似既存食品添加物酵素との比較	
4. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料.....	4
(1) 本品の有効成分	(7) 純度試験
(2) 本品の有効成分の性質	(8) 微生物限度
(3) 組成	(9) 酵素活性測定法
(4) 製造方法	(10) 安定性
(5) 性状	(11) 食品中での分析方法
(6) 確認試験	(12) 成分規格案の設定根拠
5. 有効性に関する資料.....	8
(1) 食品添加物としての有効性	
(2) 他のたん白質脱アミド化方法との比較	
(3) 食品中での安定性	
(4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	
6. 安全性に関する資料.....	12
(1) 生産菌の安全性に関する検討	
(2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討	
(3) 毒性に関する資料	
(4) 体内動態に関する資料	
(5) 一日摂取量に関する資料	
7. 使用基準に関する資料.....	21
[図表 1~19]	22
[参考文献]	34
[添付資料 1] 生産菌の病原性試験（トキシン生産性試験を含む）	
[添付資料 2] プロテイングルタミナーゼ処理による大豆たん白質の泡沫特性に及ぼす影響	
[添付資料 3] プロテイングルタミナーゼ処理による卵白のゲル化特性に及ぼす影響	
[添付資料 4] 人工胃液、人工腸液による消化性試験	
[添付資料 5] 90 日間反復投与毒性試験	
[添付資料 6] 微生物を用いる復帰変異試験	
[添付資料 7] 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
[添付資料 8] げっ歯類を用いる小核試験	
[添付資料 9] 海外ガイドラインとの比較	
[添付資料 10] プロテイングルタミナーゼと連続 6 アミノ酸の一致が見られたアレルゲンたん白質の E-value 解析	
[添付資料 11] <i>Chryseobacterium</i> 属における本菌株の位置づけ	
[添付資料 12] 連続 6 アミノ酸一致部位の分析	
[添付資料 13] GRAS Notice No. GRN000267	
[添付資料 14] 2008 年 6 月以降に報告された <i>Chryseobacterium</i> 属の新菌種と本属に属す全 54 株の系統樹解析	
[添付資料 15] 加熱処理によるプロテイングルタミナーゼの免疫反応性の変化	
[添付資料 16] 成分規格案	

1. 名称

Chryseobacterium proteolyticum 9670 株由来のプロテイングルタミナーゼ
(Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*)

2. 用語の定義

本要請資料における「本品」、「原液」及び「製剤」の定義は下記のとおりとする。

- (1) 本品：今般、添加物指定を要請するもの。原液に製造助剤を加え粉末としたもので、製剤化する前の粉末。
- (2) 原液：粉末化して本品を製造する前の濃縮液であって、粉末化するための製造助剤(食品素材)を加える前の液。
- (3) 製剤：本品に希釈剤や安定化剤を加えたもの。

3. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

(1) 起源又は発見の経緯

本品は、食品添加物の酵素に分類されるものであり、食品たん白質中のグルタミン残基をグルタミン酸残基に変換する作用を有する。本品により、食品中のたん白質やたん白質素材の溶解性、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性（これらは「たん白質の機能特性」と呼ばれるが(文献 1)、生理的機能特性と区別するため、ここでは「たん白質の物理的機能特性」と呼ぶ。)を向上させることが出来る。

現在、カゼイン、カゼイネート、乳清たん白質、乳たん白濃縮物、乾燥卵白、大豆たん白質、小麦たん白質、コーングルテン、ゼラチンといった食品たん白質素材は、年間約 40 万トン生産若しくは輸入され(文献 2)、ハム・ソーセージ、パン、ケーキ、水産練り製品など様々な食品に利用されている。これらはそのまま利用されるほか、一部は、化学的(塩酸)処理や酵素(プロテアーゼ)処理され、ペプチドや調味料として食品加工に利用されている。これらの食品用たん白質の中で、近年安全で安心な食品素材として大豆、小麦、トウモロコシ、えんどう豆などの植物性たん白質に注目が集まっている。しかしながら、特に小麦グルテンやトウモロコシたん白質などは、その物理的機能特性が低く用途が限られている。

たん白質の物理的機能特性を向上させる改質方法として、脱アミド化、即ちたん白質中のグルタミン残基若しくはアスパラギン残基の側鎖のアミド基を加水分解することが、効果的な方法として知られていた(文献 3 及び 4)が、工業的に唯一実用化されているのは、コントロールされた条件下での塩酸加水分解のみであった。実際、少なくとも 10 年前より、塩酸加水分解により脱アミド化された小麦グルテンが流通している。しかしながら、この化学法では、ペプチド結合の切断や他のアミノ酸残基の修飾等の副反応が生じ、たん白質本来の栄養価や物理的機能特性が損なわれることが避けられない(文献 5)。また、塩酸によるたん白質の加水分解は、発がん性が疑われている塩素化合物モノクロロプロパンジオール(MCP)、ジクロロプロパノール(DCP)生成のリスクがある(文献 6)。そこで、安全かつ反応選択性の高い、酵素的手段によるたん白質の脱アミド化が長く待ち望まれていた(文献 7)。

本品は、このような状況のもとに、たん白質を選択的に脱アミド化する酵素として微生物からスクリーニングにより見出されたものである。本品は、筑波地方の田園土壌から単離された細菌 *Chryseobacterium proteolyticum* により菌体外に生産される(文献 8)。

(2) 外国における使用状況

本品は、日本で開発され商品化されようとしているものであるが、加工助剤の規制を実施しているフランス及びデンマークを除く欧州や GRAS 制度が導入されている米国においては既にプロモーション活動を開始している。現在では、欧米企業数社によって本品を使用した商品開発が進められており、最近になって欧州の企業へ本品の供給を開始した。また、本品の米国へのプロモーション活動として、米国 FDA への GRAS notification を行い、2009年7月15日に、FDA から notification に異議がない旨の回答があった〔添付資料 13〕。また、その一環として本生産菌の非病原性及び本品の安全性評価に関する論文を *Regulatory Toxicology and Pharmacology* に投稿し、出版された(文献 9)。なお、EU では、2008年に公布された新たな欧州議会・欧州理事会規則により、加工助剤たる酵素についても添加物としての規制の対象となる見込みである(文献 71)。

(3) 関連酵素の自然界での存在

本品の有効成分であるプロテイングルタミナーゼと同一の酵素はこれまでに我が国の食品中に見出されていないが、自然界でのたん白質の脱アミド化反応は、小麦、豆類、植物の発芽種子において知られている。多くの植物種子の貯蔵たん白質(穀類のプロラミン、豆類のグロブリン)は、グルタミン含量が高く、グルタミンのアミド基の窒素は、発芽時の窒素の供給源と考えられている。これら種子中の貯蔵たん白質は発芽中にまず脱アミド化されることにより、次に続くたん白分解酵素による分解を受け易くなることが知られている。(文献 10-12)。実際、発芽中の小麦、いんげん、かぼちゃの種子から、たん白質中のグルタミン残基を脱アミド化する酵素の存在が報告されている(文献 13 及び 14)。

また、近年食品加工用酵素として広く使用されている放線菌由来のトランスグルタミナーゼは、生体内も含め自然界に広くその存在が知られており、たん白質中のグルタミン残基とリジン残基間で架橋反応を触媒する酵素であり、反応系にリジンなどの1級アミンが存在しない場合、グルタミン残基を脱アミド化することが知られている(文献 15 及び 16)。

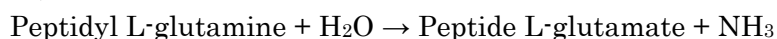
また他の微生物においては、細菌 (*Bacillus circulans*) の菌体内に、低分子のペプチド中のグルタミン残基を脱アミド化する酵素ペプチドグルタミナーゼが報告されている(文献 17)。この酵素は、高分子ペプチド(分子量 5,000 以上)、即ちたん白質に作用しない点が本品と異なる。従って、塩酸加水分解による脱アミド化たん白質あるいはトランスグルタミナーゼの副反応で生じた脱アミド化たん白質の食経験はあると考えられるものの、我が国においては、本品のような酵素により処理された脱アミド化たん白質の食経験はほとんどないものと考えられる。

(4) 類似既存食品添加物酵素との比較

現在、酵素は 69 品目が既存添加物名簿に記載されており、類似する酵素としては、「グルタミナーゼ」や「トランスグルタミナーゼ」が挙げられる。International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)の酵素分類によれば、「プロテイングルタミナーゼ」及び「グルタミナーゼ」は加水分解酵素、「トランスグルタミナーゼ」は転移酵素に分類される。「グルタミナーゼ」は遊離の L-グルタミンに作用するのに対し、「プロテイングルタミナーゼ」及び「トランスグルタミナーゼ」はたん白質及びペプチド中のグルタミン残基に作用する。詳細な反応様式は以下に示すとおりである。

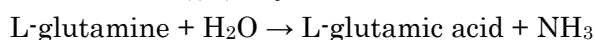
プロテイン-グルタミナーゼ(EC 3.5.1.44):

特性：たん白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン側鎖のアミド基を加水分解し、グルタミン酸残基に変換するとともにアンモニアを生成する。



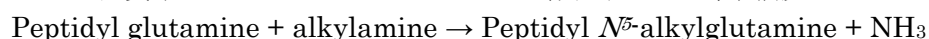
グルタミナーゼ(EC 3.5.1.2):

特性：L-グルタミンに作用し、L-グルタミンのアミド基を加水分解して、L-グルタミン酸とアンモニアを生成する。



トランスグルタミナーゼ(EC 2.3.2.13):

特性：たん白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン残基を他のアミノ基へ転移し、イソペプチド架橋を形成する。アミノ基非存在下では、H₂Oに転移する。この反応は加水分解反応であり、プロテイン-グルタミナーゼと同じ反応になるが、通常はたん白質中のリジン残基のε-アミノ基が存在するため、架橋反応が主である。



【3種の酵素の特徴比較】

酵素	反応	作用する基質		
		たん白質	ペプチド	遊離グルタミン
プロテイン グルタミナーゼ	加水分解反応 脱アミド	+++	++	±
グルタミナーゼ	加水分解反応 脱アミド	-	-	+++
トランス グルタミナーゼ	転移反応(主) 架橋	+++	++	-
	加水分解反応(従) 脱アミド	+++	++	-

4. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料

(1) 本品の有効成分

- 1) 一般名 : プロテイングルタミナーゼ (Protein-glutaminase)
- 2) 系統名 : プロテイングルタミナングルタミナーゼ
(Protein-glutamine glutaminase)
- 3) **Enzyme Commission No.** : EC 3.5.1.44 (鎖状アミド中のペプチド結合以外の C-N 結合に作用) (文献 18)
- 4) **CAS No.** : 62213-11-0

(2) 本品の有効成分の性質(文献 18 及び 19)

- 1) 反応様式 : たん白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン側鎖のアミド基を加水分解し、グルタミン酸残基に変換するとともにアンモニアを遊離する。その他に既知の反応(副反応)はない。
たん白質又はペプチド中の Gln + H₂O →
たん白質又はペプチド中の Glu + NH₃
- 2) 構造式 : 185 アミノ酸からなる単量体のたん白質で、糖鎖を含まない。アミノ酸配列及びアミノ酸組成を【図表 1、2】に示す。

- 3) **分子量** : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) では 20 kDa、アミノ酸組成から計算される分子量は 19,860 である。
- 4) **等電点** : 10.0
- 5) **基質特異性** : たん白質や長鎖ペプチドによく作用し、短鎖ペプチド、L-グルタミンにも作用する。それぞれの基質に対する動力学的パラメーターを【図表 3】に示す。また、各種たん白質に対する特異性を【図表 4】に示す。
- 6) **温度依存性** : 至適温度は 50~60℃。50℃ 1 時間処理で安定、70℃ 1 時間処理でほぼ完全に失活する。
- 7) **pH 依存性** : 至適 pH は 5~7。安定 pH は 5~9。
- 8) **阻害剤** : Ag⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、ヨードアセトアミド。

(3) 組成

本品は、*Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株の培養液から得られた有効成分を含む培養物とデキストリン等の食品素材との混合物である。製造助剤に由来する塩化ナトリウム等の塩類を含む。有効成分はプロテイングルタミナーゼである。

本品は、1g 当り 500 単位以上の力価を有する。JECFA の定めた方法(文献 72)により算定した、本品中の全有機固形物(Total Organic Solids: TOS)の含有率は 4.6% (w/w) である。

(4) 製造方法

本品の製造工程においては、マスター及びワーキングシードを用いたシードロットシステムにより管理された生産菌株 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株をバッチ法により液体培養し、次いで、除菌ろ過により菌体を除去し、限外ろ過により脱塩・濃縮後、イオン交換クロマトグラフィー等により精製した後、無菌ろ過を行う。無菌ろ過後のろ液を粉末化して本品とする。本品に賦形剤を添加し篩過・混合を行って製剤とする。本品の製造工程フローを【図表 5】に示す。除菌ろ過及び無菌ろ過を経ることにより、生産菌株のものを含むあらゆる菌体は除去される。本生産菌株は遺伝子組換え菌株ではなく、製造に使用される原料は食品素材又は食品添加物である。

(5) 性状

本品は、白~淡黄白色の粉末で、においがいいか又はわずかに特異なにおいがある。

(6) 確認試験

3. (10) 記載の酵素活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

(7) 純度試験

鉛 : Pb として 5.0 µg/g 以下 (2.0g、第 1 法)。

ヒ素 : As₂O₃ として 4.0 µg/g 以下 (0.50g、第 3 法、装置 B)。

(8) 微生物限度

微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1 g につき、細菌数は 50,000 以下である。また大腸菌、サルモネラは認めない。

(9) 酵素活性測定法

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリン (Cbz-Gln-Gly) を基質として本品を作用させ、生成するアンモニアをインドフェノール法により測定する。

(i) 試料溶液

操作法により試験するとき、アンモニアの増加が、試料濃度に比例する範囲の濃度になるように、本品に適量の 0.002% Triton X-100 を含む 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5) または水、他の適切な緩衝液、塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例、0.04~0.15 単位/mL である。

(ii) 基質溶液

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリン 1.011g を精密に量り、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加えて溶かし、正確に 100 mL とする。用時調製する。

(iii) アンモニア検量線

塩化アンモニウム 0.314 g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 1,000 mL とし、アンモニア標準液とする。この液 1 mL、0.9 mL、0.8 mL、0.7 mL、0.6 mL、0.5 mL、0.4 mL、0.3 mL、0.2 mL、0.1 mL を正確に量り、それぞれに水を加え、正確に 10 mL とする。それぞれのアンモニア溶液 1 mL は、アンモニア 10 µg、9 µg、8 µg、7 µg、6 µg、5 µg、4 µg、3 µg、2 µg、1 µg を含む。あらかじめ別に分注しておいた水 0.24 mL に、各アンモニア溶液を正確に 0.06 mL 加えてよく振り混ぜる。この液に、発色試液 A 0.3 mL を加え直ちに振り混ぜる。次いで、発色試液 B 0.15 mL を加え直ちに振り混ぜる。さらに、発色試液 C 0.3 mL を加え直ちに振り混ぜる。これを 37±0.5°C で正確に 20 分間放置した後、流水で冷却し、水を対象とし、波長 630 nm における吸光度を測定する。これより縦軸に各アンモニア溶液の吸光度、横軸にそれぞれの液のアンモニア濃度 (µg/mL) をとり、検量線を作成し、直線 (Y=aX) の傾き a を求める。

(iv) 操作法

試験管に試料溶液 0.1 mL を正確に量り、37±0.5°C で 1 分間加温する。これに、あらかじめ同温度で 10 分間加温した基質溶液を、正確に 1 mL 加えて直ちに振り混ぜて、反応を開始する。これを 37±0.5°C で正確に 10 分間反応させた後、トリクロロ酢酸溶液 1 mL を加えて直ちによく振り混ぜ、反応を停止させる。あらかじめ別に分注しておいた水 0.24 mL に、この溶液を正確に 0.06 mL 加えてよく振り混ぜる。この液に、発色試液 A 0.3 mL を加え直ちに振り混ぜる。次いで、発色試液 B 0.15 mL を加え直ちに振り混ぜる。さらに、発色試液 C 0.3 mL を加え直ちに振り混ぜる。これを 37±0.5°C で正確に 20 分間放置した後、流水で冷却し、水を対象とし、波長 630 nm における吸光度 (As) を測定する。

別に、試料溶液 0.1 mL を正確に量り、トリクロロ酢酸溶液 1 mL を加えて、37±0.5°C で 10 分間放置した後、基質溶液 1 mL を加えてよく振り混ぜ、以下同様に操作して、吸光度 (AsB) を測定し、次式により酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間にアンモニア 1 µmol に相当する吸光度の増加を与える酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g または単位/mL)} \\ = (A_S - A_{SB}) \times \frac{2.1}{0.1} \times \frac{1}{17.03} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{a} \times \frac{1,000}{W}$$

ただし、W：試料溶液 1 mL 中の試料の量 (mg, μl)

試薬・試液等

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミングリシン $C_{15}H_{19}N_3O_6$ (市販試薬)

0.002% Triton X-100 を含むリン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.2 mol/L) 第1液：リン酸一カリウム 27.22 g を量り、0.002% Triton X-100 を含む水を加えて溶かして 1,000 mL とする。第2液：無水リン酸二ナトリウム 28.39 g を量り、0.002% Triton X-100 を含む水を加えて溶かして 1,000 mL とする。第2液に第1液を加え、pH を 6.5 に調整する。

リン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.2 mol/L) 第1液：リン酸一カリウム 27.22 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。第2液：無水リン酸二ナトリウム 28.39 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。第2液に第1液を加え、pH を 6.5 に調整する。

トリクロロ酢酸溶液 トリクロロ酢酸 65.36 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。

発色試液 A フェノール 40.46 g、ペンタシアノニトロシル鉄 (III) 酸ナトリウム二水和物 0.15 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。遮光して 4℃以下で保存する。

発色試液 B 水酸化カリウム 49.94 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。4℃以下で保存する。

発色試液 C 無水炭酸カリウム 200.40 g、次亜塩素酸ナトリウム 8.33 mL を量り、水を加えて溶かして 1,000 mL とする。用時調製する。

次亜塩素酸ナトリウム NaClO 食品添加物次亜塩素酸ナトリウムを用いる。

(10) 安定性

本品は、活性を指標とした保存安定性において、4℃で6か月間安定である(社内データ)。

(11) 食品中での分析方法

本品は、6. で考察したとおり、使用基準を設定する必要がないと判断されるため、食品中での本品の定量法の設定は必要ないと考えられる。また、定性的に確認する方法の設定も困難である。

(12) 成分規格案の設定根拠

本品の成分規格は、食品添加物公定書 (第 8 版、2007 年) に収載されている 5 種の酵素 (パパイン、プロメライン、ペプシン、トリプシン、リゾチーム) の成分規格を参考に設定した [添付資料 16]。なお、純度試験のうち、鉛については、第 53 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会 (JECFA) において、食品添加物の重金属試験の規格項目を個別の重要な金属に対する適切な限度試験で置き換えるという方針が出され、第 57 回 JECFA 会議において、食品加工に使用される酵素剤の一般規格から、重金属、ヒ素の規格が削除され、鉛の限度規格が 10 mg/kg から 5 mg/kg に変更されたことから、これに基

づき設定した。ヒ素については食品添加物公定書に基づき設定した。また、微生物限度試験におけるサルモネラは JECFA の食品加工用酵素剤一般規格(文献 72)に準じて設定した。

5. 有効性に関する資料

(1) 食品添加物としての有効性

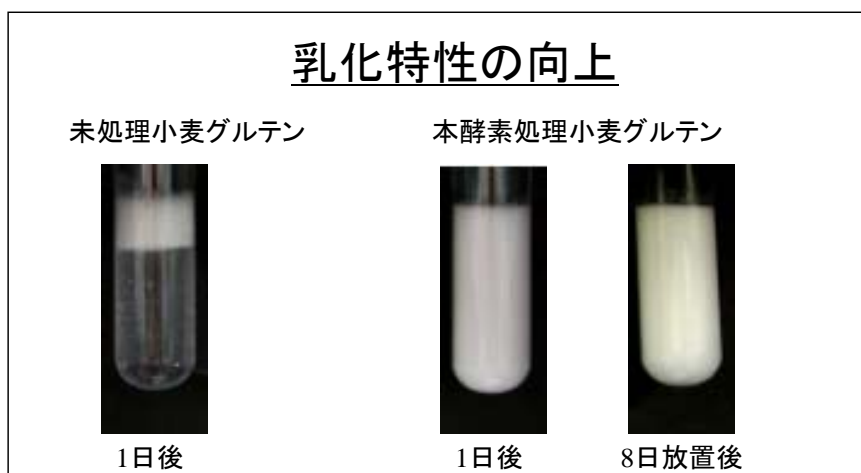
本品によりたん白質の物理的機能特性（溶解性、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性等）を向上させることが出来(文献 28-30)。以下に、本品の有効性を小麦グルテン、大豆たん白質、卵白アルブミンに作用させた例を示し説明する。

- 1) **溶解性の向上**：本品の処理により調製した脱アミド化小麦グルテンの溶解液と未処理小麦グルテンのそれと比較した。未処理小麦グルテンは、下図の写真左のように、通常の中性付近の pH 領域では水に殆んど溶けず粘着性の物質となり容器の壁面に付着する。一方、本品で処理を施した小麦グルテンは均一に分散溶解し、きれいな乳白色の溶液となる（写真右）(文献 31)。このことより、本品の処理により得られる脱アミド化たん白質は、発酵乳・乳酸菌飲料並びに茶、コーヒー・ココア及びその他の嗜好飲料に使用できる。



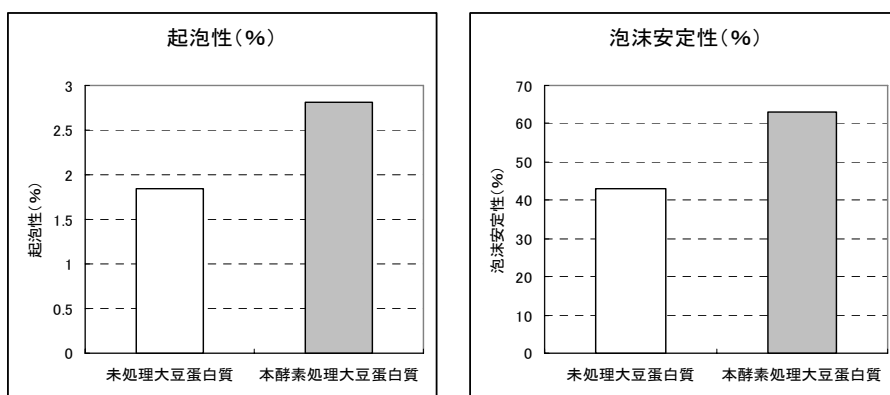
処理条件：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 中 10 mg/mL の小麦グルテン懸濁液に、小麦グルテンに対し 1.04%の本品を添加後、40℃、30 時間処理して、脱アミド化グルテン溶解液を得た。

- 2) **乳化特性の向上**：本品で処理した小麦グルテンとコーン油を用いて調製した乳化液を未処理小麦グルテンのそれと比較した。未処理小麦グルテンは、下図の写真左のように、通常の中性付近の pH 領域ではエマルジョンを形成できず水層と油層に分離してしまう。しかしながら、本品で処理を施した小麦グルテンは写真右のように、均一できれいなエマルジョンを形成できる。さらに本エマルジョンは、8 日間放置しても崩れることなく非常に安定である(文献 31)。このことより、本品の処理により得られる脱アミド化たん白質は、ケーキ・ペストリー類、ビスケット類、その他の乳製品、その他の乳類及び油脂類に使用できる。

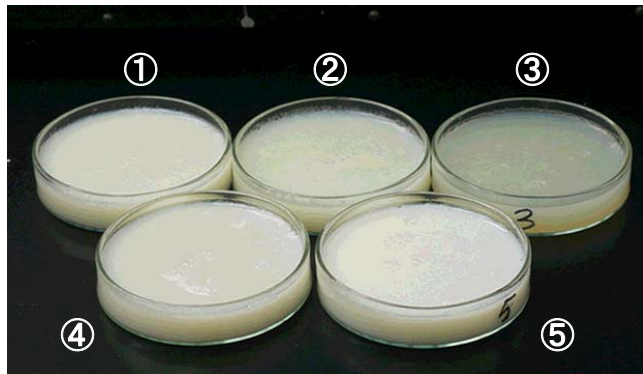


処理条件：4. (1) 1) で得た脱アミド化小麦グルテン溶解液を、0.1 mol/L 酢酸に対して透析後、凍結乾燥により得た脱アミド化小麦グルテン粉末及び対照として未処理小麦グルテン粉末各々の 0.09% 溶液に 10% のコーン油を添加し、激しく攪拌して乳化液を得た。

- 3) **泡沫特性の向上**：本品で処理した大豆たん白質と未処理の大豆たん白質の泡沫特性（起泡性及び泡沫安定性）を比較した。下図のように、本品で大豆たん白質を処理することにより、起泡性、泡沫安定性いずれにおいても向上させることができる〔添付資料2〕。本品の処理により得られる脱アミド化たん白質は、その他の乳製品及びビールに使用できる。



- 4) **ゲル化特性の向上**：本品で処理した卵白アルブミンと未処理の卵白アルブミンを熱処理して得られたゲルを比較した。次ページの写真のように、未処理の卵白アルブミンは、白色度が高い加熱ゲルを生ずる (①、②) に対し、本品で処理した卵白アルブミンは、半透明のゲルを形成する傾向にあり、その程度は添加酵素量に比例していた (③、④、⑤)。また、レオメーターによりゲル強度を測定したところ、本品で処理した卵白アルブミンは、未処理のものに比べより弾性のあるゲルを形成することができる〔添付資料3〕。これらのことより、本品の処理により得られる脱アミド化たん白質は、キャンデー類及びその他の菓子類に応用できる。また、本品をゼラチンに応用することにより、ゲル化特性の改善を通じ、キャンデー類及びその他の菓子類に応用できると考えられる。



5) **その他の有効性**：本品により脱アミド化することによりたん白質溶液中でのカルシウム溶解性が向上し(文献 32)、易吸収性高カルシウム飲料の開発に繋がる。また、本品により脱アミド化された小麦たん白質はアレルギー誘発性が低減し、低アレルギー化小麦食品の開発にも繋がる可能性がある(文献 31 及び 33)。その他にも農産物からたん白質の抽出効率の向上(文献 32)、たん白質分解酵素による分解率の向上(消化性の向上)(文献 32)、小麦グルテンのドウ(dough)の伸展性向上(文献 32)などが報告されている。

6) **有効性のまとめ**：下表に本品の有効性を示す例をまとめた。栄養価や栄養機能性が高いのにも関わらずその物理的な機能特性が低いために利用が制限されていた乳清たん白質、大豆たん白質などは、本品によって物理的機能特性を改良することにより様々な食品に利用することが可能となり、消費者の健康増進に寄与することが期待される。また、本品は将来の食糧危機が懸念されている状況で、有用たん白質資源の有効利用に寄与するものとして、消費者の利益に貢献することが期待される。

本品の各種食品たん白質素材に対する添加率は 0.5～2%(w/w)、各種食品に対しては、乳類を除く飲料においては 0.0001～0.001%(w/w)、その他の食品においては 0.002～0.02%(w/w)である。

食品たん白質素材	有効性	文献
乳清たん白質	カゼイン製造の際に生じる乳清たん白質は高栄養価で栄養機能性の高い食品素材であるが、その利用率は3%程度である。本品によって乳清たん白質の物性・機能特性を変え、様々な食品加工に応用できる。	28) 松村ら。 30) Gu et al.
コーングルテン (ゼイン)	コーン油・コーンスターチ製造の副産物であるゼインの溶解性向上。即溶性に優れたコーンスープ粉末製造に応用できる。	34) Yong et al.
小麦たん白質	不溶性グルテンの溶解性を向上させることにより、小麦グルテンの食品への用途が拡大される。	31) Yong. 32) 特許公報 特許第 3609648 号 35) US Patent 6756221
乾燥卵白	卵白の起泡速度の向上や卵黄の乳化安定性を向上させることにより、粉末卵白・粉末卵黄の品質を向上させることが出来る。その結果、粉末卵白・卵黄を、微生物汚染リスクの高い液卵の代替として用いることが可能となる。また、ゲル強度や透明度を向上させることが出来る。	35) US Patent 6756221 〔添付資料 3〕
大豆たん白質	高栄養価で栄養機能性の高い大豆たん白質の有効利用と用途拡大。大豆たん白質の溶解性・起泡性・乳化性を向上させ、豆乳飲料、機能性ペプチド製造に利用される。	32) 特許公報 特許第 3609648 号 〔添付資料 2〕 35) US Patent 6756221

(2) 他のたん白質脱アミド化方法との比較

たん白質を脱アミド化する方法は、既存添加物に位置付けられる酵素を用いた方法として①プロテアーゼによる方法(文献 36-38)、②トランスグルタミナーゼによる方法(文献 39-41)、③ペプチドグルタミナーゼによる方法(文献 42-44)が報告されている。しかしながら、これらの方法はいずれも、以下の理由により実用化は困難であった。①においては、たん白質が分解されて、本来目指すところのたん白質の機能特性が損なわれてしまう。②においては、トランスグルタミナーゼの本来の反応であるたん白質中のリジン残基とグルタミン残基との間の架橋反応を防ぐ為に、あらかじめリジン残基を化学修飾により保護して、脱アミド化後にその保護基をはずす必要があり、コスト的にも安全性の観点からも実用化が不可能であった。③においては、ペプチドグルタミナーゼは低分子ペプチドには作用するがたん白質に作用しない酵素であるため、あらかじめプロテアーゼによりたん白質を低分子化しておく必要があり、たん白質の機能特性が損なわれてしまうため実用的ではなかった。

物理化学的方法としては④高温での塩酸処理、⑤温和な条件でのアルカリ処理、⑥イオン交換樹脂による処理、などが報告されているが(文献 45)、唯一④の方法により、脱アミド化された小麦グルテンが市販されている (Amylum 社製「SWP100」、(株)片山化学工業研究所製「グルパール」)。そこで、以下に本品により得られた脱アミド化小麦グルテンと、SWP100 との、たん白質の機能特性の比較試験を行ったのでその結果のまとめを以下に示す。なお、以下に示す本品による脱アミド化グルテンは次の方法で製造した。20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 10 mg/mL の小麦グルテン懸濁液に、小麦グルテンに対して 0.4%の本品を添加し 37°Cで 24 時間処理し、70°Cで 60 分間熱処理を施した後、水に対して透析後、凍結乾燥して脱アミド化グルテン粉末を得た。

	溶解性 (pH 5~7)	乳化特性		泡沫特性	
		乳化性	乳化安定性	起泡性	泡沫安定性
本品による脱アミド化グルテン	良好	非常に良好	中	中	非常に良好
SWP100 (Amylum 社製)	中	中	良好	中	悪い

SWP100: Amylum Group (ベルギー) が販売している酸処理脱アミド化グルテン

このように、本品により得られた脱アミド化小麦グルテンの物理的機能特性は、溶解性、乳化特性、泡沫特性全般に渡って、中程度から非常に良好であるのに対し、酸処理により得られる市販脱アミド化グルテンは、溶解性と起泡性においては優れているが、乳化性、乳化安定性、泡沫安定性においてかなり劣っていた。

(3) 食品中での安定性

本品の有効成分であるプロテイングルタミナーゼは、食品又は食品たん白質素材の製造工程において、70°C60 分間以上若しくは 80°C10 分間以上の加熱処理を行った場合には、失活する。【図表 7】に失活条件に関するデータを示す。

(4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響

本品を使用した場合の食品成分の変化は、たん白質中のグルタミン残基のグルタミン酸残基への変換であり、他に既知の副反応はない。通常食品たん白質中のグルタミンの大部分は、胃酸存在下でグルタミン酸に変化していると考えられる。よって、本品により処理された食品を摂取しても、通常の食品を摂取した場合と栄養学的に大差はないと考えられる。なお、本来酵素は、他の物理化学的処理と異なり、特異性の高い触媒であり、反応条

件も常温付近（～50℃）、常圧であるため、たん白質以外の食品成分が変化することは考えにくい。さらに、食経験を通じて脱アミド化された食品の安全性に関する問題が指摘されたことはない。

6. 安全性に関する資料

(1) 生産菌株の安全性に関する検討

本生産菌株 *Chryseobacterium proteolyticum* 9670 株は、筑波地方の田園土壌から単離された基原微生物について、紫外線照射、次いで *N*-methyl-*N*'nitro-nitrosoguanidine を用いた伝統的な手法により変異させ、作製されている。生産菌株が非病原性であり、非トキシン生産性であることを確認するために、農林水産省農林水産技術会の研究成果「動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発」（文献 46）に記載の方法及び文献 47 に記載の方法に従って、生菌体懸濁液のマウス静脈内接種及び経口接種試験並びに生産菌株培養液上清及び生産菌株培養液菌体破碎後上清のマウス静脈内接種試験を行ったが、死亡例、体重推移の異常、生残菌は認められなかった。また、生産菌株培養液上清及び生産菌株培養液菌体破碎後上清中には毒性を発揮しうるような量のエンドトキシン（リポポリサッカライド）活性は検出されなかった〔添付資料 1〕。さらに文献検索の結果、本生産菌株を含む類縁菌においてトキシン生産性に関する報告はなかった。よって、本生産菌株は非病原性であると考えられた。

- 1) 分類学上の位置付け：本生産菌株の基原微生物は、筑波地方の田園土壌から単離された細菌であり、その表現型（非運動性、非芽胞形成性の好気性グラム陰性桿菌で、オキシダーゼ及びカタラーゼ陽性、fexirubin 型色素産生性）及び DNA 塩基配列に基づく解析（16S rRNA 遺伝子解析及び DNA-DNA ハイブリダイゼーション解析）から *Chryseobacterium* 属に属すると考えられたが、既に報告されていた他の *Chryseobacterium* 属の菌との鑑別（糖代謝能、発育温度、マッコンキー培地での発育、硝酸還元能、ウレアーゼ活性、インドール産生能、マロネート資化能）において一致せず、新種であることが判明し、*Chryseobacterium proteolyticum* と命名された（文献 8）。2006 年 4 月末時点で、*Chryseobacterium* 属において学術的に同定された種は本菌株を含め 15 種あった（注¹）。本菌株の単離が発表された 2000 年当時は、6 種（*C. meningosepticum*, *C. indologenes*, *C. gluem*, *C. balustinum*, *C. scophthalmum*, *C. indoltheticum*）が報告されており（文献 20）、その後、本菌株の他に 9 種（*C. defluvii*, *C. joostei*, *C. daecheongense*, *C. formosense*, *C. taichungense*, *C. shigense*, *C. vrystaatense*, *C. soldanellicola*, *C. taeanense*）が追加報告された。*C. meningosepticum* は、細胞壁脂肪酸組成及び 16S rRNA 遺伝子配列から作成される系統樹の上で離れた位置に存在しているため、最近になって別の属（*Elizabethkingia* 属）に改められた（文献 21）。*C. meningosepticum* は、日和見感染菌として知られた菌である。これら 15 種の分離源は自然界に多岐に渡っており、初期の分離源はクリニカル標本（*C. gluem*、*C. indologenes*）、淡水魚（*C. balustinum*）、海水（*C. scophthalmum*）、海底泥（*C. indoltheticum*）であったが、近年は土壌（*C. proteolyticum* 9670、*C. taichungense*）、活性汚泥（*C. defluvii*）、植物（*C. formosense*、*C. soldanellicola*、*C. taeanense*）の他、食品からも多く分離されている（文献 22）。食品からの分離源として牛乳（*C. joostei*）、鶏肉（*C. vrystaatense*）、日本の乳酸菌飲料（*C. shigense*）（文献 23）がある。DSMZ のリスク分類（<http://www.dsmz.de/>）では、初期に分離された *C. indologenes*、*C. gluem*、*C. scophthalmum* がリスク・グループ 2（注²）、*C. balustinum*、*C. indoltheticum* がグループ 1（注²）とされている。新しく分離された 10 種では、*C. defluvii*

と *C. joostei* がグループ 1 とされているが、その他の種は未だリスク分類はされていない。
【図表 6】に、本基原微生物と他の種を含む 16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹（文献 23 より）を、それらの分離源と DSMZ リスクグループとともに示す。

2006 年 4 月以降 2008 年 5 月までの 2 年余りの間に、*Chryseobacterium* 属にはさらに 21 種が新種として報告されている。従って 2008 年 6 月 23 日現在、本属には本菌株を含め計 36 種が報告されている。これらについて【添付資料 11】にまとめた。36 種の分離源は、土壌から 8 種、食品・飲料から 6 種、排水・汚泥から 4 種、植物（根・葉）から 4 種、ビール瓶詰工場から 4 種、魚類から 3 種、クリニカル標本から 3 種、海水・泥から 2 種、貯水・冷却水から 2 種である。DSMZ のリスクグループ分類においては、2008 年 6 月現在、2006 年 4 月以降報告された菌株のうち、報告の早いものを中心に 7 種（*C. taichungense*（土壌）、*C. shigense*（乳酸飲料）、*C. formosense*（レタス根）、*C. daecheongense*（淡水湖堆積物）、*C. soldanellicola*（ハマヒルガオ根）、*C. taeanense*（ハマニンニク根）、*C. caeni*（バイオリアクター沈積物））がリスクグループ 1 に追加されている。比較的最近報告された 21 種のうち、*C. Caeni* を除く 20 種については未だリスク分類はされていない。したがって、計 36 種のうち 11 種がリスクグループ 1、3 種がリスクグループ 2 とされ、本生産菌株を含む 22 種は未だリスク分類はされていない。【添付資料 11】の B、C には、本属における本基原微生物の分類学的位置づけを示すものとして、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹を最新の文献（2008 年 5 月、文献 61）及び新たに報告されたクリニカル標本由来の *C. hominis* が報告された文献（文献 62）から掲載した。本生産菌株はリスクグループ 2 の 3 種及び *C. hominis* とは離れた位置に存在することが判る。

以上、2008 年 5 月までに報告された 36 種のうち、2008 年 6 月以降 2010 年 3 月までにリスク分類 2 以上に分類されたものはない。

2008 年 6 月以降 2010 年 3 月までの間に、*Chryseobacterium* 属には、さらに 15 種が新種として報告され（文献 73-78）、また 4 種（*C. antarcticum*, *C. jeonii*, *C. marium* 及び *C. koreense*）が他属から *Chryseobacterium* 属に再分類されている。また、2008 年 5 月までに報告された 36 種のうち 1 種（*C. arothri*）は他の種（*C. hominis*）と同一であると報告されている。従って *Chryseobacterium* 属には、2010 年 3 月 6 日現在、54 種が報告されている。報告された 15 種の新菌の分離原は、植物の根から 4 種、南極大陸から 3 種、炭化水素汚染土壌から 2 種、工業汚染地堆積物から 2 種、昆虫等から 2 種、クリニカル標本から 2 種、生牛乳、氷床、小川、魚から各 1 種であった。【添付資料 14】。なお、新たに追加された 19 種のうち、DSMZ には 10 種が登録されているが、このうち 7 種は暫定分類（Provisional classification）でリスクグループ 1 とされており、残り 3 種については未だリスク分類はされていない。

本生産菌株は公的保存機関に寄託されていないためリスクグループ評価はされることはないが、分離源が土壌、排水・汚泥、植物根などのものがリスクグループ 1 とされている事例から鑑み、本生産菌株は、分離源が土壌であることに加え非病原性であることが確認され論文掲載されており（文献 9）、リスクグループ 1 とされる可能性は極めて高いと考えられる。

なお、2010 年 3 月までに DSMZ においてリスクグループ 2 とされている 3 つの菌種（*C. indologenes*, *C. gleum* 及び *C. scophthalmum*）のうち、*C. indologenes* については、人に感染し菌血症を起こすことがあると報告されているが、当該感染は、基礎疾患（糖尿病、

腫瘍、白血病等)を有する患者や、火傷、骨髄移植等により免疫能力が低下している患者に対してのものがほとんどであった(文献 79, 87-89)。 *C. gleum* については、クリニカル標本からの分離が報告されているものの(文献 22)、この菌種の病原性に関する知見は調べた限り見出されなかった。なお、これら 2 菌種は系統樹において本生産菌株とは離れた位置にある ([添付資料 14] のグループ D)。一方、 *C. scophthalmum* は、他の 2 菌種に比べ、本生産菌株と比較的近縁である ([添付資料 14] のグループ A)。 *C. scophthalmum* は、当初 *Flavobacterium scophthalmum* として海水及び海産魚から分離されたと報告されているが(文献 22)、調べた限り人から分離されたという報告はなかった。なお、 *C. indologenes* 及び *C. gleum* は ATCC においてもバイオセーフティレベル 2 となっているが、 *C. scophthalmum* のバイオセーフティレベルは 1 となっている(文献 84)。

本生産菌株は人から分離されたという報告がないことから、上述の DSMZ リスクグループ 2 とされた菌のような病原性をもつ可能性は低いと考えられた。

注 1 : 本生産菌株は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに FERM P-17664 (国際特許出願移行のために現在は独立行政法人産業技術総合研究所に BP-7351 として移管されている。)として寄託されているが、商業目的のため、第三者が自由に菌株を入手できるような公共の保存機関には寄託されていない。そのため、そのような公共保存機関への寄託を必要条件とする、学会の認める雑誌に収載できないため、本生産菌株名は現在のところ、公的に認められた菌株名となっていない。しかしながら、本菌株名は文献 21、23、61、62、73 及び 76 を始め多くの論文で *Chryseobacterium* 属のメンバーとして取り上げられている。

注 2 : DSMZ リスク・グループ及び ATCC バイオセーフティレベル分類

	DSMZ	ATCC
1	ヒトに疾病を起こし、あるいは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの。	健常人に対し疾患を起こさないもの。
2	ヒトあるいは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し重大な災害とならないもの、実験室内で暴露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。	人に疾患を起こし、まれに重篤な感染を起こすが、多くの場合予防や治療法があるもの。

- 2) 非病原性であること : 6. (1) に記載のように、本生産菌株が、非病原性であることはマスターシードの菌懸濁液のマウス静脈内接種及び経口接種試験により確認されている [添付資料 1]。即ち、本生産菌株の 1.3×10^9 CFU/body 経口接種及び 2.9×10^7 CFU/body 静脈内接種ではすべての検査項目、即ち一般状態観察、体重推移、生残菌数測定、剖検及び病理組織学的検査において異常はなかった。また、 2.9×10^7 CFU/body 静脈内接種では一般状態観察において一過性の自発運動の低下、うずくまり及び立毛が、病理組織学的検査においては肝臓の巣状壊死が認められたものの、いずれの接種試験でも死亡例、体重推移の異常、生残菌は認められなかった。一方、対照試験として同時に行った既知の病原性菌である *Pseudomonas aeruginosa* IFO3919 株の静脈内接種試験では、 1.1×10^7 CFU/body 接種で本菌に比べ重篤な所見が認められた。即ち、一般状態観察において持続性の立毛及び斜頸が認められ、10 例中 6 例の死亡、体重減少、用量依存的な生残菌が認められた。病理組織学的検査では生存 4 例の脳で髄膜炎、肝臓に巣状壊死及び腎臓で化膿性腎盂腎炎等が認められた。死亡 6 例では腎臓において、うっ血(5 例)や出血(4 例)の他に、

すべての例で生存例で認められたと同様に化膿性腎盂腎炎が認められた。なお、生産菌株で認められた肝臓の壊死は食経験のある一般的な細菌である乳酸菌株 (ATCC393) の静脈内接種においても認められている。

注 1: 上記のような菌体を実験動物に静脈内接種し症状観察、剖検及び病理組織学的変化によってその病原性を評価する方法は、JECFA による食品添加物の安全性評価(*Pseudomonas amyloclavata* 由来 Isoamylase)においても採用されている。

3) 非トキシン生産性であること：6. (1) に記載のように、本菌株が非トキシン生産性であることは、生産菌株培養液 (2.9×10^9 CFU/mL) 上清及び生産菌株培養液 (2.9×10^9 CFU/mL) 菌体破碎後上清のマウス静脈内接種試験により確認されている [添付資料 1]。即ち、生産菌株培養液上清接種群においては、一般状態において投与直後に一過性の自発運動低下、腹這い位及び立毛などの所見並びに病理組織学的検査において 10 例中 1 例に肝臓の巣状壊死が見られた。そのほか、死亡例はなく、体重及び剖検において異常は認められなかった。また、生産菌株培養液菌体破碎後上清接種群においては、生死及び一般状態観察、体重、剖検及び病理組織学的検査において異常は認められなかった。また、本生産菌株培養液中には 3~30 EU/mL (0.3~6.0 ng/mL 相当) のエンドトキシンが検出されたが、この濃度は飲水や茶中の濃度 (0.1~2.0 ng/mL 及び 0.4~53.3 ng/mL) と同程度であり、またこの濃度から計算されたマウスへの投与量は 1.5~30 ng/kg 体重となり、マウスにおける LD₅₀ 値 (9.2 mg/kg 体重あるいは 8.16 mg/kg 体重) に比べはるかに低く、毒性学的な意義を持たないと考えられた [添付資料 1]。エンドトキシンは、グラム陰性菌に属するある種の菌が産生し、血中投与時に発熱等の症状を引き起こす。従って、通常食品若しくは食品添加物のように経口摂取される場合においては問題にされないが、本基原微生物がグラム陰性菌であるため試験した。また、文献調査の結果でも、本基原微生物を含む類縁菌においてトキシン生産性に関する報告はなかった。即ち、Pariza と Johnson の論文 (文献 24) において推奨されている微生物トキシンに関する成書、*Bacterial Protein Toxins* (K.Aktories & I.Just eds, Springer-Verlag, 2000)、*Guidebook to Protein toxins and their use in cell biology* (R.Rappuoli & C.Montecucco, Oxford Univ. press, 1997)、*The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, second edition (J.E.Alouf & J.H.Freer eds, Academic press, 1999) には、本基原微生物を含む類縁菌においてトキシン生産性に関連する記述は見当たらなかった。また NCBI の PubMed (2006 年 4 月末現在) による文献検索においても、*Chryseobacterium* 属におけるトキシン生産性に関する報告はなかった。以上のように、マウスを用いたトキシン生産性に関する試験結果及び文献検索の結果、本生産菌株にトキシン生産に関する問題はないと考えられた。

補足: 本属の所属する科は *Flavobacteriaceae* Family であり、本科の属する目は *Flavobacteriales* Order である。本目 *Flavobacteriales* Order に属する科は他に 2 つあるが、これら 3 つの科に属する計 69 属 (2006 年 4 月 26 日現在の NCBI の Taxonomy Browser より) にまで検索範囲を拡大しても、アヒル病原菌として知られる *Riemerella anatipestifer* の産生する溶血因子 CAMP cohemolysin に関するもの一報 (文献 25) 及び、*Capnocytophaga canimorsus* においてその培養液ろ液が murine macrophage cell line J774 の増殖阻害、剥離を引き起こす現象に関するもの一報 (文献 26) の、合計 2 件のみであった。

- 4) **天野エンザイムでの使用状況**: 本生産菌株は、1997年土壌より単離されてから今日(2005年10月末)まで、天野エンザイム株式会社筑波研究所、中央研究所、岐阜研究所において、研究開発のために継続して培養されてきた。その間、岐阜研究所内での3LスケールのJar培養を130回延べ約1000バッチ、西春工場での800Lスケールのタンク培養を17回延べ約34バッチ、養老工場55kLスケールのタンク培養を3回3バッチ繰り返してきた。それに携わった従事者は20余名に及ぶが、本生産菌株の取り扱いに起因すると考えられる健康上の異変、異常所見は見られていない。
- 5) **類縁菌の食品分野での使用経験**: 文献27によれば *Chryseobacterium* 属に属する菌株では、*C. balustinum* 由来のプロテアーゼが、チーズフレーバー増強の目的で使用されてきた。

(2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討

元来酵素は、天然に存在するたん白質(アミノ酸のポリマー、糖や脂質等が結合している場合もある)であり、食品常在成分からなる物質である。本品の有効成分であるプロテイングルタミンナーゼも、【図表1】に示すアミノ酸組成からなることが明らかにされている。このことをより明らかにするため、衛化第29号「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の表2に従って、以下に試験及び考察を加えた。

- 1) **通常の使用条件下で、本品が容易に消化管内で分解して食品常在成分と同一になること**: 本品から有効成分プロテイングルタミンナーゼを精製したもの(以下「PG」という。)について、人工胃液による消化実験を行った【添付資料4】。消化実験に用いた人工胃液(Simulated Gastric Fluid, SGF)の組成はILSI(International Life Science Institute)のAllergy and Immunology Instituteの提案している国際バリデーション試験方法(文献48)に、人工腸液(Simulated Intestinal Fluid, SIF)の組成はUS Pharmacopia Ver. 28(文献60)に従った。【図表8】に示すように、人工胃液によるPGの分解は非常に速やかに行われ、pH1.2では反応開始後0.5分で、pH2.0では5分後に、PGのバンドが消失し分解産物もSDS-PAGEで確認できないほどに分解された。これは、PGが速やかにSDS-PAGE上で確認できないほどの大きさのペプチド、あるいはアミノ酸レベルにまで分解されることを示している。食品たん白質の中で、速やかに分解されるものとしてホウレンソウのRubisco、分解されにくいものとして卵白オボムコイド(図中のOvm)、非常に分解されにくいものとして牛乳のβ-ラクトグロブリン(図中のBLG)(文献48)を対照たん白質として用いた。PGは、速やかに分解されるRubiscoとほぼ同等の易分解性を示し、卵白オボムコイド、牛乳β-ラクトグロブリンは、これらに比べ分解性が非常に悪いことが示された。

また、人工腸液中での分解性も、他の食品たん白質Rubisco、卵白オボムコイドと同等の分解性を示した。以上の実験結果から、PGは消化管内で非常に速やかに分解され、食品常在成分と同一になることが示された。

- 2) **消化管内での分解に関わる主要な因子(pH、酵素等)が明らかであること**: 人工胃液によるPGの消化実験はILSIでの国際的バリデーションにおいて提案された試験方法に従っているが、その条件・因子は、pH1.2~2.0の酸性条件であること、及び0.075%ペプシンである。また、腸液(中性域)中のトリプシン、キモトリプシンも分解に関与している。【添付資料4】

- 3) 本品の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、本品の体内への吸収が食品成分と同程度であり、他の栄養成分の吸収を阻害しないこと：1) で示したとおり、PG は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来のたん白質と同じように体内へ吸収されると考えられる。また、他の食品由来のたん白質と同じように体内へ吸収されるため、糖質、ミネラル、ビタミンなどその他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はない。
- 4) 摂取された本品の未加水分解物又は部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されないこと。更に、未加水分解物又は部分加水分解物が生体組織中に蓄積しないこと：1) で示したとおり、PG は人工胃液内においては非常に速やかに分解され、未加水分解物、部分加水分解物は確認されない。よって、未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることも、生体組織中に蓄積する懸念もない。
- 5) 本品を使用した食品を摂取したとき、当該食品の主成分の過剰摂取の問題が起きないこと：本品を使用した食品たん白質の変化は、グルタミン残基のグルタミン酸残基への変換である。通常食品たん白質中のグルタミンの大部分は、胃酸存在下でグルタミン酸に変化していると考えられる。よって、本品により処理された食品たん白質を摂取しても、通常の食品たん白質を摂取した場合と栄養学的に大差はない。なお、本品のたん白質としての推定最大一日摂取量は、4.619 mg/人/日と、日本人のたん白質の平均一日摂取量(69.8 g/人/日)の 0.007%程度である。

補足 1：食品素材に添加する場合の本品由来たん白質摂取量は 175.574mg/人/日 x1.9%(PG 中の培養物由来蛋白含量)=3.336mg/人/日、食品に添加する場合の摂取量は 67.543mg/人/日 x 1.9%=1.283mg/人/日、合計 4.619mg/人/日 従って、 $4.619/69,800 \times 100 = 0.00661\%$

補足 2：グルタミン酸について、かつてそのナトリウム塩がチャイニーズレストラン・シンドロームとの関連を疑われたことがあったが、2000年に詳細に検討され、グルタミン酸ナトリウムばかりでなくグルタミン酸の過剰摂取と上記症状との関連性が否定され、グルタミン酸の一日許容摂取量 (ADI) は特定しないとされている(文献 49)。

(3) 毒性に関する資料

衛化第 29 号「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の IV 1. (1) では、「食品添加物の指定の要請に際しては、原則として、同指針の表 1 に示された資料を添付する。ただし、当該食品添加物が食品常在成分であるか又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかである場合には毒性に関する資料の添付を省略することができるが、げっ歯類の 28 日間反復投与毒性試験及び変異原性試験は添付することが望ましい。なお、上記ただし書に該当するか否かは、表 2 の事項について検討の上判断することが必要である。」とされている。

6. (2) において、衛化第 29 号の表 2 に従って検討した結果、本品の有効成分であるプロテイングルタミナーゼが他の食品たん白質と同様天然に存在するアミノ酸からなること、また人工胃液を用いた試験において消化管内で速やかに分解されることが示された。従って、衛化第 29 号 IV 1. (1) のただし書に従い下記の試験を実施した。なお、反復投与毒性試験は 28 日間に換えてより投与期間が長く、毒性学的知見の有無をより正確に得られる 90 日間とした。

- 1) **90 日間反復投与毒性試験**〔添付資料 5〕：厚生省ガイドライン (医薬審第 655 号, 1999) 及び食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針(衛化第 29 号, 1996)に従い、医薬品 GLP(1997)に準じて実施した。被験物質は、実生産スケールで製造された原液 (ロット PG-Y57-002@、本品換算濃度 253.8 mg/mL、549 単位/mL、TOS 0.93% (w/v)) と

し、その投与量は、0、25、50、100% (v/v) 溶液を 10 mL/kg 体重ずつとした。なお、各投与量は本品換算で 0、635、1,269、2,538 mg/kg 体重/日、TOS 換算で 0、23、46、93 mgTOS/kg 体重/日となる。各被験物質溶液は Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD(SD)IGS, 6 週齢, 12 匹/群/性] に 13 週間強制経口投与した。その結果、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学検査、血液学検査、血液化学検査、器官重量、剖検及び病理組織学検査のいずれにおいても被験物質による影響はみられなかった。尿検査では 2,538 mg/kg 投与群の雌でナトリウム及び塩素の排泄量の高値が見られたが、これらは被験物質に由来するナトリウム及び塩素(イオン交換クロマトグラフィー時の吸着・溶離に用いた酢酸ナトリウム及び塩化ナトリウム水溶液由来)の増加に伴う体液恒常性維持の結果と考えられた。以上の結果より、無毒性量は雌雄ともに本品換算で 2,538 mg/kg/日 (TOS 換算で 93 mgTOS/kg 体重/日) を上回ると判断された。

なお、反復投与毒性試験に用いた原液の活性から、本品の活性を単純に計算すると 2,163 単位/g (549 単位 x 10 mL / 2.538 g) となるが、実際には粉末化の際の活性低下により通常 1,000 単位/g 前後となり、変異原性試験において使用した本品 (ロット PGP2-030930、1,024 あるいは 1,015 単位/g) と同レベルとなる。

補足 1 : 対照群と最高用量群でのナトリウム及び塩素の摂取量

対照群	: ナトリウム 0.054mmol/kg、塩素 0.051mmol/kg
最高用量群(雌)	: ナトリウム 0.238mmol/kg、塩素 0.082mmol/kg

2) 変異原性試験

- a) 微生物を用いる復帰変異試験 [添付資料 6] : OECD ガイドライン (No.471, 1997) に従い、医薬品 GLP(1997)及び OECD GLP(1997)に準じて実施した。 *Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 及び *Escherichia coli* WP2uvr の 5 菌株を用い、実生産スケールで製造された本品 (ロット PGP2-030930、1,024 単位/g) 5,000 µg/plate を最高用量とし公比 2 で 5 段階 (313~5,000 µg/plate) について試験を実施した。本試験を 2 回繰り返した結果、いずれも代謝活性化の有無にかかわらず 5 菌株とも陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニーの増加は認められず陰性となった。
- b) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験 [添付資料 7] : OECD ガイドライン (No.473, 1997) に従い、医薬品 GLP(1997)及び OECD GLP(1997)に準じて実施した。チャイニーズ・ハムスター肺線腫由来株化細胞 (CHL/IU) を用い実生産スケールで製造された本品 (ロット PGP2-030930、1,024 単位/g)、50%の細胞増殖抑制が見られた用量を最高に 3 段階の用量について標本観察を実施した。即ち、短時間処理 (6 h) 非代謝活性化系では 213、425 及び 675 µg/mL、短時間処理代謝活性化系では 106、213、425 µg/mL、連続処理系 (24 h) は 63、125、250 µg/mL について標本を観察し、その結果、すべての試験系において染色体構造異常及び数的異常のいずれも増加せず陰性となった。
- c) げっ歯類を用いる小核試験 [添付資料 8] : OECD ガイドライン (No.474, 1997) に従い、医薬品 GLP(1997)及び OECD GLP(1997)に準じて実施した。CDI(ICR)マウス(雄)を用い、実生産スケールで製造された本品 (ロット PGP2-030930、1,015 単位/g) を 24 時間間隔で 2 回 (500、1,000 及び 2,000mg/kg) 経口投与後、骨髓細胞の塗抹標本を作製し小核を有する多染性赤血球数を計測した。その結果、いずれの

用量においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度は増加せず陰性となった。なお、小核試験に用いた被験物質たる本品の酵素活性が、復帰突然変異試験及び染色体異常試験の被験物質たる本品のそれと異なるのは、小核試験のみ後日（2006年、復帰突然変異試験及び染色体異常試験は2003年）実施されたため、被験物質の安定性を確認する目的で再度活性測定を行ったことによるものである。

なお、国際機関によって設定された食品用酵素剤一般に対するガイドラインにおける安全性に関する資料は、[添付資料9]の11ページに記載した。JECFAにおいては、SCF及び文献24等を引用しており、「げっ歯類を用いた90日間反復投与毒性試験」、「細菌による変異原性試験」、「染色体異常試験」、「一日摂取量に関する資料」、「基原微生物の安全性（生産菌は、非病原性、非毒素生産性であること）」が要求されている。

3) アレルギー誘発性に関する資料

本品のアレルギー誘発性評価は、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）（文献59）及び「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（文献80）に従って行った。本品は遺伝子組換え微生物を利用して製造されたものではないが、対象物質がたん白質であることより同基準に従うことが妥当と考えられた。

a) 既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較：調査に用いた Allergen Database for Food Safety (ADSF、国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)など5つのデータベース検索サイトを【図表9】に示した。これらは、ILSI-HESI(International Life Science Institute- Health and Environmental Sciences Institute)の Protein Allergenicity Technical Committee 報告書(Chapter 6, 2005年2月)（文献81）に記載されているものの中から、相同性検索機能を備えているサイトとして選んだ。検索基準として、6、7及び8アミノ酸の連続一致検索、80アミノ酸スライディングウインドウ検索（配列を80アミノ酸ごとに区切り、その中で35%以上の相同性を示すものの検索）を行った。

結果を【図表10】にまとめた。連続6アミノ酸の一致が3件見出されたが、連続7及び8アミノ酸ではヒットするものはどのデータベースにおいても無かった。また、80アミノ酸スライディングウインドウ検索でもヒットするものもなかった。

連続6アミノ酸でヒットした3件は、卵由来のオボムコイド (Gal d 1)、ラテックスアレルゲンであるゴムの木由来クラスIキチナーゼ(putative) (Hev b11.0101とそのアイソザイム Hev b11.0102)、*Aspergillus fumigatus* 由来の機能未知たん白質 (Asp f 9と Asp f16、両者は相同たん白質) であるが、これら三つのたん白質と本品との全体の相同性は認められなかった（【図表11～15】にそれぞれのアレルゲンとのマルチプルアライメントを示し、[添付資料10]にE-valueの検討結果を示す）。80アミノ酸スライディングウインドウ検索の結果からも局所的な相同性は認められなかったため、6アミノ酸の連続一致はノイズ（偶然の一致）の範囲内と判断できる可能性が高いと考えられた（下記注参照）。

一般にアレルギー反応は、抗原たん白分子が少なくとも2つ以上のIgE抗体と結合し、IgEレセプターを架橋することで起こると言われており、1分子のIgE抗体のみではアレルギー性反応を惹起できないとの報告がある（文献50）。現在のCodexガイドラインでは、この理由により一箇所のアミノ酸配列の一致は臨床的に意味をなさない、と報告されている（文献82）。本品の有効成分であるプロテイングルタミンナーゼに

においては、1種のアレルゲンにつき、連続6アミノ酸の一致が一か所しか見られなかった。従って、仮にその一か所に抗体が結合したとしてもアレルギー反応を誘発する可能性は無い若しくは非常に低いと考えられた。

このように、連続6アミノ酸の一致は、マルチプルアライメント、80アミノ酸スライディングウインドウ検索、E-value分析の結果から偶然の一致であると考えられ、また一種のアレルゲンにつき一ヶ所しか見られないことより、プロテイン-グルタミナーゼがアレルギー誘発性を有する可能性は無い若しくは極めて低いと考えられる。

補足：連続6アミノ酸の一致が見られた対象アレルゲンにおいて、推定されているエピトープとこれら連続6アミノ酸の一致箇所を分析した〔添付資料12〕。結果、ゴムの木由来のクラスIキチナーゼにおいては、エピトープとされるドメイン（ヘベイン様ドメイン）とは別の位置での一致であった。いくつかのグループでの研究報告をすべて総合すると、ほぼ全域がエピトープとされるオボムコイドにおいては、本連続6アミノ酸配列に推定エピトープが含まれていた。*Aspergillus fumigatus*由来の機能未知たん白質については、マイナーなアレルゲンであるためエピトープが推定されていない。

注：アミノ酸配列から *in silico* においてアレルゲン性を評価する試みは ILSI や International Food Biotechnology Council (IFBC) など国際的に広く行われており、1996年には「既知アレルゲンタンパクとの8以上連続したアミノ酸の一致」でアレルゲン性の疑いがあるとの論文(文献51)が発せられ、CODEX委員会による審査においては、8アミノ酸以上の一致を指標として安全性審査が行われている。一方で2001年、FAO/WHO 専門家会議は6アミノ酸以上の連続完全一致を指標として評価する指針としてアレルゲン性評価の判断樹 (decision tree) を設けた(文献52)。これは従来CODEXが指標としていた8アミノ酸を基準とした指標にかわって6アミノ酸連続完全一致を指標として採用している。アレルゲン性をアミノ酸の一次配列の一部の一致で評価することについては、1次配列で相同性が高くないにもかかわらず、3次元構造が類似している場合にアレルゲン性を示すことがあるという報告がある(文献54)。また、6アミノ酸連続完全一致を指標とする調査はノイズ (=アレルゲン性有無とは関係のない偶然の一致) が多いため偽陽性が出やすいという指摘がある(文献53)。2008年に報告された ILSI HESI の Protein Allergenicity Technical Committee のワークショップの議論では80アミノ酸スライディングウインドウ検索とともに8残基以上のアミノ酸配列の一致とを使用すべきではないかの指摘がなされている(文献83)。

- b) **人工胃液での分解実験：**6. (2) 1) で述べたように、SGF 及び SIF 中での分解実験の結果、PG は最も分解性の早いたん白質グループに分類され、人工胃液中では0.5分後に既に分解断片も検出されなかった。従って、本検討において、PG はアレルゲン性を有する可能性が低いと判断された。
- c) **加熱処理での免疫反応性変化：**PG を加熱処理(70 °C30分間及び100 °C10分間)し、未処理のものと同時に SDS 処理の後にウェスタンブロッティング解析を行ったところ、免疫反応性の変化は認められなかった。また、SDS 処理しないインタクトな PG についてのドットプロット解析又は ELISA では、その免疫反応性の変化は、たん白質の固相化が確実に行われていたのか否かについて証明できず、判断できなかった〔添付資料15〕。

以上の検討を総合的に判断し、本品の有効成分であるプロテイングルタミナーゼのアレルギー誘発性は極めて低い、と結論した。

(4) 体内動態に関する資料

6. (2) で考察したとおり、PG は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来のたん白質と同じように体内へ吸収されると考えられる。

(5) 一日摂取量に関する資料

本品は食品添加物として様々な食品に使用されることが推定されるが、使用方法は大きく分けて次の二通りがある。一つは、①食品たん白質素材を本品により脱アミド化して、得られた改質たん白質が各種加工食品に添加される場合、二つ目は②各種加工食品の製造工程に本品が添加される場合、である。①の食品たん白質素材には、カゼイン、カゼイネート、乳清たん白質、乳たん白濃縮物、乾燥卵白、大豆たん白質、小麦たん白質、コーングルテン及びゼラチンがある。本品が使用される食品(群)には、パン類、麺類等の小麦・加工品、ケーキ・ペストリー類等の菓子類、豆腐、油揚げ類等の大豆・加工品、魚介(練り製品)等の魚介加工品、ハム・ソーセージ類、チーズ等の牛乳・乳製品、ビール、茶等のアルコール飲料その他の嗜好飲料並びにしょうゆ等の調味料がある。

本品が使用される可能性のある食品(群)を図表 17 に掲げるものとし、当該食品(群)又はそれらの原材料のすべてに本品が図表 17 の最大添加率で添加され、添加された本品は全量がそのまま最終食品に移行して消費されるとした場合を想定し、平成 18 年国民栄養調査から得られる食品(群)の一人当たりの摂取量と、本品の最大添加率(乳類を除く飲料については 0.001%(w/w)、その他の食品(群)については 0.02%(w/w)とする。)から、本品の推定最大一日摂取量を求めたところ 3.107 mgTOS/人/日であった。この値を日本人の平均体重 50 kg で除すると、本品の推定一日摂取量は 0.062 mgTOS/kg 体重/日と計算された【図表 17】。また保守的な推計方法として budget 法による理論的最大一日摂取量を算定したところ、0.276 mgTOS/kg 体重/日であった【図表 18】。なお、参考までに、上記①の食品たん白質素材に添加するケースに限定されるが、生産量ベースの摂取量推計を行った。日本で流通している上記たん白質素材の全生産量(輸入量と生産量の和)が本品により処理され食品として消費された場合を仮定し、当該生産量と、本品の対たん白質素材最大添加率(2.0%(w/w)とする。)から本品の推定最大一日摂取量を求めたところ 8.076 mgTOS/人/日であった。この値を平均体重 50 kg で除すると、本品の推定一日摂取量は 0.162 mgTOS/kg 体重/日と計算された【図表 16】。

なお、本品によるナトリウム及び塩素の摂取量増加は、それぞれ 0.131 mg/人/日及び 0.112 mg/人/日と計算される。この値は日本人のナトリウム及び塩素摂取量のそれぞれ 0.0031%及び 0.0017%であり、ごくわずかである【図表 19】。

7. 使用基準に関する資料

6. (3) 1) より、原液に係る 90 日間反復投与毒性試験より評価された無毒性量(NOEL)は 93 mgTOS/kg 体重/日である。

一方、6. (5) で考察したように本品の推定一日摂取量は、0.062 mgTOS/kg 体重/日、budget 法による理論的最大一日摂取量は 0.276 mgTOS/kg 体重/日であり、上記 NOEL 93 mgTOS/kg 体重/日より十分に低い値であり、安全マージンはそれぞれ 1,500 及び 337 である。また、6. (2) 1) ~ 4) に記述したとおり、本品の有効成分であるプロテイングルタミンナーゼは消化管内で速やかに分解される。さらに本品は食品たん白質素材の改良若しくは食品の製造の際に加工助剤として用いられるものであり、過剰摂取の可能性は低いと考えられる。よって、使用基準は設定する必要は無いと判断した。

【図表1】

プロテイングルタミナーゼのアミノ酸配列（アミノ酸の一文字表記）

LASVIPDVATLNSLFNQIKNQSCGTSTASSPCITFRYPVD	40
GCYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVYGNLKASTGTCCVAW	80
SYHVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNA	120
CVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYRSPSNSYLYDNNLINTN	160
CVLTKFSLLSGCSPSPAPDVSSCGF	185

【図表2】

プロテイングルタミナーゼのアミノ酸組成

アミノ酸	残基数
Asp	7
Asn	16
Thr	13
Ser	27
Glu	2
Gln	4
Gly	11
Ala	15
Val	14
Met	2
Ile	8
Leu	12
Tyr	11
Phe	6
Lys	7
His	2
Arg	6
Pro	9
Trp	2
Cys	11
合計	185

【図表3】

プロテイングルタミナーゼの速度定数

基質	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
カゼイン	0.36	323.8	903.7
インシュリン B 鎖、酸化型	0.78	974.5	1250.4
Cbz-Gln-Gly	1.58	525.9	333.6
Gly-Gln-O-methyl	1.47	342.8	232.8
Gly-Gln-Gly	41.01	410.8	10.0
Phe-Gln-Gly-Pro	16.25	129.5	8.0
Gly-Gln-Pro-Arg	6.36	14.6	2.3
Cbz-Gln	14.50	120.7	8.5
Gly-Gln	155.20	275.0	1.8
Gln	99.75	36.2	0.36

【図表4】

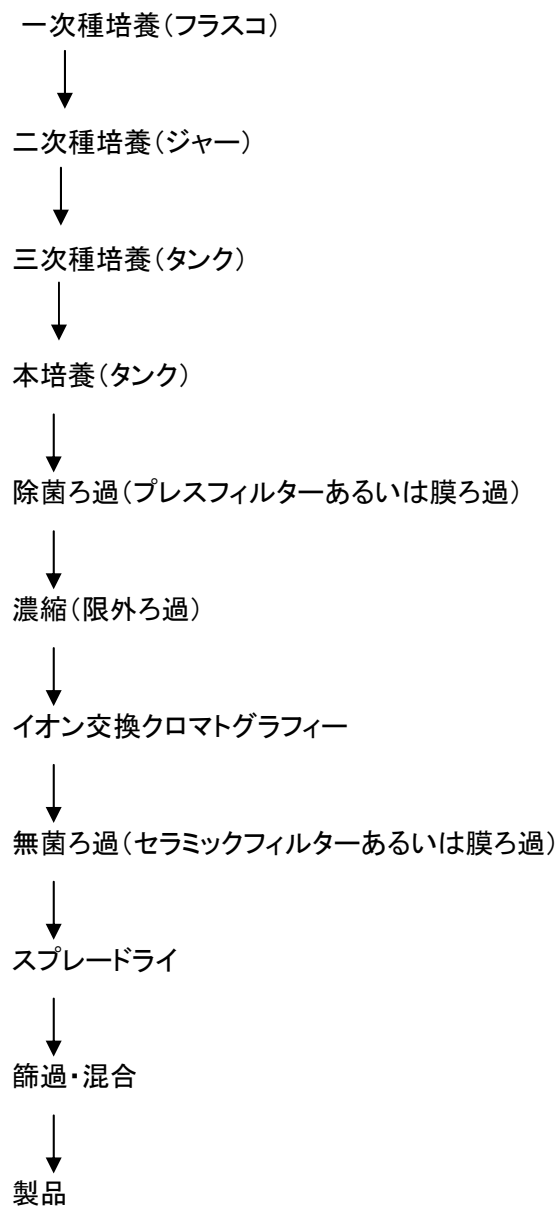
プロテイングルタミナーゼの各種蛋白質に対する反応性

蛋白質	比活性 ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{a)}$)	蛋白質	比活性 ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{a)}$)
α -カゼイン	19.12 \pm 0.51	トウモロコシゼイン	0.655 \pm 0.176
β -カゼイン	18.11 \pm 0.15	α -キモトリプシノーゲンA	0.650 \pm 0.118
小麦グルテン ^{b)}	7.200 \pm 0.333	アクチン	0.450 \pm 0.022
小麦グリアジン ^{b)}	5.473 \pm 0.017	アプロチニン	0.224 \pm 0.064
リボヌクレアーゼA	2.912 \pm 0.367	ニワトリ筋肉粉末	0.210 \pm 0.034
分離大豆蛋白質	1.170 \pm 0.064	コラーゲン (牛Type I) ^{b)}	0.177 \pm 0.017
α -ラクトアルブミン	0.836 \pm 0.009	ミオグロビン	0.014 \pm 0.001
β -ラクトグロブリン	0.728 \pm 0.001	血清アルブミン	0.009 \pm 0.001
ゼラチン (牛 Type B)	0.696 \pm 0.100	卵白オボアルブミン	0.005 \pm 0.002

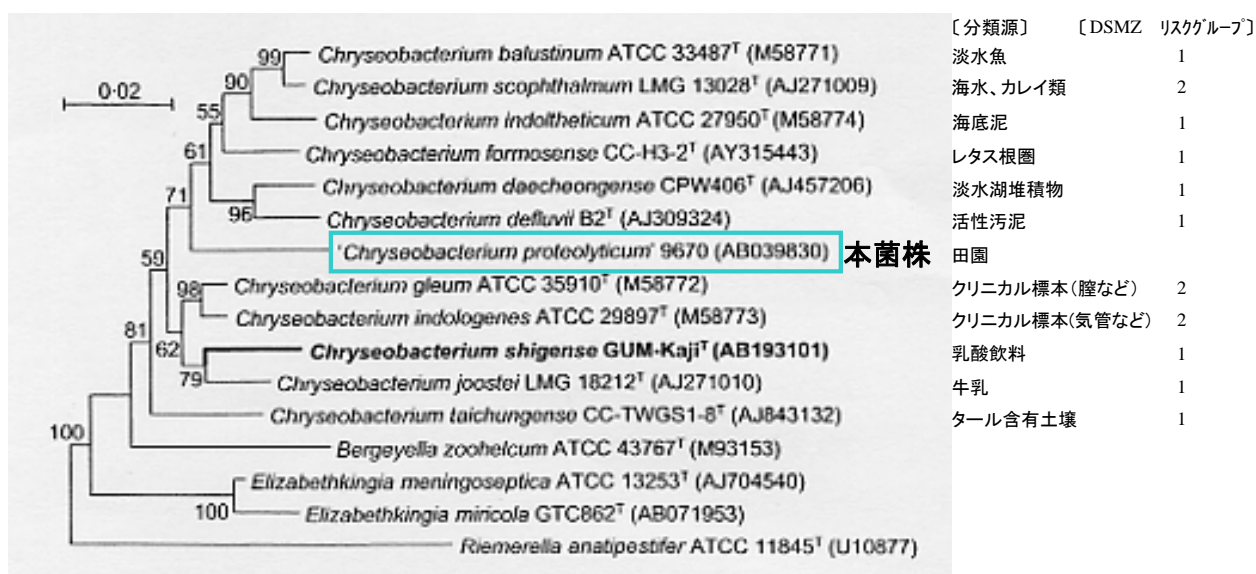
^a 3回の測定の平均値と標準偏差を示す。 ^b 反応開始時はサスペンション状態。

【図表5】

本品の製造方法



【図表6】 *Chryseobacterium* 属の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹(文献 23 より引用)

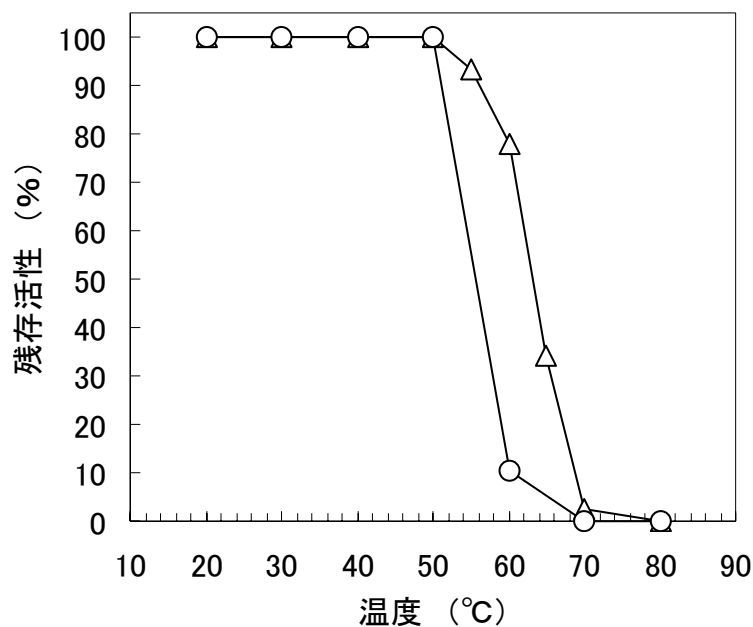


〔分類源〕は、文献 8、21、22、23 及びそれらに引用されている文献から記載した。〔DSMZ リスクグループ〕は、<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/chryseobacterium.html>から記載した。

【図表7】

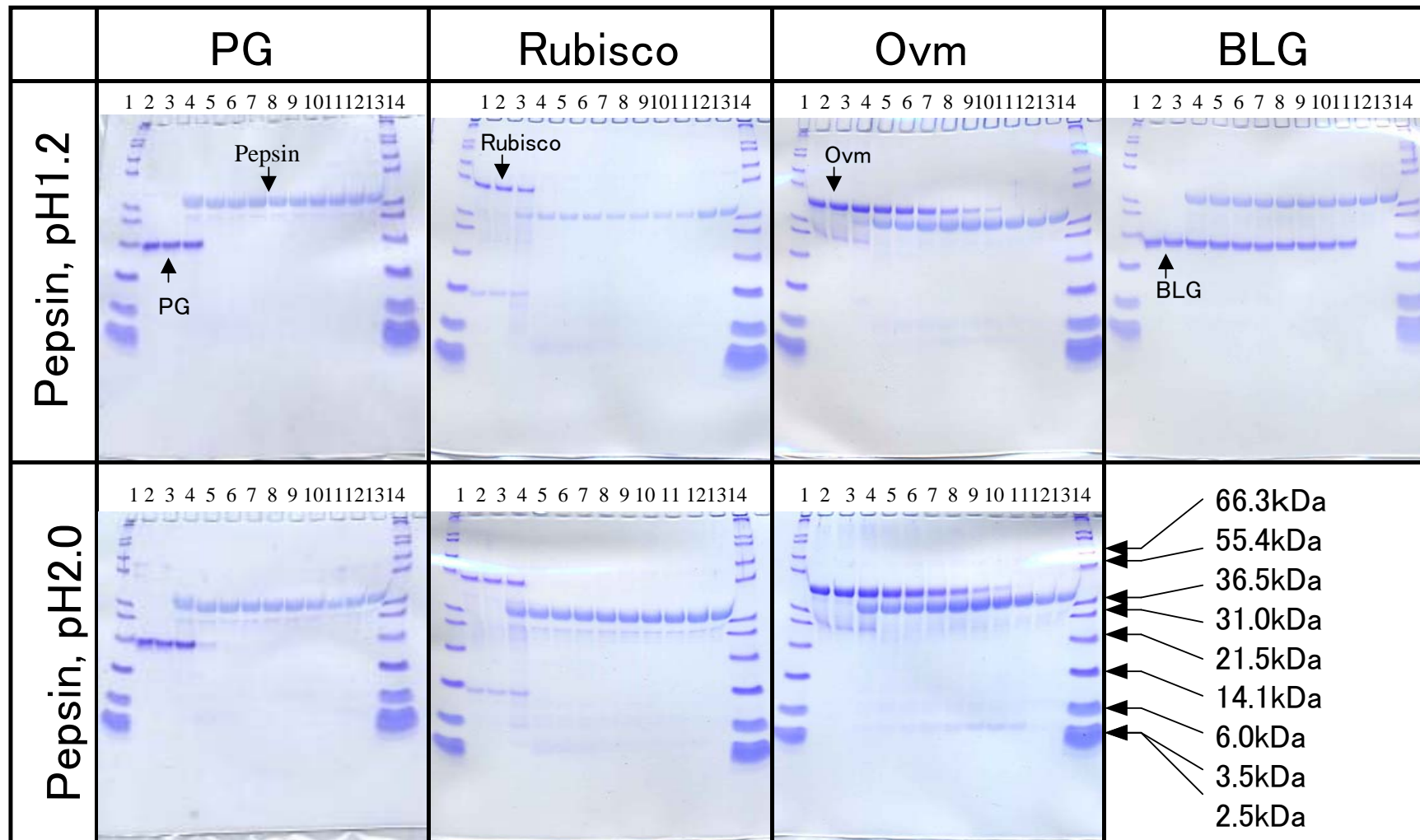
プロテイングルタミナーゼの温度安定性

50 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中、各温度で 10 分 (△)、60 分 (○) 処理後の残存活性を示す。



【図表8】

人工胃液消化試験の結果



レーン 1, 14 : 分子量マーカー

; レーン 2, 3 : 試験蛋白のみ、順に 0 分, 60 分

レーン 4~11 : 試験蛋白+ペプシン、順に 0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60 分

; レーン 12, 13 : ペプシンのみ、順に 0 分, 60 分

【図表9】

サイト名	URL
ADFS	http://allergen.nih.gov.jp/ADFS/
Allermatch	http://www.allermatch.org/
SDAP	http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_ver.tml
FARRP	http://www.allergenonline.com/
Allerpredict	http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/

【図表10】

検索実施日	データベースサイト名	検索結果				
		連続完全一致 アミノ酸数				80mer スライディング ウインドウサーチ (※2)
		8	7	6	6アミノ酸連続完全一致 したアレルゲンタンパク	
2006/4/28	Allergen Database for Food Safety (ADFS)	0	0	2 (1)	Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2006/4/28	AllerMatch	0	0	5 (3)	Asp f 9 : TSTASS Asp f 16 : TSTASS Gal d 1 : SSYANT Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2005/9/1 (※1)	Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)	0	0	5 (3)	Asp f 9 : TSTASS Asp f 16 : TSTASS Gal d 1 : SSYANT Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2006/4/28	FARRP	0	0	0		no hits
2006/4/28	AllerPredict	0	0	0	no hits	no hits

(※1) SDAPは2006年4月28日時点でサーチが実行できなかったため、過去のデータを載せた

(※2) 80mer Searchの結果は80mer以上で35%のidentityを示すものがないとき、no hitsと表記した

【图表 11】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase -----LASVIPDVA
Hev_b_11.0101 EQCGRQAGGALCPGGLCCSQYWCANTPEYCGSGCQSQCDDGGGGEDGGIDLGSIIS-RS
                                         *.*:*  :

Protein-glutaminase TLNSLFNQIKNQSCGTS-----TASSPC
Hev_b_11.0101 TFEEMLKHRNDAACPAKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTTGDVDTCKREIAAFFGQTSHTT
*:::~::~: :~* :.                                     *~:~.

Protein-glutaminase ITFRYPVDGCYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVY----GNLKASTGTCCVAWSY-----
Hev_b_11.0101 GGWPTAPDGPYAWGYCYKEELNQASSYCSPSPAYPCAPGKKYYGRGPIQLSWNYNYGQCG
: . ** ** .: :~* :. * . . * *: . * . :~*~*

Protein-glutaminase HVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAG---
Hev_b_11.0101 QALGLDLLNNDLVATDRVISFKAAIWFWMTPQFPKPSCHDVITGQWSPTGHDISAGRAP
:. * :~. * :~*~. . :~* :~* :. * . * :~:~*

Protein-glutaminase -----NVYYRSPSNSYLYDNNLINTNCVLTKFSLLSGCSPSPAPDVS---SCGF-
Hev_b_11.0101 GYGVITNIINGGLECGRWDARVEDRIGFYKRYCDMFAVGYGSNLDVCYNQTPFGLG
*: . . . :~* :~: . . :~:~. :~* . . * . * :~:

```

【图表 12】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase -----LASVIPDVA
Hev_b_11.0102 EQCGRQAGGALCPGGLCCSQYWCANTPEYCGSGCQSQCDDGGVGGEGGCVDLGSIIIS-RS
                                         *.*:*  :

Protein-glutaminase TLNSLFNQIKNQSCGTS-----TASSPC
Hev_b_11.0102 TFEEMLKHRNNAACPAKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTTGDVDTCKREIAAFFGQTSHTT
*:::~::~: :~* :~.                                     *~:~.

Protein-glutaminase ITFRYPVDGCYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVY----GNLKASTGTCCVAWSY-----
Hev_b_11.0102 GGWPTAPDGPYAWGYCHKEELNQASSYCSPSPAYPCAPGKKYYGRGPIQLSWNYNYGQCG
: . ** ** .: :~* :. * . . * *: . * . :~*~*

Protein-glutaminase HVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAG---
Hev_b_11.0102 QALGLDLLNNDLVATDRVISFKAAIWFWMTPQFPKPSCHDVITGQWSPTGHDISAGRAP
:. * :~. * :~*~. . :~* :~* :. * . * :~:~*

Protein-glutaminase -----NVYYRSPSNSYLYDNNLINTNCVLTKFSLLSGCSPSPAPDVS---SCGF-
Hev_b_11.0102 GYGVITNIINGGLECGSGWDARVEDRIGFYKRYCDMFAVGYGSNLDVCYNQTPFGLG
*: . . . :~* :~: . . :~:~. :~* . . * . * :~:

```

【图表 13】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase   ---LASVIPDVATLNS----LNFQIKNQSCGTS--TASSPCITFRYPVD-GCYARAHKMR
Ovomucoid              AEVDCSRFPNATDKEGKDLVLCNKDLRPICGTDGVTYTNDCLLCAYSIEFGTNIKEHDG
                        .* :*: : . : * : . ***. * :. * : * : : * . :
Protein-glutaminase   QILMNGYDCEKQFVYGNLKASTGTCCVAWSYHVAIIVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSG
Ovomucoid              ECKETVPMNCSS---YANTTSEDGKVMVLCNRAFNPVCGTDGVT-YDNECLLCAHKVEQG
                        : . . :*.. *. * . : . . : . . . : : : : . . . *
Protein-glutaminase   PVTDTAWRNACVNTSCG-SASVSSYANTAGNVYYRSPNSYLYDNNLINTNCVLTKFSL
Ovomucoid              ASVDKRHDGGCRKELAAVSVDCSEYKPDCTAEDRPLCGS---DNKTYGNKCNFCNAVVE
                        . . *. . . * : . . *.. *. * : . . * . . * ** : . : * : : :
Protein-glutaminase   SGCSPSPAPDVSSCGF
Ovomucoid              SNGTLTLS-HFGKC--
                        * . : : : . . . *

```

【图表 14】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase   -----LASVIPDVATLNSLNFQIKNQSCGTS-----TAS
Asp_f_9                KRSFILRSADMYFKYTAALAAVLPLCSAQTWSKCNPLEKTCPPNKGLAASTYTADFTSA
                        **:*:* : : . : : : * . . ** :
Protein-glutaminase   SPCITFRYPVDGCYARAHKMRQILMNG----YDCEKQFVYGN----LKASTGTCCVA--
Asp_f_9                SALDQWEVTAGKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSI
                        * . : . . . . . : . : : * * : * : * : * : * : * : * :
Protein-glutaminase   -----WSYHVAIIVSYKN
Asp_f_9                VLESDDLDEVDWEVLGGDTTQVQNTNYFGKGDTTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYTIDWTKD
                        : : * . : * :
Protein-glutaminase   ASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYR-----
Asp_f_9                AVTWSIDGAVVRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGSWAGGDPSNPKGTIEWAGGLTDYSA
                        * : . : : * . . . * : : : . ** : . . : * . * : :
Protein-glutaminase   -----SPSNSYLYDNN-----LINTNCVLTKFSLSGCSPSPAPDVSS
Asp_f_9                GPYTMVVKSVRIENANPAESYTYSDNSGSWQSIKFDGSVDISSSSSVTSSTTSTASSASS
                        . * : * * * . : * : : : . . : : . * : : : : * . . . * *
Protein-glutaminase   CGF
Asp_f_9                TS-
                        .

```

【图表 15】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase      -----LASVIPDVATLNSLFNQIKNQSCG-----TSTASSPCITFRYPVDGCYARA
Asp_f_16                 MYFKYTAAALAAVLPLCSAQTWSKCNPLAETCPPNKGLAASTCTADFTSASALDQWEVTA
                          **:*:*  :.  :  ::*  :*:.  :  :*  .:*  . *

Protein-glutaminase      HKMRQILMNNGYDCEKQ-----FVYGN----LKASTGT-----
Asp_f_16                 GKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSIVLESDDLDEV
                          *:      .  :  **      *.:*  :  :*:.**

Protein-glutaminase      -----CCVAWSYHVAI
Asp_f_16                 DLVRLGGDTTQVQTNYFGKGDTTTYDRGTYVPVATPQETFHTYTIIDWTKDAVTSIDGAV
                          .:*:*  .  *:

Protein-glutaminase      L--VSYKNASG-----VTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRN-----
Asp_f_16                 VRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLAAGPAATPATPGHHRVGRWLDRLQRGTVHHVVRQVRP
                          :  :*:*:*.*  *  *:  .:  :*  .*  *

Protein-glutaminase      -----ACVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYRSPSNSYL
Asp_f_16                 YRERQPRRVLHLLGQLWLLAEHQVRRRLRYSSTSSVTSTTSTASSASSTSSKTPSTSTL
                          .:*  .:*:*  *.:*...  :*:*  *

Protein-glutaminase      YDNNLINTN-----CVLTKFSLLSGC
Asp_f_16                 ATSTKATPTPSGTSSGSNSSSSAEPTTTGGSGSNTGSWLRLRLWLWLYSSTGSSTAGAS
                          ..  ...  *  *  :*.

Protein-glutaminase      SPSAPDVSSCGF-----
Asp_f_16                 SATPELSQGAAGSIKGSVTPALWCSAPSLPCWHSKQNDDFGLMHDTHHEGDVRTIHFGIG
                          *.:*  .  .:.*

Protein-glutaminase      -----
Asp_f_16                 VSPSFGV
  
```

【図表16】

本品の推定一日摂取量の算出

(食品たん白質素材生産量ベースの推計)

	a たん白質素材の年間 輸入量・生産量	b たん白質素材の 国民一人あたり 一日の消費量 (aX1,000,000/ 127,692,000 ⁵⁾ /365)	c 本品 最大添加率	d 本品 一日摂取量 (bxc/100x1000)	e 本品 由来TOS 一日摂取量 (dx0.046)	f 本品 由来TOS 一日摂取量 (e/50)
	トン/年	g/人/日	対たん白質素材%	mg/人/日	mgTOS/人/日	mgTOS/kg体重/日
カゼイン ¹⁾	6,440	0.138	2.0	2.763	0.127	0.003
カゼイネート ¹⁾	9,265	0.199	2.0	3.976	0.183	0.004
乳清たん白質 ¹⁾	8,660	0.186	2.0	3.716	0.171	0.003
乳たん白濃縮物(TMP, MPC等) ¹⁾	8,551	0.183	2.0	3.669	0.169	0.003
乾燥卵白 ¹⁾	9,555	0.205	2.0	4.100	0.189	0.004
大豆たん白質 ²⁾	42,672	0.916	2.0	18.311	0.842	0.017
小麦たん白質 ²⁾	22,158	0.475	2.0	9.508	0.437	0.009
コーングルテン ³⁾	292,400	6.274	2.0	125.473	5.772	0.115
ゼラチン ⁴⁾	9,453	0.203	2.0	4.056	0.187	0.004
合計				175.574	8.076	0.162

1)たん白・ペプチド素材の市場動向「食品と開発」VOL.44 No.8 (2009) その出典は、財務省貿易統計(<http://www.customs.go.jp/toukei/srch>)

2)平成20年度大豆系および小麦系蛋白質生産量、(財)日本植物蛋白食品協会・植物性たん白(食品)の生産、出荷統計(<http://www.protein.or.jp/pdf/seisan>)

3)平成20年度食品用とうもろこし輸入量(340万t)とたん白質含量(8.6%)から算出、日本スターチ糖化工業会(<http://www.starch-touka.com/>)

4)平成20年度ゼラチン販売数量、日本ゼラチン・コラーゲンペプチド工業組合⁸⁵⁾

5)国民総人口:総務省統計局 統計データ「平成20年10月1日現在推計人口」(<http://www.stat.go.jp/data/jinsui/2008np/index.htm>)

【図表17】

本品の推定一日摂取量の算出

(加工食品の製造工程で添加される場合)

	a 一日食品摂取量 ¹⁾	b 本品 最大添加率	c 本品 一日摂取量 (axb/100x1,000)	d 本品 由来TOS 一日摂取量 (cx0.046)	e 本品 由来TOS 一日摂取量 (d/50)
	g/人/日	%	mg/人/日	mgTOS/人/日	mgTOS/kg体重/日
小麦粉類	4.2	0.020	0.840	0.039	0.0008
パン類(菓子パン除く)	30.0	0.020	6.000	0.276	0.0055
菓子パン類	6.0	0.020	1.200	0.055	0.0011
うどん、中華めん類	38.4	0.020	7.680	0.353	0.0071
即席中華めん	4.3	0.020	0.860	0.040	0.0008
パスタ類	8.0	0.020	1.600	0.074	0.0015
その他小麦加工品	4.9	0.020	0.980	0.045	0.0009
豆腐	35.2	0.020	7.040	0.324	0.0065
油揚げ類	8.2	0.020	1.640	0.075	0.0015
その他の大豆加工品	3.5	0.020	0.700	0.032	0.0006
魚介(練り製品)	9.8	0.020	1.960	0.090	0.0018
魚肉ハム・ソーセージ	0.5	0.020	0.100	0.005	0.0001
ハム・ソーセージ類	12.4	0.020	2.480	0.114	0.0023
チーズ	2.3	0.020	0.460	0.021	0.0004
発酵乳・乳酸菌飲料	21.3	0.020	4.260	0.196	0.0039
その他の乳製品	8.2	0.020	1.640	0.075	0.0015
その他の乳類	0.1	0.020	0.020	0.001	0.0000
油脂類	10.2	0.020	2.040	0.094	0.0019
ケーキ・ペストリー類	7.2	0.020	1.440	0.066	0.0013
ビスケット類	1.7	0.020	0.340	0.016	0.0003
キャンデー類	0.3	0.020	0.060	0.003	0.0001
その他の菓子類	6.0	0.020	1.200	0.055	0.0011
ビール	58.6	0.001	0.586	0.027	0.0005
茶	310.1	0.001	3.101	0.143	0.0029
コーヒー・ココア	118.1	0.001	1.181	0.054	0.0011
その他の嗜好飲料	97.5	0.001	0.975	0.045	0.0009
しょうゆ	17.5	0.020	3.500	0.161	0.0032
マヨネーズ	3.2	0.020	0.640	0.029	0.0006
味噌	12.4	0.020	2.480	0.114	0.0023
その他調味料	56.9	0.020	11.380	0.523	0.0105
合計	892.8		67.543	3.107	0.062

1)厚生労働省平成18年国民健康・栄養調査報告⁵⁸⁾

【図表 18】

Budget method による本品の理論的 maximum 一日摂取量

① 固形食品

$$1\text{kg 食品} \times 0.020\%^{(1)} \times 4.6\%^{(2)} / 40^{(3)} \times 1000000 = 0.230 \text{ (mgTOS/kg 体重/日)}$$

② 飲料

$$1\text{L 飲料} \times 0.001\%^{(4)} \times 4.6\% / 10^{(5)} \times 1000000 = 0.046 \text{ (mgTOS/kg 体重/日)}$$

③ 理論的 maximum 一日摂取量

$$0.230 + 0.046 = 0.276 \text{ (mgTOS/kg 体重/日)}$$

1) 本品の maximum 添加率(飲料を除く)

2) TOS %

3) Budget method における係数(添加物が主要食品に添加される場合)

4) 本品の maximum 添加率(飲料)

5) Budget method における係数(添加物が乳を除くすべての飲料に添加される場合)

【図表 19】

本品摂取によるナトリウムおよび塩素の摂取量増加

本品のナトリウムおよび塩素含量¹⁾

Lot	ナトリウム(mg/g)	塩素(mg/g)
	2.11	1.48
	1.76	1.84
平均	1.935	1.66

本品に由来するナトリウムおよび塩素摂取量

本品の推定最大一日摂取量 (67.543mg/人/日)²⁾ より、

ナトリウム : $1.935 \times 67.543 / 1000 = 0.131$ (mg/人/日)

塩素 : $1.66 \times 67.543 / 1000 = 0.112$ (mg/人/日)

日本人の全ナトリウム(4200mg/人/日)摂取量および全塩素摂取量(6600mg/人/日)³⁾に占める本品の割合

ナトリウム : $0.131 / 4200 \times 100 = 0.0031$ (%)

塩素 : $0.112 / 6600 \times 100 = 0.0017$ (%)

1) (財)日本食品分析センター

2) 図 17 の c

3) 平成 18 年国民栄養調査における食塩相当量(10.8g)より算出

[参考文献]

- 1) 「新しい食品蛋白質の開発と実用化」(1985) 食品蛋白質応用開発研究会編、向文堂、〔1〕食品蛋白質の構造と物性 pp. 23-38.
- 2) 「たん白・ペプチド素材の市場動向」(2006) 食品と開発 VOL. 41, No. 7, pp. 36-44.
- 3) Riha III, W.E., Izzo., H.V., Zhang, J. & Ho, C.-T. (1996) Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **36**, 225-255.
- 4) Hamada, J.S. (1994) Deamidation of food proteins to improve functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**, 283-292.
- 5) 「新・食品分析法」(1996) 日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編、光琳、pp. 496-497.
- 6) Is HAP safe? *Ingredient*, October 1989, pp.67,69.
- 7) Schwenke, K.D. (1997) Enzyme and chemical modification of proteins in *Food Proteins and Their Applications* (Damodaran, S, and Paraf, A., eds) pp. 393-423, Marcel Dekker, New York.
- 8) Yamaguchi, S. & Yokoe, M. (2000) A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3337-3343.
- 9) Scheuplein, R.J, Mizutani, A., and Yamaguchi, S. (2007) Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: Protein-glutaminase. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 49(2):79-89
- 10) Daussant, J.M., Neucere, N.J. & Conkerton, E.J. (1969) Immunochemical studies on *Arachis hypogaea* proteins with particular reference to the reserve proteins. II. Protein modification during germination. *Plant Physiol.* **44**, 480-484.
- 11) Kumar, K.G., Vencataraman, L.V. & Appu Rao, A.G. (1980) Chickpea seed proteins: Conformational changes in 10.3S protein during germination. *J. Agric. Food Chem.* **28**, 518-524.
- 12) Kumar, G.N., Houtz, R.L. & Knowles, N.R. (1999) Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubes. *Plant Physiol.* **119**, 89-99.
- 13) Vaintraub, I.A., Kotova, L.V. & Shaha, R. (1992) Protein deamidase from germinating wheat grains. *FEBS Lett.* **302**, 169-171.
- 14) Vaintraub, I.A., Kotova, L.V. & Shaha, R. (1996) Protein deamidases from germinating seeds. *Physiol. Plantarum.* **96**, 662-666.
- 15) Mycek, M.J. & Waelsch, H. (1960) The enzymatic deamidation of proteins. *J. Biol. Chem.* **235**, 3513-3517.
- 16) 「産業用酵素」(1995) 上島孝之、丸善、3.2.6 食品機能の改良[トランスグルタミナーゼの利用] pp.40-42
- 17) Kikuchi, M., Hayashida, H., Nakano, E. & Sakaguchi K. (1971) Peptidoglutaminase.

- Enzymes for selective deamidation of γ -amido of peptide-bound glutamine. *Biochemistry* **10**, 1222-1229.
- 18) Yamaguchi, S., Jeens D.J. & Archer, D.B. (2001) Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. Purification, characterization and gene cloning. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1410-1421.
 - 19) 天野エンザイム株式会社 社内報告書 AIS No.01-28480
 - 20) Vandamme, P., Bernardet, J.-F., Segers, P., Kersters, K., Holmes, B. (1994) New perspectives in the identification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **44**, 827-831.
 - 21) Kim, K.K., Kim, M.K., Lim, J.H., Park, H.Y., & Lee S.T. (2005) Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, May; **55**(Pt 3), 1287-1293.
 - 22) Jooste, P.J., & Hugo, C.J. (1999) The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family Flavobacteriaceae. *J. Food Microbiol.* **53**, 81-94.
 - 23) Shimomura, K., Kaji, S., & Hiraishi, A. (2005) *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Sept; **55**(Pt 5), 1903-1906.
 - 24) Pariza M.W., & Johnson E.A. (2001) Evaluation the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **33**, 173-186.
 - 25) Creata, K.C., Chua, K-L., Subramaniam, S., Frey, J., Loh, H., & Tan, H-M. (2002) Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *J. Bacteriol.*, **184**, 1932-1939.
 - 26) Fischer L.J., Weyant R.S., White E.H., Quinn F.D. (1995) Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. *Infect Immun.* Sep;**63**(9):3484-90.
 - 27) Encyclopedia of food microbiology, Robinson (2000) R., Batt, A.C. & Patel P.D. eds., Academic Press. pp.820-826.
 - 28) 松村泰生、具延淑、森友彦、山口庄太郎。(2002) 新規なタンパク質脱アミド酵素・プロテイングルタミナーゼの食品タンパク質に対する作用. *食品加工技術*, 第 **22** 巻第 2 号, 11-18.
 - 29) 山口庄太郎 (2004) 食品酵素化学の最新技術と応用-フードプロテオミクスへの展望- pp141-153.
 - 30) Gu Y.S., Matsumura Y, Yamaguchi S, & Mori T. (2001) Action of protein-glutaminase on

- α -lactalbumin in the native and molten globule states. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5999-6005.
- 31) Yong, Y.H., Yamaguchi, S., and Matsumura, Y. (2006) Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J Agric Food Chem.*, 54(16):6034-40.
 - 32) 特許公報 特許第 3609648 号.
 - 33) Yong Y.H., Yamaguchi S., & Matsumura Y. (2005) Modification of functional properties of wheat gliadin and glutenin by protein-glutaminase-catalyzed deamidation. (2005) Abstract, Institute of Food Technologist, Annual meeting 2005. http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper_28901.htm.
 - 34) Yong Y.H., Yamaguchi S., Gu Y.S., Mori T, Matumura Y. (2004) Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7094-7100.
 - 35) US Patent 6756221.
 - 36) Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. & Kobayashi, K. (1987) Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 285-288.
 - 37) Bollecker, S., Viroben, G., Popineau, Y. & Gueguen, J. (1990) Acid deamidation and enzymatic modification at pH 10 of wheat gliadin: Influence on their fuctional properties. *Sci. Aliments*, **10**, 343-356.
 - 38) Shih, F. (1990) Deamidation during treatment of soy protein with protease. *J. Food Sci.* **55**, 127-132.
 - 39) Motoki, M., Seguro, K., Nio, N. & Takinami, K. (1986) Glutamine-specific deamidation of α S1-casein by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3025-3030.
 - 40) Larre, C., Kedzior, Z. M., Chenu. M.G., Viroben, G. & Gueguen, J. (1992) Action of transglutaminase on an 11 S seeds protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. *J. Agric. Biol. Chem.* **40**, 1121-1126.
 - 41) Larre, C., Chiarello, M., Blanloeli, J. Y., Chenu. M. & Gueguen, J. (1993) Gliadin modification catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. *J. Food Biochem.* **17**, 267-282.
 - 42) Gill, B.P., O'Shaughnessey, A.J., Henderson, P. & Headon, D.R. (1985) An assessment of the potential of peptidoglutaminases I and II in modifying the charge characteristics of casein and whey proteins. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **9**, 33-41.
 - 43) Hamada, J.S., Shih, F.F., Frank, A.W. & Marshall, W.E. (1988). Deamidation of soy peptides and proteins by *Bacillus circulans* peptidoglutaminase. *J. Food Sci.* **53**, 671-672.
 - 44) Hamada, J.S. (1992) Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using

- peptidoglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 719-723.
- 45) Riha III, W. E., H. V. Izzo, J. Zhang, & C.-T. Ho. (1996) Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* **36**:225-255.
- 46) 農林水産省農林水産技術会議事務局：動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発，研究成果 **170**， P. 70-77 (1985).
- 47) Minoru Yoshida and Hajime Minato (1987) Assessment of the Pathogenicity of Bacteria Used in the Production of Single Cell Protein., *Agric. Biol. Chem.*, **51**(1), 241-242.
- 48) Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, Van Ree R, Woolhiser M, & Zawodny J. (2004) A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **39**, 87-98.
- 49) Walker R, & Lupien J.R (2000) The safety evaluation of monosodium glutamate. *J. Nutr.* **130**, 1049S-52S.
- 50) 石坂 照子 即時型アレルギーの発症機序 —肥満細胞，好塩基球からのヒスタミン遊離の機構—(1982) 免疫学 4 (中山書店 山村雄一監修) pp119-129.
- 51) Metcalfe DD et.al.(1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 36(Supp):S165-S186.
- 52) Allergenicity of genetically modified foods, a joint FAO/WHO consultation on foods derived from biotechnology, Rome, Italy, 22-25 January (2001)
http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf
- 53) Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL. (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol.* Aug; 128(4):280-291.
- 54) Kolaskar AS and Kulkarni Kale U. (1999) Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese Encephalitis Virus. *Virology*, 261:31-42.
- 55) Peter J. Wilde (1995) Foam Measurement by the Microconductivity Technique: An Assessment of Its Sensitivity to Interfacial and Environmental Factors. *J. Colloid and Interface Sci.*, **178**, 733-739.
- 56) 国民総人口：総務省統計局 統計データ「平成 18 年 11 月 1 日現在推計人口」
- 57) 公開特許公報 特開 2001-218590
- 58) 平成 18 年国民健康・栄養調査報告，厚生労働省，80, 100, 104, 108

- 59) 食品安全委員会, 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準, 平成 16 年 3 月 25 日, 食品安全委員会決定
http://www.fsc.go.jp/senmon/idensi/gm_tenkabutukijun.pdf
- 60) U. S. Pharmacopeia 28 National Formulary 23 (2005), 2858
- 61) Behrendt, U., Ulrich, A., & Schumann, P. (2008) *Chryseobacterium gregarium* sp. nov., isolated from decaying plant material. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 May;58(Pt 5):1069-1074
- 62) Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Avesani, V., Janssens, M., & Wauters, G. (2007) *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *Int J Syst Evol Microbiol.* Nov;57(Pt 11):2623-2628.
- 63) 池澤善郎、大砂博之 (2002) Latex-Fruits Syndrome, *アレルギー*, 51(8), 591-604.
- 64) Salcedo, G., Daiz-Perales, A., & Sanchez-Monge, R. (2001) The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 1:117-183.
- 65) Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, & Salcedo G. (1998) Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol.* Jul;102(1):127-133.
- 66) Karisola P, Kotovuori A, Poikonen S, Niskanen E, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T, Alenius H, & Kulomaa MS. (2005) Isolated hevein-like domains, but not 31-kd endochitinases, are responsible for IgE-mediated in vitro and in vivo reactions in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* Mar;115(3):598-605.
- 67) Cooke SK, & Sampson HA. (1997) Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol.* Aug 15;159(4):2026-2032.
- 68) Besler, M., Peterson, A., Steinhart, H., & Paschke, A. (1999) Identification of IgE-Binding Peptides Derived from Chemical and Enzymatic Cleavage of Ovomucoid (Gal d 1). *Internet Symposium on Food Allergens* 1(1):1-12.
- 69) Mine Y, & Zhang J. W.. (2002) Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 12;292(4):1070-1074.
- 70) Banerjee, B., Kurup, V. P., Greenberger, P. A., Johnson, B. D., & Fink, J. N. (2001) Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clinical Experimental Allergy*, 31, 761-770.
- 71) Regulation (EC) No1332/2008 of the European Parliament and of the council of 16 December 2008 on food enzymes and amending Council Directive 83/417/EEC, Council Regulation (EC) No1493/1999, Directive 2000/13/EC, Council Directive 2001/112/EC and Regulation (EC) No258/97.

- 72) General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations Used in Food Processing. (2006) JECFA.
- 73) Kampfer P., Arum A. B., Young C. C., Chen W. M., Sridhar K. R. and Rekha P.D. (2009) *Chryseobacterium arthrosphaerae* sp. Nov., isolated from the faces of pill millipede *Arthrosphaera magna* Attems from India., *Int J Syst Evol Microbiol* (in press). doi:10.1099/ijs.0.65734-0.
- 74) Benmalek Y., Cyol J. L., Bouanane N. A., Hacene H., Fauque G. and Fardeau M. L. (2009) *Chryseobacterium solinicola* sp. Nov., isolated from soil (2009) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press). doi:10.1099/ijs.0.008631-0.
- 75) Yassin A. F., Hupfer H., Siering C. And Busse H. J. (2009) *Chryseobacterium treverense* sp. Nov., isolated from a human clinical source., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press). doi:10.1099/ijs.0.017327-0.
- 76) Kampfer P., Chandel K., Prasad G. B., Shouche Y. S. And Veer V. (2009) *Chryseobacterium culicis* sp. Nov., isolated from the midgut of *Culex quinquefasciatus* Say, a mosquito from India., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press). doi:10.1099/ijs.0.019794-0.
- 77) Curtze J. L., Miteva V. and Brenchley J. (2010) Novel ultramicrobacterial isolates from a deep Greenland ice core represent a proposed new species, *Chryseobacterium greenlandense* sp. nov., *Extremophiles*, 14, 61-69.
- 78) Cho S. H., et al. (2010) Four new species of *Chryseobacterium* from the rhizosphere of coastal sand dune plants, *Chryseobacterium elymi* sp. nov., *Chryseobacterium hagamense* sp. nov., *Chryseobacterium lathyri* sp. nov. and *Chryseobacterium rhizosphaera* sp. nov., *Syst. Appl. Microbiol.* (in press).
- 79) Hsueh P. R., Teng L. J., Yang P. C., Ho S. W., Hsieh W. C. and Luh K. T. (1997) Increasing incidence of nosocomial *Chryseobacterium indologenes* infections in Taiwan., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 16, 568-574.
- 80) 遺伝子組換え食品(微生物)の安全性評価基準 (2008) 食品安全委員会
- 81) Gendel S. and Jenkins J. (2005) Review of available allergen databases., Monograph of the Bioinformatics Expert Panel Workshop., HESI Protein Allergenicity Technical Committee.
- 82) Ladics G. S. (2008) Current codex guidelines for assessment of potential protein allergenicity., *Food and Chemical Toxicology*, 46, 520-523.
- 83) Thomas K. et al. (2009) Scientific advancement of novel protein allergenicity evaluation: An overview of work from the HESI Protein Allergenicity Technical Committee (2000-2008), *Food and Chemical Toxicology*, (in press).
- 84) Result of all collection search for *Chryseobacterium* (2010) American Type Culture Collection.

- 85) ゼラチン用途別販売量の推移 (2010) 日本ゼラチン・コラーゲンペプチド工業組合
- 86) 斉藤美貴、小嶋匡人、長沼孝多、辻政雄 (2009) 果実アレルギーの検出方法と低減加工手法の確立に関する研究(第2報)、山梨県工業技術センター研究報告 No.23, 55-57.
- 87) Casio A., Stassi G., Costa G. B., Crisafulli G., Rulli I., Ruggeri C. and Iaria C. (2005) *Chryseobacterium indologense* bacteraemia in a diabetic chilled., *J. Med. Microbiol.*, 54, 677-680.
- 88) Nulens E., Busels B., Bols A., Gordts B. and Landuyt H. W. (2001) Recurrent bacteremia by *Chryseobacterium indologense* in an oncology patient with a totally implanted intravascular device. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7(7), 391-393.
- 89) Kienzle N., Muller M. and Pegg S. (2001) *Chryseobacterium* in burn wounds., *Burns*, 27, 179-182.
- 90) Thompson J. D. et al. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools., *Nuc. Acids Res.*, 25(24), 4876-4882.
- 91) Kimura M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences., *J. Mol. Evol.* 16(2), 111-120.
- 92) Saitou N. and Nei M. (1987) The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees., *Mol. Biol. Evol.*, 4(4), 406-425.