

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会 第124回会合議事録

1. 日時 平成26年2月18日（火） 14：00～15：22

2. 場所 食品安全委員会中会議室

3. 議事

(1) 食品健康影響評価について意見を求められた遺伝子組換え食品等の安全性評価について

- ・ *Bacillus subtilis* BPN01株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ・ pSSA株を利用して生産されたペプチダーゼ
- ・ pXPO株を利用して生産されたペプチダーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、宇理須専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、手島専門委員、
中島専門委員、飯専門委員、和久井専門委員

(専門参考人)

岡田専門参考人

(食品安全委員会委員)

佐藤委員、山添委員

(事務局)

本郷事務局次長、山本評価第二課長、池田評価情報分析官、北村課長補佐、
小倉係員、松井技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ① *Bacillus subtilis* BPN01株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ② pSSA株を利用して生産されたペプチダーゼ
- ③ pXPO株を利用して生産されたペプチダーゼ

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、定刻になりましたので、ただ今から第124回遺伝子組換え食品

等専門調査会を開催いたします。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づきまして非公開で行います。

本日は、専門参考人として国立医薬品食品衛生研究所の岡田先生に御出席いただく予定ですが、少し遅れると聞いています。

本日は、所用により小関専門委員、鎌田専門委員と橘田専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、新規審議品目であります *Bacillus subtilis* BPN01 株を利用して生産されたプロテアーゼ、pSSA 株を利用して生産されたペプチダーゼ、pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼの安全性についての審議となります。

それでは、お手元の資料の確認をいたしたいと思います。事務局からお願いします。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして配布資料の確認をさせていただきます。

配布資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料といたしまして食品健康影響評価に関する資料となっております。これら以外の参考資料についてはファイルにとじまして委員の皆様のお机の上に置かせていただいております。本ファイルについては、調査会終了後回収させていただきます、次回また配布いたします。

不足等ございましたら事務局までお知らせください。

○澤田座長 それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づき必要となります専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告をお願いします。

○北村課長補佐 本日の議事に関する専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただいた確認書を確認したところ、平成 15 年 10 月 2 日委員会決定の 2 の (1) に規定する「調査審議等に参加しないこととなる事由」に該当する専門委員はいらっしゃいません。

以上でございます。

○澤田座長 提出いただきました確認書について、その後、相違等ございませんでしょうか。

それでは、議題 (1) の審議に入らせていただきたいと思います。

まず、*Bacillus subtilis* BPN01 株を利用して生産されたプロテアーゼについてであります。

この添加物は、安全性評価基準の対象とならない、いわゆるセルフクローニングに該当するとされております。したがって、本添加物が安全性評価基準の対象となるか否かについて御確認いただきまして、対象とならない場合は評価書案の審議を行いたいと思います。対象となる場合には、安全性評価を行うための評価基準に沿った資料を提出いただくことを申請者に指摘したいと思います。

それでは、事務局から御説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、お手元に青い紙のファイルをお願いいたします。

めくっていただきまして、1 ページに申請の概要というページがございます。

まず、申請品目の概要になりますけれども、本プロテアーゼは、その生産性を高めるために、この申請者のプロテアーゼ生産菌でございます *Bacillus subtilis* BP1206 株を宿主としまして、同じく宿主に由来するプロテアーゼ遺伝子を相同組換えにより導入しまして、プロテアーゼ遺伝子を 2 コピー保持しました BPN01 株を生産菌とするプロテアーゼでございます。

3 パラ目にまいります。使用したベクター pE194 は、*Staphylococcus aureus* に由来しまして、エリスロマイシン耐性遺伝子を含んでございます。生産菌の BPN01 株にはプロテアーゼ遺伝子のみを相同組換えにより導入しておりまして、エリスロマイシン耐性遺伝子を含むベクター pE194 由来の DNA は含んでございません。したがって、この BPN01 株は、宿主であります BP1206 株以外を由来とする DNA は含んでいないということでございます。

2 番の申請品目の利用目的及び利用方法になりますけれども、プロテアーゼはタンパク質を加水分解する酵素でございます。利用方法についても、添加量、処理条件に従来のプロテアーゼと差異はないということでございます。

2 ページ目をお願いいたします。

BPN01 株の誘導についてということですが、宿主は *Bacillus subtilis* の BP1206 株でございます。

1-4 の病原性・有害物質の産生性につきましては、*Bacillus subtilis* は、古くから発酵分野や食品添加物酵素の生産菌として利用されてきた微生物でございます。植物、動物に対する病原性や有害物質の産生は知られていないということでございます。

1-5 の食経験になりますけれども、*Bacillus subtilis* を基原とする食品添加物については、既に豊富な食経験が存在しておりまして、一般に安全な微生物として知られてございます。実際に申請者におきましては、BP1206 株を生産菌としますプロテアーゼについては、長くプロテアーゼ生産菌として使用しておりまして、食品添加物として長年にわたって使用されているということでございます。

3 ページをお願いいたします。

ベクターについてでございますが、ベクターは pE194 で、由来は *Staphylococcus aureus* です。塩基配列は明らかになってございまして、制限酵素による切断地図が明らかにされておりまして、ヒトに対する病原性や有害性は知られてございません。また、エリスロマイシンに対する耐性を保持してございます。

図 1 に pE194 の構造が示されてございます。緑の部分がエリスロマイシンの耐性遺伝子になってございます。

4 ページをお願いします。

挿入 DNA については、宿主と同じ BP1206 株でございます。挿入された DNA は、プロテアーゼの構造遺伝子とプロモーター領域とターミネーター領域の全長●●●になります。

5 ページに全塩基配列が示されてございます。導入方法になりますけれども、先ほどのベクター pE194 に相同組換えに必要な BP1206 株を由来としますアミラーゼ遺伝子の上流領域と下流領域より構成される部位を挿入しました相同組換え用プラスミド pBPN01 を構築しまして組換えを行ってございます。

6 ページをお願いします。

こちらが pBPN01 の構築の方法になります。BP1206 株のアミラーゼ遺伝子の上流領域と下流領域、プロテアーゼを導入したプラスミドでございます。図の 2 に模式図が示されてございますけれども、プラスミドの pE194 にアミラーゼの上流領域と下流領域を導入いたしまして、●●●というプラスミドができます。そちらに BP1206 株のプロテアーゼ遺伝子とプロモーター、ターミネーター領域を導入いたしまして pBPN01 ができます。

8 ページをお願いいたします。

相同組換え用プラスミド pBPN01 の構造になります。図 3 のとおりで、BP1206 株由来のアミラーゼ遺伝子の上流領域、下流領域とプロテアーゼ遺伝子、ベクター pE194 を由来とする DNA から成る●●●でございます。

9 ページをお願いいたします。

生産菌の BPN01 株の誘導になります。図 4 に示されてございますように、pBPN01、相同組換え用のプラスミドを用いまして BP1206 株を形質転換します。まずエリスロマイシン耐性を指標に、一次相同組換え体を単離しまして BPN00 株をつくります。これに再度相同組換えを誘導しまして、●●●を指標にスクリーニングを行います。●●●でありますプロテアーゼ生産菌 BPN01 株を単離するというところでございます。この菌株につきましては、発現プラスミドという形ではなく、宿主の染色体に導入されてございます。

11 ページをお願いいたします。

アミラーゼ遺伝子とプロテアーゼ遺伝子の位置関係及び差異ということでございますけれども、BPN01 株のアミラーゼ遺伝子の上流領域から下流領域までの塩基配列を決定しまして、宿主の BP1206 株との比較を行ってございます。BPN01 株は、アミラーゼ遺伝子の導入に際しまして、アミラーゼ遺伝子がプロテアーゼ遺伝子に置換をされております。それ以外に差異はないということでございます。

図 5 にプロテアーゼ遺伝子の位置関係及び差異が示されてございます。1206 株のアミラーゼ遺伝子がピンク色になってございますが、そちらがプロテアーゼ遺伝子に置きかえられてございます。

12 ページがプロテアーゼ遺伝子の全塩基配列になります。この塩基配列については、宿主のプロテアーゼ遺伝子と完全に一致したということでございます。

13 ページをお願いいたします。

こちらが BPN01 株に宿主を由来とする DNA 以外が組み込まれていないことの証明になります。そのことを証明するためにサザンブロット分析が行われてございます。この株の誘導におきまして、親株を由来とする DNA 以外とは、ベクター pE194 を制限酵素 *Xba* I と *Pst* I で分解して用いた 3.3 kb の DNA が当てはまるということで、次の 14 ページの図 7 のほうに示されてございます *Pst* I から *Xba* I のところでございます。

サザンブロット分析には親株と一次組換え体の BPN00 株とプロテアーゼ生産菌の BP01 株の染色体 DNA を用いまして、それらの DNA を制限酵素 *Hind*III で分解したものをサザンブロット分析に用いてございます。また、ポジティブコントロールとしまして未分解の組換え用プラスミド pBPN01 が用いられてございます。

図 6 に制限酵素の分解箇所を示されてございます。

14 ページをお願いいたします。

ベクター pE194 のプローブとして用いた DNA の箇所が①から③で示されてございます。

15 ページをお願いいたします。

図 8 にサザンブロット分析の結果が示されてございます。プローブ①、プローブ②、プローブ③ということでございまして、レーン 3 が本組換え菌株 BPN01 株でございます。

16 ページをお願いいたします。

以上より、プロテアーゼ生産菌 BPN01 株は、「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当していると考えられるということでございます。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思えます。2 つに分けて、まず申請書の 5 ページまでで、宿主、ベクター、挿入 DNA のところに関しましてコメント、御意見ございましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

○児玉専門委員 安全性には直接関係しないといえませんが、プロテアーゼの遺伝子のコピー数を増やすという作業をしているわけですが、プロテアーゼの特徴についてほとんど記載されていないので、一応記載としては EC 番号と、どんなプロテアーゼか。プロテアーゼ、いろいろな種類がありますので、一応そのぐらいの記載はしていただきたいと。

○澤田座長 それは、挿入 DNA の説明のところ辺りに追加すればいいですか。

○児玉専門委員 そうですね。

○澤田座長 ほか、よろしいでしょうか。

それでは、残りの部分で 6 ページから 16 ページにかけて御意見、コメントがありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、ちょっと記載を追加するだけで、本件については特に安全性の問題がないということですので、続きまして評価書案の審議に入りたいと思います。事務局から説明をお願いします。

○北村課長補佐 それでは、右肩に資料と書いてございますものの 1 ページからが本プロテアーゼの評価書の案になります。

めくっていただきまして、4 ページをお願いいたします。

まず評価対象添加物の概要になります。名称、用途、申請者、開発者は記載のとおりでございます。本添加物は、プロテアーゼの生産性を高めるため、*Bacillus subtilis* BP1206 株を宿主として、BP1206 株由来のプロテアーゼ遺伝子を導入して作製された BPN01 株を利用して生産されたプロテアーゼである。プロテアーゼは、タンパク質を加水分解する酵素であり、既存添加物名簿に記載されている。また、*B. subtilis* は、発酵分野や食品添加物の生産菌に安全に利用されてきた微生物であり、宿主である BP1206 株を利用して生産されたプロテアーゼは食品添加物として長年の使用経験があるとさせていただいております。

35 行目からの II の食品健康影響評価になります。

1 の BPN01 株の構築についてでございます。BPN01 株の宿主は、*B. subtilis* BP1206 株である。*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pE1904 に *B. subtilis* BP1206 株由来のプロモーター及びターミネーター領域を含むプロテアーゼ遺伝子、*B. subtilis* BP1206 株の特定の標的遺伝子の上流領域及び下流領域を組み込むことによって導入用プラスミド pBPN01 株が作製されたとしています。

下線を引いてございまして、「アミラーゼ遺伝子」のところを網かけをしているのですが、申請者の希望といたしましては、アミラーゼ遺伝子のところを非公開にしたいということで、現状ではマスキングの案で書いてございますが、評価書として書くべきかどうか、後ほど御検討いただきたいと思っております。

プラスミド pE194 は、塩基配列が明らかになっており、ヒトに対する病原性や有害性は知られていない。導入用プラスミド pBPN01 を用いて *B. subtilis* BP1206 株に相同組換えによりプロテアーゼ遺伝子を導入することで BPN01 株を得た。なお、BPN01 株の作製過程において選択マーカーとして利用するためにプラスミド pE194 由来のエリスロマイシン耐性遺伝子が導入されたが、BPN01 株はエリスロマイシン耐性遺伝子を有さないさせていただいております。

2 番でございますが、BPN01 株が「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することについてでございます。

(1) ですが、サザンブロット分析を行った結果、BPN01 株中にベクターとして使用したプラスミド pE194 株由来の DNA 及びエリスロマイシン耐性遺伝子が含まれていないことが確認された。

(2) BPN01 株に導入された塩基配列は、*B. subtilis* BP1206 株に由来するプロテアーゼ遺伝子、そのプロモーター領域及びターミネーター領域であるとしています。

次の 5 ページをお願いいたします。

したがって、その塩基配列は、全て *B. subtilis* 由来である。

以上、1 及び 2 から、本プロテアーゼについては「遺伝子組換え微生物を利用して生産された添加物の安全性評価基準」の第 1 章総則第 3「対象となる添加物及び目的」に規定する「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当する微生物を利用して製造されたものであることから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断したとさせていただきます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメントをいただきたいと思います。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。

まず、先ほど事務局のほうからお話がありましたマスキングの件でありますけれども、これはいかがでしょうか。「特定の標的遺伝子」として「アミラーゼ遺伝子」以下を取ってしまう。それから、「アミラーゼ遺伝子」のかわりに何かマスキングをかける。それから「アミラーゼ遺伝子」を明示すると、多分 3 通りぐらいの方法があるかと思いますが、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 これは過去の事例にもよるのだとは思いますが、もともとこれは相同組換えで、セルフといいますか、組換え体に相当しない形になるかと思っておりますので、この下線の部分全部要らないのではないかと思うのですけれども。もうプロモーターとターミネーターとプロテアーゼ遺伝子を組み込むことによってつくって相同組換えで入れましたというだけでもよろしいのではないかと思うのですが、過去、きちんとベクターについてある程度明示しているということであれば、それに従わないといけないかと思っておりますけれどもね。

○澤田座長 ほか、いかがでしょうか。

全部取ってしまうと簡単過ぎるので。もし取ってしまう場合には、「相同組換えに用いる領域」という形で書くことはできると思います。

○児玉専門委員 「*Bacillus subtilis* BP1206 株由来の相同組換えに用いる領域」とか。

○澤田座長 本来ですと「アミラーゼ遺伝子」を明示するのが本当は一番すっきりしてよろしいかと思うのですけれども、ほかの先生方、いかがでしょうか。

○中島専門委員 これがセルフクロニングということになるということを考えると、そこは判断が難しくなるのですが、何をやったかということがわかるということを重視して考えるのであれば、「アミラーゼ遺伝子」というのを、これを削らないでくれと一押しし

てほしいなとは思いますが。

○澤田座長 ほかの先生方、いかがでしょうか。たしか、前例がないのですね。

○北村課長補佐 2013年9月に評価をいただきましたアスパラギナーゼにつきましては、プラスミドに何を組み込んだかということは記載してございます。

○澤田座長 それはセルフナチュラルの前例で。

○北村課長補佐 そうです。

○澤田座長 その際、企業のほうからマスキングの依頼はなかった。

○北村課長補佐 はい。挿入遺伝子、プロモーター、ターミネーター領域を組み込むことによって作製されたということで、相同組換えの上流、下流ということは書いていないです。挿入した構造遺伝子とプロモーターとターミネーターの記載です。

○澤田座長 実際に組み込みに利用された領域は確認しないとイケませんね。

それでは、それ以外のところで、もし追加でありましたら先に御指摘いただければありがたいと思いますけれども。

○北村課長補佐 すみません。1点確認させていただきたいのですけれども、41行目のところなのですが、今回使いました pBPN01 というプラスミドについて、導入用プラスミドという形で書いているのですが、こちらでよろしいでしょうか。申請者のほうでは相同組換え用プラスミドという名前をつけているのですけれども。

○澤田座長 たしか遺伝子導入用プラスミド等の言葉を使ったような覚えがありますけれども、導入用プラスミドでも間違いはないと思いますけれども。

ほかはよろしいでしょうか。

○北村課長補佐 すみません。先ほど御説明しましたアスパラギナーゼなのですけれども、入れた要素は全てオープンになっています。

○澤田座長 全てオープンなのですけれども、そのときに企業サイドはマスキングしてくれという希望は……

○北村課長補佐 なかったです。この評価書に記載している情報が全てオープンな情報です。

○澤田座長 マスキングの要請はなかったわけですね。今回は要請があったので。

○北村課長補佐 「アミラーゼ遺伝子」という文言をマスキングしてほしいということですね。

○手島専門委員 導入の過程がわかるという意味で、今の「アミラーゼ遺伝子」だけを除いた形での引用ということではいかがかとは思いますが、

○澤田座長 特定の標的遺伝子の上流及び下流なのですけれども、そうすると、何かあらぬ誤解を招く可能性があるという意見も多分あると思っていて、ちょっと非常に悩ましいところなのですけれども。

それでは、一応アミラーゼ遺伝子を残すことを申請者に依頼して、代替案としては、先ほどの「相同組換えに用いる領域」ぐらいという表現もあり得るということでは

思います。

○北村課長補佐 ありがとうございます。

○澤田座長 よろしいでしょうか。

それでは、続きまして、pSSA 株を利用して生産されたペプチダーゼ、それから pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼについてであります。

これらの添加物は、安全性評価基準の対象とならない、いわゆるナチュラルオカレンスに該当するとされておりまして、したがって、本添加物が安全性評価基準の対象となるか否かについて、これから御確認いただきまして、対象とならない場合には評価書案の審議を行いたいと思います。対象となる場合は、安全性評価を行うための評価基準に沿った資料を提出いただくことを申請者に指摘したいと思います。

それでは、まず pSSA 株を利用して生産されたペプチダーゼについて、事務局から御説明をお願いします。

○小倉係員 それでは、お手元に緑のファイルで pSSA 株を利用して生産されたペプチダーゼの資料をお願いいたします。

めくっていただきまして、2 ページ目からお願いいたします。

本ペプチダーゼの使用・開発目的でございますけれども、ペプチダーゼは既存添加物でございます。大豆や小麦などのタンパク質、もしくは大豆の部分加水分解で生じたペプチドの加水分解に用いられると記載されてございます。これらのペプチドを加水分解することで、食品の呈味の向上性を付与する用途や調味料の製造など、幅広い分野で使用されているとされておりまして、

本ペプチダーゼは、ペプチドのアミノ酸末端から逐次分解して、アミノ酸を遊離させる反応を触媒します。●●●タンパク質の加水分解率を向上させることにより、遊離アミノ酸量を増加させ、エキスの収率向上並びに濃厚な旨味を有する調味料を製造することができるとされておりまして、

2 番、宿主でございますけれども、*Streptomyces violaceoruber* 1326 株でございます。

2. 1、非病原性について記載されてございますが、宿主については、植物、動物に対し病原性、毒性は知られておらず、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において、バイオセーフティレベル 1 に該当することです。文献検索で動物、ヒトに関する病気の記載は見つからなかった上、植物に対する病気に関連することも示されていないと記載されてございます。

2. 2、その他の有害生理活性物質でございますけれども、宿主による有害生理活性物質の生産は報告されていない。また、ヒトの健康に悪影響を及ぼす抗菌活性物質を生産しないことを確認しているとのことで、資料が添付されてございます。

2. 3、食経験についてでございますけれども、*Streptomyces* 属細菌が基原となる既存添加物については既に豊富な食経験があると記載されてございまして、3 ページ目にまいりますけれども、当該宿主微生物である *S. violaceoruber* は、日本国内でレシチン改変用

ホスホリパーゼ A₂ の生産用宿主として 8 年以上使用されている。アメリカでもレシチンの改質用として安全な食経験が得られていると記載されてございます。

プラスミドについてでございますけれども、名称は pIJ702、由来は *S. violaceoruber* ATCC35287 でございます。

塩基配列、非有害性に関してでございますけれども、塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかであり、ヒトに対して有害ではないと記載されてございます。

3. 4、薬剤耐性についてでございますけれども、プラスミドには *Streptomyces azureus* 由来のチオストレプトン耐性遺伝子が含まれておりますけれども、構造が不安定であると考えられ、ヒトの消化管に存在するタンパク質分解酵素で分解されやすいペプチダーゼ結合が存在すると考えられることから、ヒトの消化管に存在する消化酵素群によって容易に消化されると考えられると記載されております。また、本耐性タンパク質のアレルギー性は報告されていないとのことでございます。

3. 5、伝達性についてでございますけれども、当該プラスミドには伝達性がないことが知られているとのことです。

宿主依存性についてでございますが、当該プラスミドは *Streptomyces* 属以外の微生物では複製されない。また、特殊な培養条件下以外での安定性が低いことが知られているとのことです。

4 番、発現プラスミドに関して記載されてございまして、4 ページにまいりまして表 1 のとおり遺伝子と供与体が示されてございます。●●●の遺伝子のプロモーター領域の供与体は、*S. avermitilis* ATCC31267、本ペプチダーゼの構造遺伝子は、*S. cinnamoneus* TH-2 株、ホスホリパーゼ D 遺伝子のターミネーター領域は *S. cinnamoneus* NBRC12852 株でございます。

4. 1. 1、挿入遺伝子供与体の安全性について記載されてございます。プロモーター領域を取得した株及び本構造遺伝子及びターミネーター領域を取得した株は、病原性、毒素産生性が報告されておらず、人から分離されたとの記載もなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において、それぞれバイオセーフティレベル 1 に該当するとのことでございます。

挿入遺伝子供与体の安全な摂取経験についてでございますけれども、*Streptomyces* 属細菌が基原となる既存添加物に豊富な食経験があり、*Streptomyces* 属細菌は極めて安全な微生物と一般的に認識され、広く利用されているとのことです。

4. 2、発現プラスミドの性質でございますけれども、5 ページの図 1 に構成が示されてございます。プラスミド及び挿入遺伝子は全て *Streptomyces* 属由来のものというふうに記載されてございます。

5 ページの 4. 3 でございますけれども、●●●プロモーターの使用について、生産性の面から説明が記載されております。

6 ページの図 2 にまいりましてけれども、ペプチダーゼの生産性がプロモーターごとに比

較されておりまして、SAMP プロモーターを使用したほうが本ペプチダーゼの分解が観察されなかったと記載されてございます。

4. 4 でございますが、発現プラスミド (pSSA) の構築でございます。本ペプチダーゼ遺伝子は、*S. cinnamoneus* TH-2 株の染色体株を鋳型とし、構造遺伝子を PCR 法で増幅させて取得したとのことです。これを pIJ702 から●●●を除去し、そこにプロモーターとターミネーターを挿入して作製したプラスミドに挿入し、大腸菌由来遺伝子を除去して発現プラスミドを得たとのことです。

なお、本ペプチダーゼ遺伝子を挿入するために●●●及び●●●サイトを挿入したことから、本ペプチダーゼ遺伝子の●●●において●●●塩基、●●●において●●●塩基が付加されておりますが、この部分はペプチダーゼ遺伝子の外側に当たるため、生産されるペプチダーゼ自体に変化はないとのことです。

4. 5、発現プラスミドの宿主への導入方法でございますけれども、プロトプラスト法で形質転換しております。

5 番、本製品の生産菌株 pSSA の産生するペプチダーゼと、遺伝子供与体 *S. cinnamoneus* TH-2 株のペプチダーゼの同一性についてでございますけれども、本ペプチダーゼ遺伝子の遺伝子配列を供与体の遺伝子配列と比較した結果、配列が全て一致していることを確認し、最終的に生産されるペプチダーゼと供与体から得られるペプチダーゼは全く同等のものであると結論されてございます。

6 番、本製品の製造について記載されてございます。

7 ページにまいりまして 7 番、*Streptomyces* 属に属する微生物が自然界において遺伝子交換を行うことについて記載されてございます。一般的に、16S rRNA が高い相同性を持つ微生物は分類学上近縁であるとされておりまして、*S. violaceoruber* NBRC15146 株、あとプロモーターの供与株、ターミネーターの供与株、本ペプチダーゼ構造遺伝子の供与株、チオストレプトン耐性遺伝子の供与株の 16S rRNA の塩基配列は、それぞれ高い相同性を示していると記載されてございます。宿主からプラスミドが取り除かれた株の 16S rRNA 株も、*S. violaceoruber* の NBRC15146 株の 16S rRNA 配列と全一致することから、宿主も 100%の相同性を示すと考えられると記載されてございます。

7. 1、*Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われることに対する遺伝学上の根拠でございますけれども、*Streptomyces* 属の多くが自然界において菌と菌との接合による遺伝子交換を行い、この遺伝子交換には接合プラスミドが関与しているということでございます。接合プラスミドの例として、*S. violaceoruber* 由来のプラスミド、*S. azureus* ATCC14921 株由来のプラスミドなどが報告されております。

7. 2、*Streptomyces* 属間でプラスミドの転移と染色体遺伝子交換が行われることに対する実験室での証明でございますけれども、*S. violaceoruber* 由来の接合プラスミド及びその発生プラスミドは、実験用寒天培地及び土壌環境中において *Streptomyces* 属間で転移することが記載されているとのことです。

また、pIJ101より発生した非接合性であるpIJ702、こちらは本申請に用いられたベクターでございますけれども、接合性プラスミドの存在下で転移率は低いですが、多種の*Streptomyces*属間に転移される。このような転移は通常自然に起こる。さらに染色体組換えもpIJ702の転移後に起こることが報告されているとのことでございます。

下のほうにまいりまして、遺伝子が*Streptomyces*属間で頻繁に交換される可能性についても文献等で示されていると記載されてございます。

7. 3、自然界において、*Streptomyces*属間で遺伝子交換が行われる根拠について記載されてございまして、系統学から説明できるということで、16S rRNA情報をもとに得られた系統樹と、芳香族ポリケタイド生合成に係る遺伝子情報をもとに得られた系統樹を比較した結果、相同性の高い芳香族ポリケタイド生合成に係る遺伝子が分類学上近縁ではなく*Streptomyces*属の菌株に存在することが示されており、この事実は*Streptomyces*属間で広い遺伝子が交換されていることを示す証拠であると説明している文献があるとのことです。

さらに、*S. cinnamoneus*、*S. violaceoruber*及び*S. avermitilis*は、菌糸の色素に関する同等の遺伝子を持っており、これらの中で遺伝子が交換されている証拠であることを説明していると記載されてございます。

8番、諸外国の規制、認可については記載のとおりでございます。

以上から、遺伝学上、実験的及び系統学上の証明により、自然界において*Streptomyces*属間で遺伝子交換が行われることは明らかであると考察されております。さらに、*S. cinnamoneus*、*S. violaceoruber*、*S. azureus*及び*S. avermitilis*の間では自然に遺伝子の交換がなされていると考えられる科学的知見もあることから、ペプチダーゼの生産株pSSAと同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在し得るということで、本ペプチダーゼは、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当すると考えられると記載されてございます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思えます。やはり2つに大体分けまして、申請書の2ページから6ページの中段で、4番目の発現プラスミドに関してのところまででコメント、御意見、ありましたらお願いしたいと思います。

○児玉専門委員 先ほどと同じなのですが、酵素のEC番号はちょっとつけていただければと思います。多分エキソプロテアーゼだと思うのですが、それはちょっと情報として載せていただきたい。

それから、4ページのところの4. 1. 1の直前の行ですけれども、今回、ペプチダーゼの供与体が新規に取ってきた菌株で、同定試験をやって*Streptomyces*であることを確かめた、ということが非常に重要なのですが、その根拠がDNA-DNAハイブリダイゼーシ

ヨンの試験結果でして、それが 70%以上の相同性が確認できたためというところにあるのですけれども、それを確認できる資料が添付されていないので、文章は変えなくていいと思うのですけれども、何かそれを確認できる資料は添付していただきたいと思います。

○澤田座長 最初の情報の追加は、供与体のところでよろしいですか。一番最初のところですか。

○児玉専門委員 一番最初のところで。

○澤田座長 TH-2 株が本当にこの同定でいいのかというのが一番問題になるということなのだと思えますけれども。

○児玉専門委員 今のバクテリアの分類の基準でいけば、この文章の表現でよろしいかとは思いますが、その根拠がちょっと確認できない状況になっているので。

○澤田座長 70%以上の相同性のところですね。これはシークエンスという意味ですか。ハイブリダイゼーション。

○児玉専門委員 いや、ハイブリダイゼーションでパーセンテージを出しております。

○澤田座長 ほかはよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 あと、5 ページの 4. 3 の説明の中段ぐらいなののですが、
「SSMP プロモーターを用いた場合、培養時間が経過すると本ペプチダーゼの分解が観察され」とあって、別なプロモーターを用いると分解が観察されないという表現なのですが、プロモーターの種類によって分解される、されないというのはちょっとおかしいので、多分培養後期まで安定して発現しているか、強くつくっているかどうかということなのだと思えるのです。プロモーターが違っていると分解されなくなりますという言い方はちょっと不思議に思いますので、●●●とか培養後期まで安定して発現したのでこちらを使いましたという表現のほうが一般的かなと思いますので。

○澤田座長 それはちょっと文章を直していただくということで、ほかはよろしいですか。
それでは、6 ページの中段から最後のところにかけて、コメント、御意見ありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、内容的には特に問題がないということでもありますので、評価書案の審議に入りたいと思えますけれども、よろしいでしょうか。では、事務局から説明をお願いします。

○小倉係員 では、お配りしております資料をお願いいたします。7 ページからが本ペプチダーゼについての評価書案になります。

10 ページをお願いいたします。こちら、下線と取り消し線が記載されておりますけれども、これは事前にお送りしたものからの変更箇所でございます。

I 番、評価対象添加物の概要でございます。名称、用途、申請者、開発者について記載しておりますけれども、申し訳ございません。こちら、申請者、開発者の名称が「ナガセケムテックス」となりますので修正いたします。

28 行目から記載してございますけれども、本添加物は、ペプチダーゼの生産能を高めるために *Streptomyces violaceoruber* 1326 株を宿主として *Streptomyces cinnamoneus*

TH-2 株由来のペプチダーゼ構造遺伝子に *Streptomyces avermitilis* ATCC31267 株由来のプロモーター及び *S. cinnamoneus* NBRC12852 株由来のターミネーターを結合した挿入 DNA 並びに *Streptomyces azureus* 由来のチオストレプトン耐性遺伝子を含む発現プラスミドを導入して作製された pSSA 株を利用して生産されたペプチダーゼであるとしております。

34 行目から、宿主である *violaceoruber*、構造遺伝子及びターミネーターの供与体である *S. cinnamoneus*、プロモーターの供与株である *S. avermitilis* 並びにチオストレプトン耐性遺伝子の供与体である *S. azureus* は、毒素産生性及び病原性は知られておらず、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル 1 に該当するとしております。

II 番、食品健康影響評価について記載してございますけれども、1 番、pSSA 株の作製について、宿主は *S. violaceoruber* 1326 株であり、挿入 DNA は *S. cinnamoneus* TH-2 株由来ペプチダーゼ構造遺伝子に *S. avermitilis* ATCC31267 株由来のプロモーター及び *S. cinnamoneus* NBRC12852 株由来のターミネーターを結合したものであるとさせていただきます。

46 行目から、こちら、お送りしたものから修正してございますけれども、発現プラスミドは、プラスミド pIJ702 をもとに作製されたものであり、塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。pIJ702 は、*S. violaceoruber* のプラスミドに由来し、*S. azureus* 由来のチオストレプトン耐性遺伝子を含む。なお、プラスミド pIJ702 は、ヒトに対して有害でないことが知られているとしております。

52 行目から、pSSA 株は、発現プラスミドをプロトプラスト法を用いて宿主に導入し、形質転換することによって作製されたとしております。

55 行目から 2 番、pSSA 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在するか否かについて記載されてございまして、pSSA 株の作製に使用された *S. violaceoruber*、*S. cinnamoneus*、*S. avermitilis* 及び *S. azureus* の間で自然に遺伝子交換が行われていると考えられる。この根拠となる科学的知見については、「*Streptomyces violaceoruber* (pNAG) 株を利用して生産されたキチナーゼ」の評価において既に確認されているとしております。したがって、pSSA 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞は自然界に存在すると考えられるとしております。

64 行目からまとめに入りまして、以上の結果から、本添加物については、「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」の第 1 章総則第 3「対象となる添加物及び目的」に規定する「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断したとしております。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして御意見、コメントをいただきたいと思います。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただければと思います。これ、全体で御意見、コメント、ございますでしょうか。

それでは、ないようですので、ありがとうございました。

それでは、若干の修正と追加のデータが必要となりますけれども、これはメール等で確認でよろしいでしょうか。もう一度出して審議する必要はないとしてよろしいですか。

では、メールで委員の皆様を確認いただくということにしたいと思います。

それでは、いただきました修正点につきましては、事務局で修正した後、私のほうで確認いたしまして、食品安全委員会に御報告してパブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、また非常によく似ておりますけれども、pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼの審議に入りたいと思います。事務局から御説明をお願いします。

○小倉係員 では、pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼでございますけれども、お手元に山吹色の紙ファイルをお願いいたします。

ページをめくっていただきまして、2 ページからお願いいたします。こちらは先ほどのペプチダーゼと同じところがございますので、異なるところについて御説明いたします。

1 番、本ペプチダーゼの使用・開発目的でございますけれども、こちらのペプチダーゼも既存添加物でございます。1 番の下から 2 行目になりますが、本ペプチダーゼは、●●●アミノ酸を遊離させる反応を触媒すると記載されてございます。こちらについても酵素についての説明を記載していただくよう依頼いたします。

2 番の宿主でございますが、こちら、先ほどと同じで *Streptomyces violaceoruber* 1326 株でございます。

2 番の 1 から 2 番の 3 については、先ほどと同様でございます。

3 ページ、3 番、プラスミドについても先ほどと同様で、pIJ702 について説明がされてございます。

3 ページの下のほうでございますが、4 番、発現プラスミドに関して記載されてございますけれども、4 ページの表 1 をお願いいたします。こちらにあるとおり、目的遺伝子と供与体が示されてございまして、ホスホリパーゼ D 遺伝子のプロモーター領域は *S. cinamoneus* NBRC12852 株由来、本ペプチダーゼの構造遺伝子については *S. violaceoruber* NBRC15146 株由来、ホスホリパーゼ D 遺伝子のターミネーター領域については、*S. cinamoneus* NBRC12852 株由来と記載されてございます。

4. 1. 1、挿入遺伝子供与体の安全性については、本構造遺伝子を取得した *S. violaceoruber*、プロモーター領域及びターミネーター領域を取得した *S. cinamoneus* は、病原性、毒素産生性は報告されておらず、人から分離されたとの記載もなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル 1 に該当すると記載されてございます。

4. 1. 2、挿入遺伝子供与体の安全な摂取経験については、先ほどと同様に記載されてございます。

4. 2、発現プラスミドの性質についてでございますけれども、図 1 に構成が示されておりまして、プラスミド及び挿入遺伝子は全て *Streptomyces* 属由来のものであるとのことでございます。

5 ページにまいりまして 4. 3、ホスホリパーゼ D プロモーターの使用について記載されておりまして、こちらも幾つかプロモーターを変えて本ペプチダーゼの生産性を比較した結果、PLD プロモーターで最も高いペプチダーゼ活性が得られたとのことでございます。

4. 4、発現プラスミドの構築について記載されてございまして、本ペプチダーゼ遺伝子は、*S. violaceoruber* NBRC15146 株の染色体を鋳型とし、構造遺伝子を PCR 法で増殖させて取得した。これを pIJ702 から●●●を除去し、そこにプロモーターとターミネーターを挿入して作製したプラスミドに挿入し、さらに大腸菌由来遺伝子を除去して、発現プラスミド pXPO を得たと記載されてございます。

なお、本ペプチダーゼ遺伝子を挿入するための●●●及び●●●サイトを挿入したことから、本ペプチダーゼ遺伝子の●●●において●●●塩基が付加されておりますが、この部分はペプチダーゼ遺伝子の外側にあるため、生産されるペプチダーゼ自体に変化はないとのことでございます。

4. 5、導入方法でございますけれども、プロトプラスト法で形質転換しております。

5 番、本製品の生産菌株 pXPO 株の産生するペプチダーゼと遺伝子供与体のペプチダーゼの同一性について記載されてございまして、本ペプチダーゼ遺伝子と供与体のペプチダーゼ遺伝子を比較した結果、開始コドン以外は遺伝子配列が全て一致していることを確認したとことです。開始コドンが変更されておりますけれども、コードするアミノ酸はそれぞれ同じメチオニンであるため、pXPO 株により最終的に生産されるペプチダーゼは、供与体由来のものと全く同等のものであると記載されてございます。

6 番、本製品の製造について記載されてございます。

6 ページにまいりまして、7 番以降については pSSA 株のときと同様に記載されてございます。

7 ページにまいりまして結論といたしまして、*Streptomyces* 属間で遺伝子交換が行われることは明らかであり、さらに *S. cinnamoneus*、*S. violaceoruber* 及び *S. azureus* の間では自然に遺伝子の交換がなされていると考えられる科学的根拠もあることから、本ペプチダーゼは「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当すると考えられると記載されてございます。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして先生方からの御意見をいただきたいと思っております。ほぼ先

ほどのものと同じ内容に近いと思いますので、最初から最後まで一括で御意見、コメント、ありましたらお願いしたいと思います。

○手島専門委員 特に安全性の問題ということではないのですが、このペプチダーゼに関しては既存添加物に記載されているということで考えてよろしいのでしょうか。これ、既存添加物のペプチダーゼというところの基原のところを見ると、*Streptomyces* 属はここの中には入っていないのですが、プロテアーゼの場合は入っているのですが、ペプチダーゼの場合は入ってなくて、その場合、既存添加物というふうに記載されていると考えてよろしいのでしょうか。

○北村課長補佐 既存添加物リストの基原・製法・本質のところの微生物の名称は例示ということでございまして、これに限られるということではないと聞いています。

○澤田座長 ペプチターゼとプロテアーゼは添加物リストで分けているのですか。

○北村課長補佐 参考資料のファイルがあるのですが、そこに既存添加物名簿がついてございまして、ペプチダーゼとプロテアーゼは別の項目になっております。

○澤田座長 いつも昔から問題になるところなのですが、例示かどうかというのは、前からいつも議論になるところ。一応厚労省の解釈としては例示だということだそうです。

○飯専門委員 ちょっとよろしいですか。今の点ですが、前の申請と同様でちょっと気になっていたところでした。多分主張としては資料の 8 だと思うのですが、申請者の主張がこの資料の 8 にあるのですよね、今言われた点について。

それで、ちょっと確認したかったのは、セルフかどうかとか、そういう点に関しては問題ないと思うのですが、この資料の 8 にある、この申請者が言っていることについては、どこが確認することになるのかということでした。それを確認さえすれば問題ないのかなということ。

○北村課長補佐 厚生労働省のほうで申請を受け付けますので、そのときに確認しているということです。

○澤田座長 ほか、よろしいでしょうか。先ほどのプロモーターの話は、これは大丈夫です。

○児玉専門委員 4 ページの表 1 のペプチダーゼの構造遺伝子のところに *xpo* 遺伝子の供与体が *violaceoruber* にイコールで *coelicolor* A3(2)となっているのは、これはちょっといま一つ意味がよくわからなかったのですが、これ、どういうことですか。

○北村課長補佐 旧名ということで聞いていますので、資料を探します。

確認して、後で御連絡します。

○澤田座長 それは後でよろしいですね。

ほか、いかがでしょうか。ペプチダーゼの記号でしたっけ、あれは。

○児玉専門委員 あれは、何か申請者のほうに聞いていただいて確認していただけるということで。

○澤田座長 ほか、よろしいですか。今回 1 つだけ変わっているのは開始コドン、GTG

を ATG に変えているというところがありますけれども、開始コドンも ATG に変えるのは、前例があったと思います。

ほか、よろしいでしょうか。

それでは、安全性に関しては特に問題はないということですので、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局のほうから御説明をお願いします。

○小倉係員 それでは、お配りしております資料のページをめくっていただきまして 16 ページをお願いいたします。こちらは pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼの評価書案でございます。

I 番でございますけれども、評価対象添加物の概要とありまして、名称、用途、申請者、開発者については記載のとおりとさせていただきます。申し訳ございません。こちらも申請者、開発者を「ナガセケムテックス株式会社」といたします。

本添加物は、ペプチダーゼの生産能を高めるために、*Streptomyces violaceoruber* 1326 株を宿主として、*Streptomyces violaceoruber* NBRC15146 株由来のペプチダーゼ構造遺伝子に *Streptomyces cinnamoneus* NBRC12852 株由来のプロモーター及びターミネーターを結合した挿入 DNA 並びに *Streptomyces azureus* 由来のチオストレプトン耐性遺伝子を含む発現プラスミドを導入して作製された pXPO 株を利用して生産されたペプチダーゼであると記載してございます。

宿主及び構造遺伝子の供与体である *S. violaceoruber*、プロモーター及びターミネーターの供与体である *S. cinnamoneus* 並びにチオストレプトン耐性遺伝子の供与体である *S. azureus* は、毒素産生性及び病原性は知られておらず、国立感染症研究所安全管理規程においてバイオセーフティレベル 1 に該当すると記載してございます。

II、食品健康影響評価についてでございます。

1 番、pXPO 株の作製については、宿主は *S. violaceoruber* 1326 株であるとし、挿入 DNA は *S. violaceoruber* NBRC15146 株由来のペプチダーゼ構造遺伝子に *S. cinnamoneus* NBRC12852 株由来のプロモーター及びターミネーターを結合したものであるとしてございます。

以下については、発現プラスミド pXPO について記載してございますが、こちらは先ほどの pSSA 株と同様に記載してございます。

2 番、pXPO 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在するか否かについて記載してございまして、こちらも pXPO 株の作製に使用された *S. violaceoruber*、*S. cinnamoneus* 及び *S. azureus* について、先ほどの pSSA 株と同様に記載してございます。

17 ページにまいりまして、結論といたしまして、以上の結果から、本添加物については、「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」の「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないと判断したとしております。

以上です。

○澤田座長 ありがとうございます。

ただ今の評価書案につきまして、御意見、コメントをいただきたいと思います。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。一括で御意見、コメント、ありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、御承認いただいたということで、いただきました微修正と、それから幾つか確認すべき点がございまして、それはやはりメール等で御確認いただきたいと思います。その後、事務局で修正した後、私のほうで確認して、食品安全委員会に御報告いたしましてパブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、議題（1）についてはこれで終わりにしたいと思います。

議題（2）のその他でありますけれども、事務局から何かありますでしょうか。

○北村課長補佐 机上配布の資料で、「セルフ/ナチュラルと判断された添加物一覧」の案というものをお配りしてございます。そちらを御覧いただきたいのですけれども、先日、調査会でも御審議いただきましたが、厚生労働省で組換え DNA 技術応用食品に関する告示の改正の手続を行うことになっておりまして、セルフ/ナチュラルについては一定の判断基準を設けまして申請者自ら判断できることとすることになってございます。その参考として一覧表をまとめてございます。これは食品安全委員会で評価したものの一覧で、セルフクローニングが4件とナチュラルオカレンスが8件ございます。

ナチュラルオカレンスの方を御覧いただきたいのですけれども、宿主、ベクターの由来、プロモーター、挿入遺伝子、ターミネーターの由来、その他の挿入遺伝子の由来を記載してございます。厚生労働省の判断基準の方では、ナチュラルについて宿主が属する種及び供与体が属する種の組み合わせについて、食品安全委員会が「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当すると判断したものとされておりますので、これらの組み合わせであれば自主的に判断できるという形になろうかと思っております。こちらについて、記載方法や内容について何か御懸念、御意見等があればお伺いしたいと思っております。また後ほどメール等でもお送りいたしますので、御確認をお願いできればと思っております。

○澤田座長 これはホームページか何かで公開する予定ですか。

○北村課長補佐 告示が改正されましたら公開したいと思っております。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、本日の議題についてはこれで終了いたしました。

以上をもちまして、第124回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会いたします。

どうもありがとうございます。