

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第166回) 議事録

1. 日時 平成29年10月27日(金) 13:59～14:45

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)

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

・RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、岡田専門委員、小関専門委員、橘田専門委員、
児玉専門委員、近藤専門委員、鈴木専門委員、柘植専門委員、
手島専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(専門参考人)

澤田専門参考人

(食品安全委員会)

佐藤委員長、山添委員

(事務局)

小平事務局次長、吉岡評価第二課長、池田評価情報分析官、
内海課長補佐、森山評価専門官、山口係長、松井技術参与

5. 配布資料

資料1 食品健康影響評価に関する資料

RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン

資料2 「食品安全委員会における調査審議方法等について」にかかる確認書について

6. 議事内容

〇〇〇 数十秒早い気もするけれども、皆さんがおそろいのようなので、ただいまから第166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ございますように「食品安全委員会の公開について」のルールに基づいて非公開で行います。

本日は所用により〇〇〇は御欠席です。

〇〇〇に御出席いただいております。先生がそこにいらっしやるだけで安心いたします。

本日の議題ですが、継続審議品目である「RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン」の安全性についての審議です。ことしの5月の第160回調査会で審議されたもので継続となります。

それでは、お手元の資料の確認をいたします。事務局のほうからお願いいたします。

〇〇〇 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1「食品健康影響評価に関する資料」。

資料2「『食品安全委員会における調査審議方法等について』にかかる確認書について」となっております。

なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルにとじまして、委員の皆様の上の上に置かせていただいております。本ファイルにつきましては、調査会終了後に回収させていただきます。次回また配布いたします。不足等がございましたら、事務局までお知らせいただければと思います。よろしいでしょうか。

〇〇〇 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、御報告をお願いします。

〇〇〇 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きまして、御報告いたします。

本日の議事に関しましては、配布資料2のとおり、専門委員の先生方からいただいた確認書を確認しましたところ、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。

〇〇〇 御提出いただいた確認書について、相違等、変更等はございませんでしょうか。

(「はい」と声あり)

〇〇〇 それでは、継続審議品目である「RFESC02株を利用して生産されたりボフラビン」について審議を行いたいと思います。先ほど申しましたとおり、本品目は平成29年5月の専門調査会において審議を行い、幾つかの指摘事項をいただいたものです。

では、事務局のほうから御説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、申請者から提出をされております回答書の御説明をさせていただきます。お手元にファイルを御用意いただきまして、おめくりをいただいて、上から順に御説明いたします。

指摘事項の1としまして、宿主を *Bacillus subtilis* の BS5596株としていましたけれども、これがベクター由来のDNAが染色体に挿入されている組換え体ということで、宿主として

は適切ではないことから、野生株または他の適切な中間菌株を宿主として設定し直すこと、また、それに伴って申請資料の他の関連事項も修正することという指摘をいただいております。このBS5596株というのは、2001年に厚生労働省において安全性審査を終了したりボフラビンの生産菌株でございます。

この菌株をスタートにして資料を構成しておったのですけれども、これは組換え体ということで、申請者の回答によりますと、野生株である168株より変異剤を用いた化学変異及び自然変異によって得られたRB50株を宿主として申請資料全体の記載の修正がなされております。ちなみにこのRB50株というのは、先ほど御紹介した、既に安全性申請済みのリボフラビンの申請資料においても同様に宿主として設定をされていたものです。これに伴いまして、申請資料の全体が修正をされております。かつ、このBS5596株の構築に用いられたベクター等が全て資料に盛り込まれておりまして、関連文献であるとか宿主への導入の概要等々が追記をされております。

続きまして、指摘事項の2になります。製造方法において、リボフラビン粗結晶画分を分離した旨の記載があるが、結晶化工程がある場合には明記をし、精製工程を詳しく説明をすることという指摘をいただいております。これに対する回答としまして、本リボフラビンは粗リボフラビン、純度96%以上とありますが、これをろ過、結晶化及び分離により精製した後、再度ろ過の工程を経て、再結晶化することによって精製をされるということで、おめくりいただいて、黄色でハイライトをした記載が申請資料のほうに追記をされてございます。

続きまして、指摘事項の3になります。挿入遺伝子の機能に関する事項において、アミノ酸残基が1つ置換した低活性型トランスケトラーゼの機能について記載をされておりますけれども、この変異が同定された経緯及びそれがもたらす効果について、根拠となる文献等を引用して説明することという指摘をいただいております。

これに対する回答ですが、本トランスケトラーゼのアミノ酸置換は、申請者の研究チームによって同定をされたものということで、特許としても報告をされているとのことです。リボフラビンの生合成を増加させるためには、中間体でありますリブローズ-5-リン酸及びリボース-5-リン酸がペントースリン酸回路の代謝によって消失することを軽減させ、これらの中間体がリボフラビン生合成の方向へ優先的に流れるようにする方法が考えられましたが、このペントースリン酸回路の代謝を触媒する酵素であるトランスケトラーゼのノックアウト変異を有する宿主は、同時に芳香族アミノ酸要求性等の安定的な工業生産においては好ましくない特徴を持つことが報告されていたため、これらの欠点を持たず、かつ、リボフラビン高生産となるトランスケトラーゼ変異の探索を行い、その結果として、この菌株の構築に用いた●●●変異を含む幾つかのトランスケトラーゼのアミノ酸変異の発見に至ったとのことです。これらの背景及び変異の効果について、以下、黄色でハイライトをしている記載部分として追記がされてございます。

続きまして、指摘事項の4、宿主への導入方法に関する事項についてです。まず①とし

て、この生産菌株の構築過程が非常に多段階にわたるため、生産菌のゲノムが宿主のゲノムからどのように変わっているのかがわかるように図示をすることということで、申請者からの回答としまして、BS●●●株からRFESC02株の構築におけるゲノムの変更箇所を以下のとおり図示をしたということで、図11として示されています。さらに、宿主株、中間株、最終生産菌株の染色体構造の比較を次のページの表8として申請書に追記がされてございます。

続いて②ですけれども、宿主のゲノムに組み込まれたベクターpRF69及びpRF93を脱落させる工程をプラスミドの除去と記載しているが、プラスミドではなくなっているため、適切に修正すること、また、脱落させた配列の説明を追記することということで、申請者の回答としまして、この記載をpRF69及びpRF93由来の挿入DNA断片の除去という形に改められております。また、これらの挿入DNA断片を除いた中間株でありますBS●●●株の染色体構造の概略を以下のとおり図示をして追記をしてございます。その他の主要な中間株につきましても、染色体構造の概略図が各所に追記をされてございます。

続いて、指摘事項の5になります。遺伝子導入に関する事項において組換え体上のゲノムの変化が意図したとおりになっていることをサザンブロットやゲノムシーケンスにより説明することという指摘事項をいただいておりますが、この回答としまして、ゲノムシーケンス解析により、意図したとおりのゲノム変化が最終生産菌株で起こっていることを確認している。また、中間株であるBS5596株に挿入されていたプラスミド由来の挿入DNA断片が全て除かれている。構築過程で用いられた抗生物質耐性マーカー遺伝子が最終生産菌株に残存していないこともサザンハイブリット分析等によって確認をしている。さらにゲノムシーケンスで得られた配列をもとに作成した挿入DNAの制限酵素による切断地図を追加の資料として提出されてございます。さらに、新規のオープンリーディングフレームの有無の検索は、このホールゲノムシーケンスで得られた配列を用いて行われておりますので、その旨の追記がされてございます。これらは下にお示しをしている黄色でハイライトしてございます箇所になります。

続きまして、指摘事項の6になります。製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項において、この非有効成分の含有量が比較対象とする従来の添加物に比べ有意に増加しておらず、かつ従来の添加物には存在しない非有効成分を含有しないこと。また、非有効成分について、安全性に問題がないと判断できることを合理的に説明することという指摘がなされております。

回答の前に若干この指摘の背景を御説明申し上げますと、通常、アミノ酸やビタミンのような非タンパク質性の低分子化合物に関しては、高度精製添加物に当たるかどうかということでの評価をいただいております。その際は、従来の比較対象となる添加物と比較して、その従来品に存在しない非有効成分が含まれないことであるとか、仮に含まれたとしても、同定をして安全上は問題がないものであることの確認を求めています。

一方で、申請者はあくまでこの品目について、高度精製添加物としてではなくて、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に基づく評価、いわゆるフル評価を希望しているということで、先ほど申し上げたような非有効成分の同定といった分析は行わず、代わりに今回の回答に至っているという背景がございます。

回答の概要を御説明しますと、このリボフラビンは食品添加物の公定書規格に適合することはもちろんですが、欧州で製造されるものでして、これが欧州の薬局方の公定規格にも適合しているということでございます。さらにこの生産菌の製造過程におきまして、安全上懸念となるような新たな非有効成分が生じる可能性は低いということでの説明になっております。下の黄色のハイライト部分でございますけれども、①としまして、挿入遺伝子等により新たな有害成分が生じる可能性は低いと考えられるという、もともと申請書の前段部分で説明されている内容をここに再掲をしております。

②になりますけれども、欧州薬局方の定める不純物規格ということで、具体的には右のページの表9になります。リボフラビンの類縁物質としまして、4種類それぞれ規格値が定められております。このうち、類縁物質Aにつきましては、日本の食品添加物公定書規格でも設定をされているものになります。さらに、下から2段目になります。不特定の不純物ということで、これは不純物毎に上限値として0.1%以下という規格。それから最下段は、先ほど御紹介した類縁物質も含めた総不純物が0.5%以下という規格になっております。これらの規格が定められていることで、生産宿主等に由来する不純物についても一定の量の制限があり、同規格値以下であれば、安全上は問題ないという考え方で説明がなされております。

続きまして、指摘事項の7になります。申請資料において形質転換法、形質導入法、PBS1フェージによる形質導入法、あるいはマーカーフリー遺伝子導入法といった、いろいろな用語が用いられているのですが、これらの定義が不明瞭なので、それをきちんと明確にして申請書に記載をすることという御指摘をいただいております。

これに関しまして、ページをめくっていただきまして、まず形質転換法に関してはいわゆるコンピテントセルを使った形質転換法であるということをご定義いただき、その1段落下になりますけれども、形質導入法とPBS1フェージによる形質導入法というのは同義であること。この中ほどの「また」以降になりますけれども、マーカーフリー遺伝子導入法というのは、菌株の構築過程で一時的に抗生物質耐性マーカー遺伝子を用いて、他方で最終的にはこれを除去し、構築された生産菌株にはマーカー遺伝子が残らないようにする手法を端的に述べる言葉として使っていたということなのですが、この文言の使用を改めまして、具体的にはこの操作の際に抗生物質耐性マーカー遺伝子が一時的に用いられたが、マーカー遺伝子は最終生産菌株からは除去されているという記載とさせていただきます。

以下の修正事項は記載整備上の修正になりますので、説明は割愛をさせていただきます。

以上が申請者からの回答になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、各指摘事項に関する回答書につきまして、先生方から御意見をいただきたい

と思います。指摘事項の1は、13ページで宿主の種名、株名及び由来につきまして、これは〇〇〇の御指摘でありました。

〇〇〇 宿主を変えるようにという指摘を出しまして、一応、前と同じような宿主を選んで、記載整備的な内容はきちんと書かれておりますので、これで問題ないと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。ほかに先生方はよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項の2番目、製造方法について、これも〇〇〇からの御指摘です。

〇〇〇 これは単純で、これで結構だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、指摘事項の3番目、挿入遺伝子の機能に関する事項で、これは〇〇〇だったのですが、きょうは〇〇〇はいらっしゃらないですね。私もこれは精査してみましたけれども、要するに低活性型のトランスケトラーゼについての説明をということ、中間体のリブローズ-5-リン酸がペントースリン酸回路の代謝で消失されるのを軽減しているということで、この意義について明確に説明してあるなと思いますので、私はこれでいいかなと思うのですけれども、先生方はよろしいでしょうか。では、よろしいようなので、次に行きます。

指摘事項の4番目、DNAの宿主への導入方法に関する事項で、構築方法とベクターの除去に関して、2つございます。これは〇〇〇と〇〇〇です。〇〇〇から。

〇〇〇 ちょっとわかりにくいところがありまして、そこら辺をきちんと書くようにという指摘だったのですけれども、複雑なことは変わりなくて、なかなか時間が必要なところがありましたが、一応きちんと書かれていると私は理解しました。

〇〇〇 〇〇〇のおっしゃるとおり、複雑さは変わらないし、図の番号も行ったたり来たりしていますけれども、それを統一し直そうと思うと大幅に改編しなければいけなくなりますので、これでよろしいかと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。ほかに先生方、よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項の5番目、遺伝子の導入に関する事項ということで、これは〇〇〇の御指摘です。

〇〇〇 このところでデータによって説明しろと言っているのですけれども、全ゲノムをやっていますので、それを出していますので、これはそれで答えになっているのだと私は認識しております。

〇〇〇 ありがとうございます。私も同じように感じておりました。先生方、これはよろしいでしょうか。ありがとうございます。

指摘事項の6番目、実はここがそれなりに問題のあったところでございまして、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項ということで、これは事務局のほうから御説明をいただきましたけれども、宿主のほう有害成分が生じる可能性がないことと、欧州のヨーロッパの規格、不純物規格に適合していると説明をしてございます。これも一つは〇〇〇のほうから。

〇〇〇 欧州の局方はこの宿主でつくったりボフラビンも念頭に置いて、こういう記載になっているのかなと思います。それと不純物は大きくずれていないと思いますので、私はこのA、B、C、Dを最低押さえるということでもいいのかなと思いました。

〇〇〇 ありがとうございます。〇〇〇。

〇〇〇 私もこの回答でよろしいかと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。私もこういうふうに説明していただければ、安全性は担保できるかなと考えるのですが、先生方はよろしいでしょうか。

それでは、指摘事項の7、形質転換法、導入法などの用語の定義を明確にしてくれということで、これは〇〇〇のほうから。

〇〇〇 複数のワードが使われていて、定義なしに書かれていたのでちょっと混乱したところがあったのですが、今回きちんと定義されて、どういう状態のものでどういふふうに遺伝子を入れているかがはっきり書かれていますので、これでよろしいかと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。私も読みやすくなっているなと思えました。先生方から御意見はございますでしょうか。

それでは、本申請の全体を通して、先生方から御意見はございますでしょうか。

それでは、本件につきましては、特に安全上の問題はないということでありますので、引き続き評価書案の審議に入りたいと思えます。事務局のほうから御説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、お手元に資料1を御用意ください。6ページから御説明を申し上げます。

「I. 評価対象添加物の概要」です。名称、用途等は記載のとおりでございます。

本添加物は、リボフラビンの生産性を高めるために *Bacillus subtilis* 168株の突然変異株であるRB50株を宿主として、変異型トランスケトラーゼ遺伝子の導入、改変リボフラビン生合成遺伝子群、以下、改変 *rib* オペロンと言いますが、これの導入、自然変異型フラボキナーゼ遺伝子の再導入及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失を行って作製されたRFESC02株を利用して生産されたりボフラビンです。改変 *rib* オペロンは、*Bacillus subtilis* のバクテリオファージSP01由来のプロモーター及び改変5'リーダー配列並びにリボフラビン生合成遺伝子より構成されます。本添加物は、栄養強化または着色の目的で、菓子及びスポーツ飲料等の食品に利用されているとしております。

「II. 食品健康影響評価」です。

「第1. 安全性において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違」です。

1. 従来の添加物ですが、名称はリボフラビン（ビタミンB₂）、基原は化学合成または *Eremothecium ashbyii*、あるいは *Ashbya gossypii* 等の宿主による発酵法となっております。

(2) 製造方法、(3) 用途及び使用形態、(4) 摂取量は記載のとおりです。

続いて7ページ、「2. 宿主及び導入DNA」です。

(1) 宿主は*B. subtilis* RB50株です。このRB50株は野生株であります168株のリボフラビン及びプリン生産調節が解除された突然変異株であるとしています。

(2) DNA供与体ですが、変異型トランスケトラーゼ (*tkt*) 遺伝子及び自然変異型フラボキナーゼ (*ribC*) 遺伝子の供与体は、いずれも168株由来の株です。改変*rib*オペロンのプロモーターP_{SP015}及び5'リーダー配列、以下、P_{SP015}-改変リーダー配列と言いますが、この供与体はそれぞれバクテリオファージSP01株及び168株由来の株です。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法です。変異型*tkt*遺伝子は、アミノ酸残基1つが置換された低活性型トランスケトラーゼを発現する。自然変異型*ribC*遺伝子は、自然変異により宿主中に存在し、野生型フラボキナーゼのアミノ酸残基が1つ置換された変異型フラボキナーゼを発現する。P_{SP015}-改変リーダー配列は、バクテリオファージSP01由来のプロモーターP_{SP015}に改変5'リーダー配列を連結させ、下流のリボフラビン生合成遺伝子を恒常的に発現させる。

中間株でありますBS5596株、これは2001年に安全性審査が終了しているリボフラビンの生産菌株ですが、この*rib*オペロン領域及びバチロペプチターゼF (*bpr*) 遺伝子領域に導入されておりましたプロモーターP_{SP015}を野生型プロモーターと置換または追加挿入した*rib*オペロン、以下、修飾型*rib*オペロンと言いますが、これを含むプラスミドpRF69及びpRF93由来の挿入DNA断片は、相同組換えにより宿主ゲノムから除去し、同領域を野生型に回復した。目的DNA配列は、形質転換法及びPBS1ファージによる形質導入法により、宿主ゲノムに導入した。

3. 宿主の添加物製造への利用経験または食経験、4. 宿主の構成成分等については記載のとおりです。

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等ですが、製品名がリボフラビンユニバーサル、有効成分はリボフラビンです。

(2) 製造方法ですが、RFESC02株を生産菌として、培養、滅菌、結晶化及びろ過等の工程を経て製造される。生産菌は熱処理による滅菌後、分離・除去される。なお、最終製品の純度は98.0%以上101.0%以下である。

(3) 用途及び使用形態、(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較ですが、いずれも従来のリボフラビンと同様としております。

「6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点」です。

(1) ですが、リボフラビンユニバーサルと従来のリボフラビンとの相違点はございません。

(2) 組換え体と宿主ですが、RFESC02株と宿主との相違点は、リボフラビン生合成遺伝子の5'リーダー配列がプロモーターP_{SP015}により恒常的に発現するように改変されている点、野生型*tkt*遺伝子が変異型*tkt*遺伝子に置換され、リボフラビン生合成の中間体の代

謝が抑制されている点及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群が不活化され、発酵中における粘度削減が図られている点でございます。

以上1～6から、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第2以下の各事項について評価を行った。

「第2. 宿主に関する事項」です。

1. 分類学上の位置づけ、2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関しましては、記載のとおりです。

3. 寄生性及び定着性、4. 病原性の外来因子に汚染されていないこと、5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項は記載のとおりです。

「第3. ベクターに関する事項」です。

1ですが、中間株でありますBS5596株へ導入されたpRF69及びpRF93の構築には、*E. coli*由来のプラスミドpUC19が、BS5596株の作製過程で一時的に用いられたプラスミドpKT2-tet及びpRF82の構築には、*E. coli*由来のプラスミドpUC18がそれぞれ用いられました。なお、いずれのプラスミドの配列も生産菌中には残存しておりません。

「2. 性質に関する事項」は記載のとおりです。

次のページになります。「第4. 挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項」です。

「1. 挿入DNAの供与体に関する事項」は、先ほど御説明をしたとおりです。

「2. 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」です。

(1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法ですが、変異型 *tkt* 遺伝子は168株由来の株の染色体DNAを鋳型として変異導入PCR法により得ております。P_{SP015}-改変リーダー配列は、改変 *rib* リーダー配列及び野生型 *rib* オペロンを有する168株由来の株を鋳型としてPCRにて合成しております。自然変異型 *ribC* 遺伝子は、168株由来の株が有するバクテリオファージPBS1を感染させることで得ております。

(2) ですが、挿入DNAの塩基数、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おります。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」です。

「①変異型 *tkt* 遺伝子」ですが、事前にお送りしているものから若干記載整備を行ったことから、変更した部分を下線にしてお示ししております。アミノ酸残基が1つ置換した低活性型トランスケターゼが発現することにより、リボフラビン生合成の中間体の代謝が抑制され、その結果、リボフラビン生合成を増加させる。

「②P_{SP015}-改変リーダー配列」は、バクテリオファージSP01由来の強力なプロモーターP_{SP015}に改変5'リーダー配列が連結され、下流のリボフラビン生合成遺伝子の恒常的発現を誘導する。

「③自然変異型 *ribC* 遺伝子」は、アミノ酸残基が1つ置換した変異型フラボキナーゼが

発現することにより、リボフラビン生合成の抑制機構が解除され、リボフラビンの生合成が増加する。生産菌の構築過程で野生型に回復した*ribC*遺伝子を再置換するためのものとなっております。

次のページです。これらの挿入遺伝子の産物が有害作用を持つという報告はありません。また、これらはリボフラビンの生合成または代謝経路で働くものであり、それらの産物がそのまま添加物として使用されるものではないとしております。

「3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項」です。

(1) プロモーターですが、改変*rib*オペロンのプロモーターは、バクテリオファージSP01由来のP_{SP015}プロモーター配列となっております。

(2) ですが、新たなターミネーターは挿入されておられません。

(3) その他ですけれども、リボフラビン生合成遺伝子の発現を増強するため、改変5'リーダー配列が挿入されております。

「4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」です。中間株であるBS5596株の構築過程で、プラスミドpRF69及びpRF93を用いましたが、生産菌からはこれら由来の挿入DNA断片は除去されています。BS5596株以降の構築過程においては、PCRにより合成された挿入DNA配列を、形質転換法及びPBS1ファージによる形質導入法により宿主に導入しております。

5. ですけれども、発現用ベクターは使用されておられません。

「6. DNAの宿主への導入方法に関する事項」です。宿主の*rib*オペロン領域及び*bpr*遺伝子領域に、修飾型*rib*オペロンを含むプラスミドpRF69及びpRF93をそれぞれ複数コピー導入し、中間株であるBS5596株を得ております。この株をランダム変異処理し、黄色を呈するコロニーを選択することにより、リボフラビン高生産株を得た後、抗生物質耐性マーカー遺伝子カセットを用いた形質転換法及びPBS1ファージによる形質導入法により、野生型*tk*遺伝子の変異型*tk*遺伝子への置換、プラスミドpRF69及びpRF93に由来する挿入DNA断片の除去、これにより*rib*オペロン領域*bpr*遺伝子領域が野生型へと回復しております。さらにリボフラビン生合成遺伝子上流へのP_{SP015}-改変リーダー配列の導入、ポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失、野生型*ribC*遺伝子の自然変異型*ribC*遺伝子への再置換、抗生物質耐性マーカー遺伝子の除去を行い、最終的にRFESC02株を得ております。

「7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」です。

生産菌株構築の過程で、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ネオマイシン及びエリスロマイシン耐性遺伝子が使用されておりますが、全て生産菌からは除去されております。サザンブロット分析により、生産菌中にこれらの抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことを確認しております。

「第5. 組換え体に関する事項」です。

「1. 宿主との差異に関する事項」ですが、RFESC02株は、*rib*オペロン領域へのP_{SP015}-

改変リーダー配列の導入、*tkt*遺伝子の変異導入及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失により、リボフラビンの高生産能を有する点で宿主と異なります。

「2. 遺伝子導入に関する事項」です。

(1) ですが、挿入DNAの制限酵素による切断地図は明らかになっております。また、サザンブロット分析及びゲノムシーケンス解析の結果、宿主ゲノム上で意図した変化が生じていることを確認しております。

「(2) オープンリーディングフレームの有無並びに転写及び発現の可能性に関する事項」です。挿入DNAと宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じるORFの有無を調べるために、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行いました。その結果、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFは、変異型*tkt*遺伝子及び自然変異型*ribC*遺伝子のアミノ酸変異を導入した部位を跨ぐ領域で、それぞれ4個及び3個、P_{SP015}-改変リーダー配列の挿入領域で7個が見出されました。

これらのORFと既知のアレルゲンとの同一性の有無を確認するために、データベースを用いて同一性検索を行った結果、80アミノ酸残基で35%以上及び連続した8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められませんでした。さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との同一性の有無を確認するためにデータベースを用いて同一性検索を行った結果、同一性を示す既知のタンパク質は認められませんでした。

次のページ、「第6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項」です。

1. 添加物の製造原料または製造器材としての使用実績、2. 添加物の製造原料または製造器材としての安全性に関する知見、いずれも実績があり、問題ないとされております。

「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」です。リボフラビンユニバーサルは、2010年に米国においてGRASとして認証されているほか、EU、カナダ、オーストラリア及びニュージーランドにおいて使用が認められております。

「2. 組換え体の残存に関する事項」ですが、リボフラビンユニバーサル中の組換えDNAの残存を定量PCRにより分析した結果、検出限界以下であった。

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」ですが、リボフラビンユニバーサルは、欧州薬局方で規定されている不純物（リボフラビンの類縁物質4種、類縁物質以外の不特定の不純物及び類縁物質を含む総不純物）の規格値に適合することを確認している。

「4. 精製方法及びその結果に関する事項」ですが、リボフラビンユニバーサルは、培養液中に分泌され、粗ろ過、結晶化、除菌ろ過、濃縮等の精製工程を経て製造されるため、安全性に問題のある物質が混入するとは考えにくい。

「5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項」ですが、リボフラビンユニバーサルにおいて、含有量の変動により有害性が示唆される常成分は知られておりません。

第8. ですが、第2から第7までの事項により安全性の知見は得られているとしております。

以上、評価書案の御説明になります。

〇〇〇 それでは、評価書案について御意見、コメントを賜りたいと思います。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っております。それほど大部ではございませんので、全体を通して御意見がございましたら賜りたいと思います。ございませんでしょうか。

よろしいようですので、それでは、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思っております。

それでは、本日の審議案件はこのリボフラビンの件だけですので、議題（1）についてはこれで終わりたいと思っております。

議題（2）「その他」ですが、事務局のほうから何かございますでしょうか。

〇〇〇 特にはございません。

〇〇〇 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166回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。御協力ありがとうございました。