

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第208回) 議事録

1. 日時 令和3年2月26日（金） 13:59～17:17

2. 場所 食品安全委員会中会議室（赤坂パークビル22階）
（Web会議システムを利用）

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

- ・ JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼ
- ・ JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼ
- ・ 収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）（食品、飼料）

(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、小野専門委員、手島専門委員、
山川専門委員

（食品安全委員会）

佐藤委員長、川西委員

（事務局）

小川事務局長、鋤柄事務局次長、石岡評価第二課長、蛭田評価情報分析官、
松原課長補佐、山口係長、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

- ①JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼ
- ②JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼ
- ③収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）（食品）
- ④収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）（飼料）

6. 議事内容

〇〇〇 皆さんおそろいようですので、ただいまから第208回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、開催いたします。

本調査会、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」に基づいて非公開で行います。

また「テレビ会議又はWeb会議システムを利用した食品安全委員会等への出席について」に基づいて、ウェブ会議システムを利用して行います。

本日、所用により〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、御欠席です。

本日の議題ですが、いずれも新規品目でありまして、JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼ、JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼ、それから、収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）についての安全性についての審議です。

それでは、お手元の資料を確認いたします。事務局のほうからお願いいたします。

〇〇〇 議事次第に基づき、配付資料の確認をさせていただきます。

配付資料は、議事次第、専門委員名簿、「食品健康影響評価に関する資料」、机上配布資料となっております。

また、本日はJPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼの申請者であるノボザイムズジャパン株式会社及びDSM株式会社、JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼの申請者であるノボザイムズジャパン株式会社並びに収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）の申請者であるコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の方をそれぞれ呼びしております。申請品の審議の際に質疑応答等に対応していただくことを予定しております。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、事務局ほうから「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づきまして、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報告をお願いいたします。

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いて御報告いたします。

本日の議事に関しまして、専門委員の先生方から頂きまし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。

〇〇〇 ありがとうございます。

既に御提出いただいております確認書について、その後、相違等ございませんでしょう

か。

それでは、審議に入る前に、例によってウェブ会議における注意事項があるそうなので、事務局より説明をお願いいたします。

〇〇〇 本日はウェブ会議形式で行いますので、注意事項をお伝えいたします。

1点目、発言者の音質向上のため、発言しないときはマイクをオフにしてくださいようお願いいたします。

2点目、発言の際は赤い挙手カードの提示をお願いいたします。その際、座長より呼びいたしますので、マイクをオンにしてお名前を発言していただきました後、御発言をお願いいたします。座長より指名がない場合は、直接マイクから呼びかけていただきますようお願いいたします。発言の最後には「以上です」と御発言いただき、マイクをオフにしてくださいようお願いいたします。

3点目、音声接続不良時、通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにすることや再入室をすることにより改善する場合もございます。マイクが使えない場合はウェブ会議システムのメッセージ機能によりお知らせください。万が一、全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話をくださいますようお願いいたします。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますが、事前に送らせていただきました青い同意カードを挙げていただく、もしくは手で丸をつくるなどで意思が分かるようお願いいたします。

以上がウェブ会議における注意事項となります。どうぞよろしくお願いいたします。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

対面の会議と違いますので、御発言のあるとき、よろしく御面倒ですがお願いいたします。

それでは、初めに、新規品目でありますJPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼについて審議を行いたいと思います。

事務局のほうからよろしく。

〇〇〇 それでは、JPTR003株のムラミダーゼの説明をさせていただきます。資料の御準備をお願いいたします。

それでは、説明をさせていただきます。

まず1ページ、「はじめに」のところでございますが、このムラミダーゼにつきまして、2段落目のところを御覧ください。今回、飼料添加物としてのみの申請となっております。

本飼料添加物を利用する目的でございますが、対象家畜である鶏の飼料に添加することにより、その増体性を向上すること。本飼料添加物を鶏用飼料に添加し、消化管内に滞留している難消化性の細菌由来のペプチドグリカンが分解されることにより、消化管内の他の栄養素の消化吸収が促進され、家畜の増体性が向上するといった目的で使われているものでございます。

次のページをお願いいたします。

第1-1- (1) 名称、基原及び有効成分でございます。名称につきましては、ムラミダーゼでございます。こちらは食品としては既に本基原、既出となっているもので、食品添加物としてムラミダーゼは指定されています。

こちら、基原が *Streptomyces coelicolor* というものから作られている peptidoglycan N-acetylmuramoylhydrolase というものでございます。反応特異性としてはペプチドグリカンのN-アセチルグルコサミン、N-アセチルムラミン酸の β -1,4結合を加水分解するといったものでございます。

続きまして、3ページ、第1-2、今回の宿主についてでございます。

今回の宿主は *Trichoderma reesei* QM6a株という糸状菌でございまして、腐朽した軍用繊維から見いだされたものでございます。

供与体につきましては、同じく3ページの表1でございます。有効成分は *lyzAA* 遺伝子というものでございまして、供与体としては *Acremonium alcalophilum* という菌類でございます。

こちらの組み込みにつきましては、4ページ目を御覧いただければと思います。4ページ目の図1でございます。

こちら、*T.reesei*のQM6a株を基に突然変異等を行わせた後に●●●遺伝子及び●●●遺伝子を欠失させてから *lyzAA/amdS* 遺伝子発現カセットを導入するといった形で生産菌を作っているといったところでございます。

続きまして、今回、生産菌を構築する過程で脱落する遺伝子につきましては、5ページの表2のとおりでございます。これら●●●全てマーカー遺伝子となっております。

続きまして、6ページの表3でございます。そのほか欠失させる遺伝子は●●●です。下の●●●につきましては、欠失される遺伝子で説明したとおり。上の●●●は、今回、この遺伝子座のところに inser ということ代わり落ちていく遺伝子ということでございます。

6ページ、それぞれの遺伝子の挿入につきましてでございます。

(1)、1) ●●●遺伝子座におけるDNA挿入でございます。

こちらにつきましては、まず1として、マーカー遺伝子発現カセット (FRT-F/FRT-F3配列を含む) の挿入でございます。こちらにつきましては、FRT-F3/FRT-F3配列は *lyzAA/amdS* 遺伝子発現カセットを宿主に挿入する際に、遺伝子導入用ベクターに組み込まれた●●●インテグラーゼが結合する配列でございます。ここに含まれているR配列につきましては、*Fusarium* A3/5株由来のノンコーディング配列でございまして、●●●遺伝子をループアウトさせるために挿入した繰り返し配列となっております。まずこれでマーカー遺伝子の発現カセットを入れた後に、2といたしまして *lyzAA/amdS* 遺伝子発現カセットを挿入するということとしております。

それぞれの遺伝子座に入れておりまして、次、8ページ、●●●遺伝子座におけるDNA

挿入でございます。

こちらは先ほどの●●●遺伝子と同じように操作をしようとしたところでございますが、こちらにつきましては、その●●●*lyzAA/amdS*遺伝子発現カセットが入るといったことになっておりまして、本来、●●●といったようになっております。

また、これにより●●●、この●●●には●●●遺伝子が存在する可能性というのがありますが、機能は未知又は推定タンパクであり、機能が確認されたタンパク質の遺伝子は存在していないということでございます。

続きまして、9ページの下のところ、第1-3、宿主の添加物製造への利用経験もしくは食経験に関する資料というところでございます。

こちら、*T.reesei*につきましては、家禽・家畜の飼料用のセルラーゼ生産菌として長年使用されてきている実績があります。このときにQM6a系統株も40年以上使用されてきた実績がございます。

次のページ、10ページの第1-4、宿主の構成成分等に関する資料でございます。

この宿主の*T.reesei*につきましては、病原性及び有害生理活性物質を生産するというところは知られておりません。また、*T.reesei*が酵素製造における発酵過程でマイコトシキンを産生したという報告もございませんということでございます。

続きまして、12ページを御覧ください。

第1-6、遺伝子組換え添加物と従来添加物の相違点でございます。こちら、従来の添加物につきましては食品添加物としてのムラミダーゼということでございます。こちら、従来のムラミダーゼにつきましては食品添加物で、20年の販売実績があるといったものでございます。あと相違点でございますが、*T.reesei* QM6a株と比較してJPTR003株が獲得した、または欠失した形質につきましては、下の表5のとおりでございます。

以上が第1でございます。

続きまして、第2に参りたいと思います。

13ページ、第2-1から第2-2につきましては、すでに説明させていただいたとおりでございます。

第2-3、寄生性、定着性に関する事項については知られておりません。

第2-4、病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項につきましては、こちらにも汚染されているといった報告はございません。

また、第2-5、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につきましては、近縁の株におきましては、臓器移植後の患者やHIV感染者等、免疫機能が抑制されている場合において日和見感染するといったことが知られているという程度でございます。

15ページ目に参りまして、ベクターについてでございます。

今回使用したベクターについては、pUC19というものでございまして、こちらは大腸菌由来のプラスミドベクターでございます。人に対する有害性は知られておりません。

こちらの制限酵素切断地図については、下の図7のとおりでございます。

続きまして、17、第4、挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターに関する事項でございます。

まず17ページの第4-1- (2) 供与体の *A.alcalophilum* でございます。こちらは中温性でアルカリ耐性のカビでありまして、こちらはアルカリ性の条件でセルロースを分解する唯一のカビとして知られているものでございます。また、こちら、 *amdS* 遺伝子を導入した *Aspergillus nidulans* の食経験につきましては特に知られているものではございませんが、通常の変換マーカー遺伝子として長年使われていた実績があるもので、食品用酵素の生産菌として広く利用されているものでございます。

続きまして、18ページの第4-2、挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項のところでございます。 *lyzAA* 遺伝子につきましては、CBS114.92株由来の *lyzAA* 遺伝子を基に合成して得られた *lyzAA* をコードする遺伝子を基に合成することによって得られております。

続きまして、19ページでございます。この *lyzAA* のアミノ酸配列は図8のとおりでございます。こちらは既存の食品添加物のムラミダーゼとの相同性につきましては●●●となっております。 *lyzAA* についての毒性を示唆する報告もございません。

続きまして、20ページをお願いいたします。第4-3- (3) でございます。35行目のところからです。その他、挿入遺伝子発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであるということでございますが、プロモーター、ターミネーターのほかに *FRT-F/FRT-F3* 配列を組み込んでおります。こちらの供与体となっている *S288C* 株でございますが、こちら、パン酵母やアルコール発酵用の酵母として食品製造に長年使用されてきたといったものでございます。

21ページのR配列でございますが、こちらは *Fusarium* 属のA3/5株由来のノンコーディング配列というものになっておりまして、20年以上にわたって海外で食品用マイコプロテインの産生に使われていて、安全なタンパク質の発現系となっております。

22ページをお願いいたします。構築された発現ベクターに関する事項でございます。こちらのベクターである *pJPV025* の構成につきましては、図10のとおりでございます。構成要素につきましては23ページの表6のとおりとなっております。

24ページ、第4-5- (2) 目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないことに関する事項でございます。今回使っております発現ベクターは *lyzAA/amdS* 遺伝子発現カセットのみを宿主ゲノムに挿入するといったものでございますので、遺伝子挿入により宿主に導入される領域は明らかとなっております。こちらはシーケンス解析によって確認しております。したがって、このベクター、 *pJPV025* 全配列を対象としたORFの解析は実施をしておりませんということでございます。

24ページの下のところ、第4-7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項で

ございます。このベクターはアンピシリン耐性遺伝子を持っておりますが、宿主の染色体には導入されてはおりませんということでございます。こちら、導入されていないことはシーケンス解析により確認しております。

25ページ、組換え体に関する事項に参ります。このJPTR003株のゲノム解析につきましては、次世代シーケンサーによって結果を確認しているといったところです。その結果につきまして、25ページの下の結果のところです。遺伝子導入用ベクターが導入され、*lyzAA/amdS*遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座に挿入された領域の構成及びその構成要素は次のページ以降に示しておりますが、また、そのシーケンス解析により●●●いることも明らかとなっていました。●●●には、●●●が確認された。しかしながら、いずれも機能は不明または推定タンパク質であり、発現または機能が確認された遺伝子は存在していなかったということが確認されております。

それぞれの今回組み込まれた遺伝子座の構成につきましては、26ページから28ページの表7から表9まででございます。

29ページに参りまして、第5-2- (2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項でございます。ORFの検索は、The European Molecular Biology Open Software SuiteのORF検索用プログラムを使用して行っております。それぞれにおきまして●●●のORFが確認されております。また、JPTR003株の染色体に残存する●●●及び●●●遺伝子座についても同様にORF検索を行っております。その結果、●●●のORFが検出されております。

30ページ目に参りまして、それらでデータベースと相同性を示すORFは、そのうち7個にまとめられております。それぞれにつきましては32ページ目からでございます。

ORF1につきましては、病原体で発現するタンパク質または病原性因子ではあるが、単独で毒性が報告されているタンパク質は1つも確認されております。

ORF2についても同様でございます。

ORF3でございます。こちら、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv株の全ゲノム解析で同定された推定タンパク質でございまして、このタンパク質自身の解析に関する報告はございません。

ORF4もORF1、ORF2と同じく毒性が報告されているタンパクは1つもございません。

ORF5でございますが、こちらは大腸菌CFT073株由来の全ゲノム解析で同定された推定アミダーゼでございます。こちらの大腸菌につきましては、尿路病原性大腸菌として知られているものでございますが、ここでアミダーゼが毒性を持っているといった報告はございません。

ORF6、先ほどのORF1、ORF2と同じでございます。

最後、ORF7でございますが、こちらはB細胞を不死化し、バーキットリンパ腫等を引き起こすEBVのホモログでございます。こちらのタンパク質自身が毒性を有するといった報告は出てきておりませんといったものでございます。

35ページ、第6でございます。組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項でございます。製造に用いられている発酵原料、精製・濾過助剤、安定化及び製剤化原料を含む全ての原材料につきましては、どれも食品に使用されている品質のものであり、個々の原料の社内規格は米国FCC等の規格に基づいて設定されております。これらは、食品及び飼料用酵素の製造においても長い間安全に使用されてきているといったものでございます。

36ページ、諸外国での承認状況でございます。lyzAA製品につきましては、欧州においてEFSAによる評価が2008年にされているといったものでございます。また、米国でも鶏用飼料添加物としてGRASの評価を受けて使用されているといったところでございます。

最後、結論のところでございます。39ページをお開き願います。

結論、今回「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」の3により、遺伝子組換え飼料の安全性評価を行うに当たっては、この①～③についての可能性があるかどうかを考慮して、そのような可能性が想定される場合は、その飼料添加物を摂取した畜産物をヒトが摂取するわけですが、そのヒトに影響を及ぼす可能性がないかといったところに評価をするといったこととしております。今回、この①～③についての可能性がないと考えられる場合は、安全性評価は必要ないというようにしております。

この可能性がないかどうかといったところで、続いて、次、aからbで考察をされていきます。ここのa及びbにつきまして、事前に先生方にお送りしていた資料からちょっと修正がございますので、これについては昨日送付させていただきましたメールの中に添付させていただいております机上配布資料1を御覧いただければと思います。

修正箇所につきましては、この机上配布資料で下線を引いているところでございます。修正した主な理由としては、このbについては、もともとは畜産物のほうに移行することがないといったところから①～③を考えにくいというようにしているのですが、より丁寧に説明をするといった形に変わっております。読み上げさせていただきます。

まず(a)本飼料添加物の安全性についてということで、第1から第7までの事項により、遺伝子組換え微生物を利用して製造された本飼料添加物について、当該遺伝子技術によって作製された微生物が有害な物質を産生することはないと考えられる。したがって、本飼料添加物は長く安全に用いられてきた既存の食品添加物ムラミダーゼと同等に安全と考えられることから、本飼料添加物を摂取する家畜等への安全性の問題はないと結論したということで、bとして、上記①～③に示される可能性についてということで、前項のとおり、本飼料添加物は既存の食品添加物ムラミダーゼと同等に安全と考えられる。既存の食品添加物ムラミダーゼ及び本飼料添加物の有効成分であるlyzAAに関して、lyzAAが肉、乳、卵等の畜産物中に移行するという報告もないことから、上記①の可能性はないと考えられるということです。

また、特に第1、第2、第4及び第5・2・(2)に記載される情報・データから、本飼料添加物は有害物質ではなく、有害物質に変換されることもなく、そのため有害物質として畜産物中に蓄積されることもないと考えられる。したがって、上記②の可能性もないと考えら

れるということ。

また、加えて、及び第4-2-（3）作用機作の記載のとおり、本飼料添加物の機能はペプチドグリカンのN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の β -1,4結合を加水分解するものであるということから、ペプチドグリカンは細菌などの細胞壁を構成する物質であり、家畜の代謝系に直接関連するものではない。したがって、上記③の可能性もないと考えられるというように考察されております。

このことを考慮した結果、JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼを飼料添加物として家畜に給餌しても、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」の3に定める①～③の可能性は想定されず、本飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物を摂取することによるヒトへの健康に及ぼす可能性はないと考えられる。

したがって、改めて「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」に準じて評価する必要はない。本飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全性の問題はないと判断したというように申請者のほうは考察しているといったところでございます。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回は飼料添加物でして、だけれども、食品添加物のほうも先に出ていて、食品添加物のほうが比較対象になっているというなかなかレアなケースです。宿主の *Trichoderma reesei*、これは今までよく何回も出てきているものでして、セルラーゼ生産菌。強力なセルラーゼ遺伝子を持っていて、そのプロモーターを持っていますので、そのセルラーゼのプロモーターを使って今回はリゾチームを作っているということで、マーカーに使っている *amdS* も今まで何度も出てきているやつです。

あえて言うなら、染色体上の●●●に入れるつもりだったのだけれども、●●●入ってしまって、●●●。だけれども、一応調べてみたけれども、目ぼしい遺伝子はないしいいよねという、ところです。

それから、一番最後の結論のところなのですが、もう少し丁寧に記載するよう要求したというのがございました。

全体としてはそれほど長いやつでもございませんので、全体、どこからでも御質問いただければと思います。では、先生方、御意見、御質問等でございますでしょうか。

〇〇〇、よろしくお願いします。

〇〇〇 組換えの部分なのですが、一番最初に●●●遺伝子の欠失をさせているということで、これは恐らくホモロガス・リコンビネーションの効率を上げるために行っていると思うのですが、その後、結局●●●による挿入を試したときに大きなところでホモロガス・リコンビネーションがかかってしまって挿入しているのだと思うのですが、そう考えると、●●●を効かせる前の段階で●●●によってゲノムが不安定になるのではないかなと、この生物自身が不安定なのではないかという心配があるのですが、いかがでしょ

うか。

以上です。

〇〇〇 ●●●、これは、カビは大体一倍体なのですから、大体これに相同する遺伝子を持っていて、これがあるおかげで遺伝子を普通に組換え実験をやりますと非相同組換えのほうが優先的に起こってどこかいろいろなところに入ります。相同組換えの確率は株にもよりますが、1割あるかないかという感じになりますので、遺伝子組換え宿主に使うときには、大体麹菌でも何でもこの●●●もしくはこれに相当する遺伝子を最初に潰すのがセオリーといえバセオリーです。

いろいろな株、麹菌でも何でも、潰した株、あちこちで宿主に使われていますけれども、それで不安定になったとか何か毒性が出たとか、そういう話、聞いたことはありませんし、そういう論文を私は見たことはありませんが、一応私も麹菌を専門としておりますので、私の答えでよろしいでしょうか。

〇〇〇 了解です。ありがとうございます。

〇〇〇 どなたか先生方、ほかにございませんでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 11ページのほうで用途に関しては鶏の飼料に添加するというので、飼料にしか添加しないということではよろしいのでしょうか。飼料の添加物だからということでいろいろアレルギー性試験とかそういったことは省略されていると思うのですが、もし飼料にしか添加しないということが明らかであればよろしいかと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

これは飼料添加物ということなので、食品添加物で流用とかそういうことをしてくれてしまった日には問題だけれども、飼料添加物という申請だから、事務的にそういうことでよろしいのですよね。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 よろしいはずですが。ほか、どなたかよろしいでしょうか。●●●件についても一応考察はありますが、この程度しか考察しようもなかろうとも思うのですが、先生、この辺もよろしいでしょうか。

〇〇〇 いいですか。すみません。●●●ということなのですが、読んだ感じだと機能が明らかになっていないからというような理由だと思うのです。そうすると、実はその遺伝子を欠失することによって何か新たな毒性が出たりとかというのはないとも限らないと思うのですよ。なので、そういったケースも考えられるので、今後のことを考えて、どの程度まで許容できるのかとか、そういう考え方があったら教えていただきたいなと。

すみません、以上です。

〇〇〇 どうなのでしょうねとも思うのですが、宿主に使う株で、これはカビだとしたらマイコトシキンが怖くて、マイコトシキンに関係ある遺伝子に影響を与えるとなると問題なのだが、全然関係ないところが飛んでいるわけで、マイコトシキン関係の遺伝子

はそれに関連する遺伝子群が全部生きてるときだけ発現しますので、関係ないところが飛んでマイコトシキンが発現するという可能性は、普通は考えなくて大丈夫です。

それ以外で心配しなければいけない可能性は、*Trichoderma reesei*ですから、普通に安全性の宿主としてあちこちで利用されている株なので、私はちょっと考えにくいとは思いますが、先のことがありますので、この点に関して、先生、どなたか御意見ございますでしょうか。

では、こういう●●●の場合はその都度検討するということで、○○○、この株は、これはこれでよろしいですか。

○○○ 了解しました。ありがとうございます。

○○○ ほかにどなたか。飼料添加物ということもございますし、また、結論のところでも少々詳しく書いていただきました。先ほど机上配布資料ということで説明をしていただきましたが、これはよろしいでしょうか。特に安全性の懸念なしということで、これについてはオーケーと判断したいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。この点、御意思の表明を明確にお願いします。よろしいでしょうか。

○○○ ありがとうございます。

皆さんからオーケーいただけたようなので、評価書案をお願いします。

○○○ それでは、評価書案のほうの検討に参りたいと思います。

資料①、資料の御準備をお願いいたします。①でございます。

ページといたしましては、2ページからでございます。

遺伝子組換え食品等評価書、JPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼでございます。

その5ページ目をお願いいたします。読み上げさせていただきます。

評価対象飼料添加物の概要として、品名はJPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼでございます。用途としては、鶏の増体性の向上ということでございます。

本飼料添加物は、*Trichoderma reesei* GM6a株を宿主として、*Acremonium alcalophilum* CBS114.92株由来のムラミダーゼ (*lyzAA*) 遺伝子を導入して作製されたJPTR003株を利用して生産されたムラミダーゼでございます。比較対象とする従来の飼料添加物はないため、使用実績のある食品添加物ムラミダーゼとしております。

*lyzAA*遺伝子のプロモーター及びターミネーターは宿主由来のセルビオヒドロラーゼをコードする*cbhI*遺伝子のプロモーター配列及びターミネーター配列でございます。そのほか、選択マーカーとして*A.nidulans* Glasgow野生株由来の*amdS*遺伝子が導入されております。これらにより構築された遺伝子導入用ベクターは、宿主ゲノムの任意の箇所に複数コピーが組み込まれているというものでございます。

Ⅱ.食品健康影響評価でございます。

1. (1) 宿主である*T.reesei*はセルラーゼの生産菌として長年産業利用されており、また、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に相当すると

いうものでございます。

(2) *lyzAA*遺伝子の供与体である *A.alcalophilum* は、アルカリ性条件下でセルロースを分解する唯一のカビとして知られ、BSL1に相当するといったものでございます。

また、選択マーカーとして用いた *amdS* 遺伝子は、安全に使用されてきた実績があります。

なお、本飼料添加物の製造工程において、生産菌は除去されている。また、本飼料添加物は2018年にEFSAで飼料添加物としての評価が行われ、使用されており、安全性の問題はこれまで報告されておりませんということでございます。

2につきまして、1週間前にお渡ししたのからちょっと修正があるので、そこについて線を入れているといったところでございます。修正後のものでございますが、(1) 本飼料添加物は、鶏の飼料に添加して使用される酵素（タンパク質）である。一般的に、挿入された遺伝子もしくは挿入遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行するということは報告されていない。本飼料添加物においても有効成分である *lyzAA* が畜産物中に移行するといった報告はないこと、畜種、供与体に関する情報並びに挿入DNA及び接合領域における相同性検索の結果から、生産菌株が新たに有害な物質を産生するということは考えられないことから、肉、乳、卵等の畜産物中に組換え体に由来する新たな有害物質が移行するということは考えられない。

(2) 挿入DNA及び接合領域における相同性検索の結果から、有害なタンパク質の塩基配列は検出されないことから、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で分解等により有害物質に変換し、蓄積される可能性は考えられない。

(3) 本飼料添加物の基質はペプチドグリカンであり、細菌の細胞壁を加水分解することであることから、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生産される可能性は考えられない。

本飼料添加物について、安全性の問題はこれまで報告されていないことを踏まえると、以上のことから「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」に基づき審議した結果、改めて「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」に準じて評価する必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜に由来する畜産物について安全性の問題は考えられないというようにしたいと考えております。

以上でございます。

〇〇〇 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、承りたいと思います。細かい字句等の修正であれば、後ほど事務局にお伝えいただければと思います。何かお気づきの点等ございますでしょうか。では、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に報告してパブリックコメント等の手続に移りたいと思います。

それでは、早速、次、新規の品目その2、JPAN005株を利用して生産されたペクチナー

ぜについて審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうからよろしく。

〇〇〇 それでは、JPAN005株のペクチナーゼの要旨の資料を御準備ください。

それでは、説明いたします。

第1-1、従来の添加物の性質及び用途等に関する資料についてでございます。

今回、申請の酵素pelAについて、こちらの比較対象となる従来の添加物は、既存の添加物のペクチナーゼでございます。ペクチナーゼは、ペクチン及びペクチン酸を分解する酵素の総称です。

名称、基原及び有効成分です。基原は*Aspergillus niger*。系統名は(1→4)-6-O-methyl- α -D-galacturonan lyaseでございます。

こちらの用途でございますが、1-1- (3) 、ジュース等に用い、ペクチンを分解して絞り汁の濾過性、清澄性を上げて製品の生産性を向上させるといったものでございます。

摂取量でございます。3ページ、1-1- (4) でございます。

pelAが全ての野菜ジュースや果汁飲料の製造に用いられ、100%残存すると仮定した場合、日本におけるヒトの体重1kg当たりの最大摂取量の計算を行っております。

平成29年の国民健康・栄養調査の報告に基づくと、野菜ジュースと果汁飲料の摂取量は1日大体24gになるということ。このことから、pelA製品の最大推奨摂取量というものを求めたところ、添加量は4.94mg TOS/kg、pelA製品の酵素含有率は製品の大体4%であることから、pelAの1日当たりの最大摂取量につきましては、4.74TOS/mgとなります。さらに、4.53 mg TOS/日を日本人の平均体重で割ることによって出したところ、最大摂取量につきましては86.1 μ g TOS/日/kgと算出されております。

続きまして、宿主及び導入DNAについてでございます。

第1-2、宿主につきましては、*Aspergillus niger* BO-1株となっております。供与体につきまして、pelA遺伝子は、こちらも*A.niger*から取られたものです。株としてはAP-18株となっております。

そのほかの組み込まれた遺伝子等につきましては、次の4ページの表1を御覧ください。

続きまして、DNAの性質及び導入方法でございますが、欠失した遺伝子及び導入した遺伝子は5ページ目の図1を御覧いただければと思います。

A.niger BO-1株からまずDNA欠失ということで、●●●を欠失させております。これらは上の1から6、ここにつきましては酵素遺伝子、最後の●●●というのはフモニシン遺伝子群ということで、フモニシン産生に係る遺伝子を欠失させています。その後、DNAが導入されておりますが、DNAが導入されたところと入れ替えるということで、●●●の遺伝子が欠失しています。そのため、今回、この●●●遺伝子座に組み込んでいるということで●●●コピー導入されているといったものでございます。

その遺伝子の導入の方法につきましては9ページの図3を御覧いただければと思います。

まず①といたしまして、宿主菌株の染色体に●●●遺伝子発現カセット及び

FRT-F/FRT-F3の配列を挿入して、その次に、②遺伝子導入用のベクターを導入することによって菌体内で●●●インテグラーゼが発現するといったこと、③●●●インテグラーゼがベクター及び染色体のFRT-F/FRT-F3配列を認識して、その挟まれた領域同士を組み換えるということが行われています。その組換えによって *peIA/amdS* 遺伝子発現カセットが染色体に挿入されるといった形で●●●遺伝子座に組み込まれるといったようなものとなっております。

11ページ、宿主の添加物製造への利用経験及び食経験に関する事項でございます。こちらにつきまして、*A.niger*につきましては、食品用酵素の有機酸の生産菌として長年使用されているといった経験があるということで、日本においても α -アミラーゼやセルラーゼの酵素の既存添加物として食品に使用されているといったものでございます。

また、第1-4、宿主の構成成分に関する事項ということで、*A.niger*は自然界に広く存在していて、アレルギー性や病原性で問題となる菌種ではないということでございます。

一方で、*A.niger*の全ゲノム配列が解析された結果、オクラトキシンやフモニシンの遺伝子が発見されているといったところから、これが発現しないかどうかというような確認もしているといったところ、*A.niger*のBO-1株につきましては、これらのマイコトシキンを産生していないということは確認済みでございます。

続きまして、13ページ、第1-6、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の組換え体と宿主等の相違点でございます。

表4を御覧ください。既存のペクチナーゼにつきましては、20年以上の販売実績があるといったところでございまして、生産菌としても、もともと*A.niger*自体は既存の添加物のペクチナーゼの生産菌株として利用されてきています。

また、14ページ、組換え体と宿主の相違点でございますが、相違点につきましては、表5のとおりでございます。挿入された遺伝子としては、*peIA*遺伝子、*amdS*遺伝子、*pyrG*遺伝子が入っている。それぞれ●●●入っているといった状態。あと欠失DNAにつきましては先ほど申し上げた酵素とフモニシンの遺伝子群が除去されているといったものでございます。

第2に参ります。15ページ、第2、宿主に関する事項でございます。宿主菌株についてはBO-1株でございます。表6のとおり、様々な酵素の製造に使われております。

16ページ目に参りまして、第2-2、病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項でございますが、まずBO-1株の病原性については非病原性であると考えられている。有害生理活性物質につきましては、*A.niger*はオクラトキシンA、フモニシンを産生する可能性が示唆されているが、分析によりBO-1株は、これらマイコトシキンを産生しないことを確認しているといったところ。*A.niger*のアレルギー性につきましては、17ページ、本申請品の製造所において孢子での暴露が原因とされるアレルギー性の症例はこれまで報告されていないとなっております。

第2-3、寄生性、定着性、第2-4、病原性への外来遺伝子に汚染されていないことについ

ては、どちらも報告されていない、知られていないとなっております。

第2-5、類縁菌、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について、*Aspergillus*属は、日和見感染による肺炎の原因菌となるということが知られているということが出ております。

続きまして、18ページ、第3、ベクターに関する事項でございます。

今回使用したベクターのpJPV024につきましては、この元になっているのがpBluescript SK-プラスミドというものでございまして、広く実験や応用に用いられてきているものでございます。こちらは人に対する有害性というものは知られておりません。

19ページ、第3-2- (3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項としては、これは含まれていないとなっております。

また、第3-2- (4) 薬剤耐性に関する事項として、このベクター、pBluescript SK-プラスミドについては薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性を持っているといったものでございます。

その他、3-2- (5) 伝達性に関するということについては報告がありません。

また、3-2- (6) 宿主依存性に関する事項としては、こちらはコリシンE1プラスミド由来の複製起点*Ori*を有し、プラスミドの複製が可能な生物種は*E.coli*のみというようになっておりますので、今回のものでは複製はされないといったところでございます。

20ページ、第4、挿入DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターに関する事項でございます。

第4-1- (1) 名称、由来、分類に関する事項、*pelA*につきましては、*A.niger* AP-18株。*A.niger*に関しては宿主のところで申し上げたとおりでございます。

また、*amdS*遺伝子につきましては、供与体は*A.nidulans* Glasgowの野生株となっており、*pyrG*の遺伝子の供与体は*A.nidulans* NRRL1092株となっております。

4-1- (2) 安全性に関する事項でございます。

*A.niger*については、説明のとおり。

*A.nidulans*については、こちら、食経験は知られていないということでございますが、*A.nidulans*のアセトアミダーゼがコードされていますが、普通の培地では発現することはないというところから問題ないと考えられています。

A.niger、*A.nidulans*につきましては、国立感染研のバイオセーフティレベル2や3には該当していないということで、病原体等のリスク分類でのリスク群としては1に分類されています。

21ページ、挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法につきましてはでございます。

*pelA*につきましては、*A.niger*のゲノムDNAを鋳型として用いて、それをPCRで増幅して、その*pelA*遺伝子断片を得ているといったところでございます。

*amdS*についても*pyrG*についても同様に、ゲノムDNAを鋳型として用いて、PCRで増やしているといったものでございます。

4-2- (2) 塩基数及び塩基配列、制限酵素による切断地図に関する事項でございます。

22ページの図7がpelAのアミノ酸配列でございます。既存のペクチナーゼとの相同性は●●●となっております。

23ページに参りまして、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見でございます。

*A.niger*は、特にアレルギー性で問題となる菌種とはなっておりません。

また、2) 遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見については、pelAを有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆するといった報告は上がっておりません。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性に関する知見について。人工胃液にしましては、図8のとおりでございます。0.5分のところで完全に消化されているといったところが確認できます。24ページ、②人工腸液に関する感受性。こちらも図9のとおりでございます。0.5時間、30分で消化されるところが確認されております。

③加熱処理に関する感受性でございます。こちらは図10を御覧ください。70℃、30分で完全に失活しているといったところでございます。

25ページ、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見について。

①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索でございます。こちらについては、検出はされていないといったところでございます。また、連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンにつきましても、こちらも既知のアレルゲンは検出されていないといったところでございます。

これら1) から4) までは総合的に検討した結果、pelAがアレルギー誘発性を有するということは考えにくいと考察されております。

26ページでございます。ほかに挿入された遺伝子、*amdS*と*pyrG*についてでございますが、こちらも長年使用されていた実績があり、アレルギー性及び毒性を有するといったことは考えにくいというようになっております。

続きまして、4-3でございます。27ページ、4-3、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ございます。

それぞれプロモーター、ターミネーターについては記載のとおりでございます。また、*A.niger*の中性アミラーゼⅡをコードする*na2*遺伝子のプロモーター断片を*pelA*については使っているといったところでございます。

amdS、*pyrG*についても記載のとおりでございます。

4-3- (2) ターミネーターについてでございます。

29ページ、4-5、構築された発現ベクターに関する事項につきましては、この図11のとおり。その構成要素につきましては30ページの表7のとおりでございます。

31ページ、ORFにつきましては次の第5のところで説明させていただきますので、そこは省略いたします。

32ページ、DNAの導入方法については、第1で説明したとおりです。

続きまして34ページ、組換え体に関する事項でございます。組換え体に関してのゲノム解析については、次世代シーケンサーによって解析されており、解析結果としてシーケンスにより各末端が平均100bp以上のペアエンドのリードが得られて、得られたリードに対して質の低い領域を除去するなどの処置を行った結果、解析ソフトウェアを用いて目的遺伝子を導入する宿主株のゲノムにマッピングすることで、領域及び近傍配列を決定しております。今回のシーケンス解析では、平均冗長度は40以上ということで、接合領域の配列が決定されているというところです。

この構成要素については35ページから38ページ、それぞれの●●●の挿入された遺伝子座について解析結果がこうなっているといったところでございます。

39ページに参りまして、第5-2- (2) オープンリーディングフレームの有無及びその転写及び発現の可能性に関する事項ということで、今回、DNAを挿入した●●●の遺伝子座及び欠失した遺伝子の中で●●●遺伝子座については、*pyrG*遺伝子のターミネーターの断片が残っているといったところから、この●●●についてORFの検索を行っているといったところでございます。それぞれ検出されたORFにつきましては、39ページに書いてあるおりでございます。

続きまして40ページ、1) 検出されたORFと既知のアレルゲンの相同性検索でございます。80アミノ酸で35%以上の相同性を示すものについては、表12のとおり4つ。それぞれアレルゲングループとしては、①にはDer f 15、Der p 15。また、②についてはDer f 15、Der p 15とAsp f 18、Asp n 18。③についてはSubtilisin、④についてはAmb a 1というものがみついているといったところでございます。

これらにつきまして①～③につきましては、食物アレルゲンとしては登録されておらず、呼吸感作制のアレルゲンということでございますので、これらの食物アレルギー感作性の懸念は低いと考えられております。

また、④Amb a 1につきましては、宿主の染色体の塩基配列から得られたORFであるといったことから、遺伝子導入により新たに生じたものではないというものでございます。

②連続した8アミノ酸が完全に一致するアレルゲンにつきましてでございますが、こちらは宿主、一致するものは1つ見つかりましたが、こちらは宿主由来のものというのではないということでございます。

2) 検出されたORFと既知の毒性タンパクの相同性検索についてでございます。

それぞれの遺伝子座について確認したところ、41ページの●●●のとおりとなっております。それらについて似たもの、重複しているものというのをまとめたところ、42ページのORF1からORF5までの5つにまとめることができたと考えられております。それら5つのORFに相同性を示したデータベースで検索したタンパク質については、43ページの表13のとおりでございます。

詳細は44ページからでございますが、簡単に説明させていただきますと、ORF1から

ORF3までにつきましては病原菌で発現するタンパク質または病原性因子ではありますが、単独で毒性の報告がされているタンパク質はないということでございます。また、ORF4につきましては、*E.coli* CFT073株のゲノム解析で同定された推定アミダーゼというものですが、これは病原性を示すといったものではないということでございます。

ORF5につきましては、類鼻疽を引き起こすものに由来するといったことで、類縁菌である脱ユビキチン化酵素をコードするものと完全に相同であるといったことから、同じ酵素活性を有すると報告されているといったところではあるのですが、こちらでも単独で毒性を持つという報告はされていないといったものでございます。

48ページに参ります。第6、組換え体以外の製造原料、製造器材に関するものということで、こちらは使用実績があることということで、食品製造に用いられているものを使用しているといったところでございます。

また、第7、遺伝子組換えの食品添加物に関する事項ということで、諸外国における認可、食用等に関する事項でございますが、*pelA*につきましては2000年代前半に販売が開始されて、従来のペクチナーゼと同様に欧州を中心として加工助剤として使用されているといった実態がございます。これにつきまして、デンマークで食品加工助剤として承認がされているといったものでございます。

50ページに参りまして、組換え体の残存に関する事項ということで、こちらにつきましては*pelA*製品には生産菌株の染色体DNAは残存しないということが確認されております。

51ページ、第7-3、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、試験バッチを用いて分析をしたところ、食品添加物等の規格基準でございます規格を満たしているといったところでございます。また、表14の下2つでございますが、オクラトキシンとフモニシンについても分析をしており、検出をされていないといったところでございます。したがって、今回の生産品でありましてもオクラトキシン、フモニシンを生産しないということになるということでございます。

第7-4と第7-5についてもほかの申請品と同じく精製されているといったこと。また、第7-5、変動によって常成分の変動というものも特になかったということでございます。

以上から、安全性の知見は得られているというように考えられるといったところでございます。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございました。

この株は*A.niger*のBO-1。この宿主はノボザイムズ社のおなじみの株でして、今回はペクチナーゼ遺伝子の*pelA*、これも*A.niger*自身のものです。プロモーターと、それから、マーカーで使っている*amdS*、*pyrG*の2つは*A.nidulans*の遺伝子が混ざっているということでこの申請になっている。*A.niger*の場合は、マイコトキシンで怖いのは、フモニシンとオクラトキシンなのですが、フモニシンについては、この遺伝子を潰して、オクラトキシンについても最後はないということを確認しているということですね。

先ほどのムラミダーゼのときは飼料添加物だったので人工胃液、人工腸液試験はありませんが、こちらは食品添加物ですので当然人工胃液、人工腸液試験がございます。〇〇〇、そういうことだったのですね。

染色体上の●●●●普通に入れていまして、ここは少々手の込んだことをしているとしたら、●●●●という遺伝子、これを●●●●で使っていることで、●●●●ですけれども、●●●●になります。●●●●。なので、●●●●。そこが少々手の込んだことですが、カビの研究者の間では時々というかよく使われる手段です。

●●●●です。それから、●●●●の遺伝子座にそれぞれ入って素直に入っているということとは次世代シーケンサー等々で確認しているということですね。

それでは、少々、50ページ以上ありますが、質問するところは限られると思いますので、全体を通してどこでも御質問、御疑問等ございましたら御意見等をお願いいたします。〇〇〇 本日欠席の〇〇〇の意見、ぜひ聞いておきたいなというところがありまして、〇〇〇のほうから御意見いただいております。

では、事務局のほうから説明していただけますか。

〇〇〇 昨日、送付いたしましたメールに添付した机上配布資のうち2を御覧ください。

要旨の資料では12ページ、第1-5-（4）の箇所でございます。今回導入した*Aspergillus niger*自体はもともとペクチナーゼを普通に作るといったところでございますので、今回の宿主の中にあるペクチナーゼの生産のところがどうなっているのかといったところがありましたので、申請者に確認をして修正されたところでございます。読み上げさせていただきます。

*A.niger*は既存のペクチナーゼの主要な生産菌と知られており、宿主であるBO-1株にも内在性のペクチナーゼ遺伝子が存在している。遺伝子組換え技術により、*A.niger* AP-18株由来の*pelA*遺伝子がBO-1に導入され、*pelA*の生産性が高められている。したがって、JPAN005株の中では、*pelA*は内在性ペクチナーゼよりも高い発現量で生産されていると考えられる。

*pelA*は内在性ペクチナーゼを含む既存のペクチナーゼと同様に植物中のペクチンを分解する酵素であるというように修正をいただいているといったところでございます。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

この件については、実は修正の答え、私に言わせれば少々的外れでして、ペクチンの遺伝子ですから、これは遺伝子発現制御がかかってグルコースの培地でほとんど発現しませんので、だから、この株もプロモーターとしては常時強力に発現するプロモーターが工夫されていまして、少々特殊な*Aspergillus nidulans*と、それから、*niger*と*nidulans*のプロモーターをくっつけて混ぜて作った少々特殊なプロモーターが使われております。*na2/tpi*プロモーターというやつが工夫されていまして、これの発現カセットを作って、それを●●●●導入しているからこそ、これほどたくさん作るのです、そういうように説明してくれ

ばいいのになと思うのだけれども、説明を加えられて、修正された説明にうそがあるわけではないのですが、ポイントはずれているなど実は思っています。

だからといって、この安全性に問題があるかというそういう問題ではないと思うのですけれども、できれば後からもう少しまとめた答えをよこせと申請者に言っていただければと。本日、実は申請者、ネットですが呼んでもおりますので、必要があればそのときに指摘したいと思います。

ほかに何かございますでしょうか。あと来ているのであれば、実は私も最後のところで、デンマークで食品用の加工剤としてpelAが承認されているとあったのですが、このJPAN005株で作ったpelAが承認されているのかどうか。そちらが承認されて既に流通しているのだったらいいのだけれども、そうではないのだったら一応ちゃんとそこも見ないとねと思うので、実はそこは聞きたいなと思っているのですが、先生方、何かございますでしょうか。

人工胃液、人工腸液。人工胃液ではすぐ分解するけれども、人工腸液では少々時間がかかるということですが、その点は何か〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 人工腸液ですね。多少時間がかかっているということですが、ただ、1時間以内にウェスタンブロットでは消化されているということですのでよろしいかと思います。

〇〇〇 これだけで直ちに問題というわけではないということでもよろしいですか。ありがとうございます。

〇〇〇も同じ質問なのですが、先生、御意見があったら。

〇〇〇 〇〇〇がおっしゃったのと同じ考えでございます。

別のところで1つ確認したいのですが、隣の25ページの図10で熱安定性のグラフが出ているのですが、13ページのところには表4にこの酵素と既存のペクチナーゼの比較がしてあって、そちらでは至適温度が45~60℃になっていて、図10だとちょっと失活してくる温度のように見えるのですが、これは何か書き間違いとかそういうものなのでしょうか。

〇〇〇 基質があるときないときとスタビリティが違ったりもするので、そんなのかなと思わないでもないのですが、申請者、呼ぼうと思いますので、直接聞いていただけますか。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 では、ほかに。

〇〇〇 よろしいですか。川西です。

〇〇〇 どうぞ。

〇〇〇 ちょっとよろしいですか。申請者が来られるということですので、ちょっと余計なことかもしれませんが、試験バッチということをいつも私の印象だと書きぶりというか、用語のその都度の使いぶりがちょっと違って、担当者が違うのかもしれないで

すが、ノボザイムで試験バッチというのは●●●なのでしょうが、そのバッチであるというように今まで理解していましたし、これの社内文書を見ると、試験バッチというよりはもう●●●のですからそうなのだろうと思いますが、この概要書を見ると純度試験等で使うバッチというような書きぶりになっていて、何となく繰り返しているような書きぶりになっていて、その点だけ確認したいと思います。すみません。

〇〇〇 ありがとうございます。

これは調査会でどうこうという問題ではないと思いますので、そういうことこそ担当者に直接言っていただけますでしょうか。

ほかに。申請者を呼ぼうと思いますので、その場で何か質問等思いつかれたことがありましたら直接お尋ねいただければと思います。

では、準備できるまで少しだけ休憩いたします。

(休 憩)

〇〇〇 それでは、始めようと思います。

お忙しいところ、また、この新型コロナの緊急事態宣言下、お越しいただきまして誠にありがとうございます。

自己紹介をお願いします。会社名とお名前だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じくノボザイムズジャパンの〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

有効成分の性質と従来の添加物の比較のところで書き直していただきました。けれども、これは内在性のペクチナーゼが高い発現量で生産されている理由は、導入した遺伝子はプロモーターを付け加えているからだと思うのだけれども、それを何で書いてくれないのか。いや、それで安全性どうこうという問題ではなくて、肝腎なポイントを外していると思っただけです。

〇〇〇 おっしゃるとおりだと思います。その点、適宜追記させていただこうかなとは思っています。

〇〇〇 それから、ここから先が本当の質問で、最後、デンマークで食品用の錠剤として既に承認されているとあります。デンマークで承認されているペクチナーゼを作っているのは、このJPAN005株なのか、それとも違う株で作っている同じペクチナーゼ。そこは重要。

〇〇〇 デンマークで承認されているものもこのJPAN005株で、それも同じ生産菌で作られています。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、〇〇〇、この安定性のところについてお尋ね、お願いできますか。

〇〇〇 資料の13ページと25ページについて伺いたいのですけれども、13ページの表4では当該酵素の至適温度が45～60℃と記載されておりまして、25ページの図10では熱安定性で60℃付近から活性が減少し始めるとあるのですが、これは矛盾していないでしょうか。

〇〇〇 御指摘ありがとうございます。

まず25ページ、図10の熱安定性試験のほうのデータは、これは24ページのほうの17行目から記載しておりますように、一度、各温度帯で30分、処理をした後の残存活性を発生したものになっております。一方、13ページのほうの至適温度の測り方というのは、この測り方とはちょっと違う測り方をしておりまして、あくまで最大の活性を示す温度として45～60℃というような形に記載をしています。そういうデータを基に記載をしています。

したがって、25ページにある熱安定性の試験というのは至適温度を測る試験でやっているものではなくて、あくまでも熱の安定性、テンプラチャースタビリティをやっているデータですので、一応その点、至適温度の値とずれていると考えております。

〇〇〇 〇〇〇、よろしいですか。

〇〇〇 分かりました。ありがとうございます。

〇〇〇 至適温度を測る実験は当然基質と一緒に入れていると思うのだけれども、このスタビリティを測る実験は酵素の溶液を温めるだけで基質を入れないで温める実験をやっているのですか。

〇〇〇 ちょっと確認させていただきたいのですけれども、ただ、おっしゃるように1回、各温度帯で基質を入れずに30分処理した後、どのくらい残存、活性値が出るのかというようなことをやっているのも、もしかしたら基質を入っていないという可能性はあります。

〇〇〇 普通は基質を入れないで上げてやるものなので、当然そうだと思いますし、それに酵素という特に高分子のものを分解する酵素の場合は基質があると安定性が上がりますので、だから、そこが一瞬矛盾しているように見えるのは基質効果で安定性が上がったせいなのかなと思ったのだけれども、そういう説明をしてくださらなかったから私も心配になったのですが、その辺、御見解は。

〇〇〇 すみません、おっしゃるとおりかと思います。私のほうで今、どういうようにやったかという詳細を確認していなかったのも、1回確認させていただきたいなと思います。

〇〇〇 よろしく願いいたします。

〇〇〇、お出番です。よろしくお願いします。

〇〇〇 2点ほどあります。

1点は、これは私、先ほどからもう一回読んでいてはっきりしたのだけれども、このペクチナーゼそのものについては、実際にジュースで使った場合は最終的なところで濾過をして除かれる側に入るので、実質的にはヒトの口には入らない。例えばパンで使うやつは熱処理して壊す。この場合はもう濾過でほぼ除かれると加工助剤なのだと、そういう割り切りでよろしいですね。

〇〇〇 一般的にペクチナーゼ、食品用の加工用に使われるペクチナーゼもそうなのです

けれども、このペクチナーゼに関しては濾過で取り除かれるという工程がありますので、そのまま直接食品の中に入ってヒトが食するという事はないというように考えております。

〇〇〇 分かりました。

もう一点、これは食安委のこういう評価とダイレクトというわけではないのですが、資料を見させていただいていつも勉強させていただいているのですが、試験バッチでしたか、製造工程の表を見ると12ページで、これはノボザイムの場合にはいつもあるわけなのですが、濃縮して試験バッチというのを取る。これは結局、私の理解だと、社内文書を見ても●●●が主体だと思いますけれども、それ用のバッチであって、もともとの目的は、別に純度試験をするためのバッチということではないわけですね。

〇〇〇 おっしゃるとおりでして、●●●に用いる試験バッチということで、その中で●●●というのをしなければいけないので、その各種、性状であったり濃度だったり純度であったりというのも一緒に調べているというところで、本来の目的はおっしゃるような●●●に用いるためのバッチです。

〇〇〇 ですから、ここの概要書で後のほうでデータとして試験バッチ、バッチ番号も書いてありますけれども、それを出していただいているのは、1回やったということの理解ですね。

〇〇〇 そうですね。一番純度が高いというところでやっているということですね。

〇〇〇 分かりました。今、我々がやっている評価はそれで何が悪いというわけではないのですが、私自身は思うところはあるのですが、それ以上は言いません。ありがとうございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほか、先生方、どなたかございますでしょうか。よろしいでしょうか。お疲れさまでした。

(ノボザイムズジャパン株式会社関係者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻りたいと思います。

ただいまの回答も含めまして、また何かございますでしょうか。

デンマークでもこの株を使ったやつでちゃんと流通しておるという今、回答もいただきましたので、安全上、私はいいかないと思うのですが、先生方、よろしいでしょうか。御賛同いただけましたら、ここは意思表示、はっきりお願いいたします。

(同意する委員あり)

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、特に安全上、問題はないということで評価書案の審議をお願いします。

事務局のほうからお願いします。

〇〇〇 評価書案のほうに参りたいと思います。

資料の御準備いただきまして、ペクチナーゼにつきましては資料の7ページをご覧ください

さい。表紙、目次とあり、議論は12ページからでございます。

まず12ページの48行目となっているところからでございます。Ⅰ.評価対象添加物の概要でございます。

名称はJPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼでございます。用途としては、ジュース製造時の生産性及び品質の向上でございます。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1株を宿主として、*A.niger* AP-18株の由来のペクチナーゼ遺伝子を導入して作製したJPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼであり、その反応特異性からペクチナーゼに分類される。本添加物はペクチンの基本骨格であるポリガラクトuron酸の α -1,4-ガラクトロノシド結合をエンド型で開裂する β 脱離反応を触媒する酵素であり、ジュースの製造に使用されるというものでございます。

Ⅱ.食品健康影響評価でございます。

第1.安全性評価において、比較対象として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ございます。

1.従来の添加物の性質及び用途に関する事項につきましては、(1) 名称、基質、有効成分については記載のとおりでございます。

(2) 製造方法、(3) 用途及び使用形態、(4) 摂取量につきましては、記載のとおりでございます。

次のページに参りまして、2.宿主及び導入DNAにつきましてでございます。

(1) 宿主の種名(学名)、株名等及び由来でございます。*A.niger* BO-1株につきましては、記載のとおりでございます。

(2) DNA供与体の宿主、株名、系統名及び由来につきましては、ペクチナーゼ(*pelA*)遺伝子の供与体は、*A.niger* AP-18株でございます。選択マーカーであるアセトアミダーゼ(*amdS*)遺伝子の供与体は、*A.nidulans* Glasgow野生株でございます。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法につきまして、*pelA*遺伝子は、ペクチナーゼ(*pelA*)をコードする。*amdS*遺伝子は、アセトアミダーゼをコードし、選択マーカーに用いております。

*pelA*遺伝子及び*amdS*を含んだ発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入したということでございます。

なお、生産菌の作製に当たり、あらかじめ複数遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させているが、このうちセルフクローニングに該当しない一部の遺伝子座では、ORF検索を行い、安全性を検討した。第5-2-(2) 参照としております。

3番、宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関する資料については記載のとおり。

4番、宿主の構成成分についても記載のとおりでございます。

5.遺伝子組換え添加物の性質及び用途に関する資料でございます。

(1) は、製品名及び有効成分については、記載のとおりでございます。

次のページに参りまして、(2) 製造方法、(3) 用途、使用形態、(4) については記載のとおりとなっております。

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の宿主等の相違点でございます。

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物につきましては、*pelA*と従来のペクチナーゼとの相違点は、アミノ酸数、至適温度が異なる点でございます。

(2) 組換え体と宿主につきましては、JPAN005株と宿主との相違点は、JPAN005株には*pelA*遺伝子が複数コピー導入され、ペクチナーゼの高生産性を獲得している点、*amdS*遺伝子を導入している点及びペクチナーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失されている点ということでございます。

第2.宿主に関する事項でございます。

1.分類学上の位置づけ、2.病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項につきましては、記載のとおりということでございます。

次のページに参りまして、3.寄生性及び定着性に関する事項、4.病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項についても記載のとおりでございます。

また、5の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についても記載のとおりでございます。

第3.ベクターに関する事項に参ります。

1.名称及び由来に関する事項、2.性質に関する事項については記載のとおりでございます。

16ページに参りまして、(4) 薬剤耐性に関する事項につきましては、プラスミドには、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

伝達性に関する事項は、伝達を可能とする遺伝子は含まれていないということでございます。

(6) 宿主依存性に関する事項につきましては、プラスミドの複製開始配列は、*E.coli*で機能するというようになっています。

第4.挿入遺伝子、遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項でございます。

1.挿入DNAの供与体に関する事項でございます。

(1) 名称、由来及び分類に関する事項は記載のとおりでございます。

安全性に関する事項についても記載のとおりとしております。

2.挿入DNAまたは遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項でございます。

(1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項につきましては、*pelA*遺伝子は*A.niger* AP-18株のゲノムDNAを鋳型として、分泌シグナル配列を含む配列をPCRで増幅して得られたとしております。*amdS*遺伝子は記載のとおりでございます。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素の切断地図に関する事項は記載のとおりでございます。

また、(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項ということで、①*pelA*遺伝子につきまして、*pelA*遺伝子がコードする*pelA*は、ペクチンの基本骨格であるポリガラクトuron酸の α -1,4-ガラクトuronノシド結合をエンド型で開裂する β 脱離反応を触媒とするとしております。

17ページに参りまして、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見とb.遺伝子産物についてアレルギー誘発性に関する知見につきましては、それぞれアレルギー誘発性を示唆する報告はなかったとしております。

c.遺伝子産物の物理化学処理に関する感受性に関する知見ということで、(a) 人工胃液に対する感受性につきましては、0.5分以内にバンドが消失するため、分解されることが示されたとしております。

(b) の人工腸液についても1時間以内にバンドが消失したため、分解されることが示された。

また (c) 加熱処理に関する感受性については、70℃・30分で失活することが確認されたとしております。

続きまして、dの遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性に関する知見でございます。こちらにつきましても、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果として、一致するアレルゲンは検出されなかったとしております。

②*amdS*遺伝子につきましても記載のとおりでございます。

続きまして、18ページに参りまして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ございます。

(1) プロモーターに関する事項でございます。こちらに記載のとおり、*pelA*遺伝子のプロモーターは*A.niger* BO-1株の中性アミラーゼⅡをコードする*na2*遺伝子のプロモーター断片と*A.nidulans* Glasgow野生株由来のトリオースリン酸異性化酵素をコードする*tpi*遺伝子のプロモーター断片を連結した*na2/tpi*プロモーター配列である。*amdS*遺伝子プロモーターは、*A.niger* BO-1株由来の*tef1*遺伝子プロモーター配列であるとしております。

また、(2) ターミネーターに関する事項につきましては、記載のとおりとしております。

(3) その他の挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合は、その由来、性質等が明らかであることということで、*pelA*遺伝子の転写を安定化させるため、*A.niger* BO-1株由来の*payA*遺伝子の5'側非翻訳領域を用いた。また、*pelA*遺伝子の転写産物を安定化させ遺伝子発現量を安定させるため、Tabacco mosaic virusのcoat protein遺伝子の3'非翻訳領域を用いたとしております。そのほか、インテグラーゼ認識配列が用いられているとしております。

4.ベクターへの挿入DNAの組み込み方法に関する事項でございます。こちらは記載のとおりとしております。

5の構築された発現ベクターに関する事項についても(1) 塩基数及び塩基配列、制限酵素に関する切断地図に関する事項につきましては、記載のとおり。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームは含まれていないことにつきましては、記載のとおりというようにしております。

(3) の宿主に対する導入方法についてということ、(4) 導入しようとする発現ベクターに目的外が混入しないように純化されていることにつきましてもそれぞれ記載のとおりとしております。

6.DNAの宿主への導入方法に関する事項ということで、あらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した宿主に遺伝子導入用ベクターを導入し、ベクター上の●●●インテグラーゼ作用により、ベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある*pelA/amdS*遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*amdS*遺伝子による選抜を行った後、●●●として形質転換体を選別したというようにしております。

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ございますが、こちらは宿主の染色体には、ベクターにはアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主には導入されていないとしております。

続きまして、第5.組換え体に関する事項でございます。

1.宿主との差異に関する事項については、JPAN005株には、*pelA/amdS*遺伝子発現カセットが導入され、ペクチナーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失させているとしております。

2.遺伝子導入に関する事項でございますが、(1) 制限酵素による切断地図に関する事項ということで、これについては各遺伝子座への*pelA*遺伝子/*amdS*遺伝子発現カセットの挿入を確認するためシーケンス解析を行った結果、設計どおりに各遺伝子座に全長の発現カセットが挿入されていることが確認されたとしております。

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項ということについては、挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を確認するため、挿入DNAと5'近傍配列領域を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った。

また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにおいて、異種遺伝子断片の残存した3つの遺伝子座で、同様にORF検索を行った。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が計1,014個、検出された。

これらORFの既知のアレルゲンと相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列において35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして検出されたDer f 15、Der p 15、Asp f 18、Asp f 18及びSubtlilisinは、呼吸器感作性アレルゲンであることから、食物アレルギー感作性についての懸念は低いと考えられるとしております。

また、8アミノ酸配列が一致するものは検出されていなかった。

さらに、これらのORFの既知の毒性タンパク質との相同性の有無を示すためにMvirDB

を用いて、E-value0.02未満を指標として検索を行ったところ、その結果は5個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質であったとしております。

続きまして、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につきまして、1.添加物の製造原料または製造器材としての使用実績があることと、2.添加物の製造原料または製造器材としての安全性について知見が得られていることにつきましては記載のとおりでございます。

第7.遺伝子組換え添加物に関する事項として、1.諸外国における認可、食用等に関する事項、2.組換え体の残存に関する事項は記載のとおりでございます。

3.製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項につきましては、pelA製剤前の酵素サンプルは、食品衛生法の規格基準を満たしている。また、製造原料は食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、適切な製造管理の下で製造がされるならば安全性に問題がある非有効成分が含まれるとは考えにくいとしております。

21ページに参りまして、4.製造方法及びその効果に関する事項、また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につきまして記載のとおりでございます。

第8.第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項としては、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。

また、最後、食品健康影響評価結果につきましては「JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼ」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」に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないものと考えられるといたしております。

以上でございます。

〇〇〇 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、コメント等ございますでしょうか。

細かい字句につきましては、お気づきになったところで後ほど事務局までお伝えいただければと思います。よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に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、本日、3番目の新規品目である収量増加及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP202216）のうち食品についての審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうから説明をお願いいたします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御紹介いたしました、本日はコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の御審議をいただいた後に申請者に対する質問があれば整理していただきたいと思います。その後に説明者にはウェブ上で入室していただき、質

疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、トウモロコシ、食品と飼料の2種類ございますが、食品の申請資料のほうの御用意をお願いいたします。

まず1ページをお願いいたします。

1の(1)としまして、宿主はイネ科トウモロコシ属のトウモロコシデント種PH17AW系統でございます。

続いて(2)ですが、DP202216には*zmm*遺伝子及び*pat*遺伝子が導入されており、*zmm*遺伝子はトウモロコシに由来し、*pat*遺伝子は土壤中のグラム陽性放線菌である*Streptomyces viridochromogenes*に由来します。

続いて(3)です。導入された*zmm28*遺伝子及び*pat*遺伝子は、それぞれZMM28タンパク質及びPATタンパク質を産生します。

ZMM28タンパク質は、MADSボックス転写因子であり、トウモロコシにおける早期発現及び発現増加により、光合成能や窒素利用効率の向上及び初期の栄養成長が促進されることで収量の増加をもたらします。

なお、導入された*zmm28*遺伝子から産生されるタンパク質は、宿主の内在性のZMM28タンパク質のアミノ酸配列と一致しております。

PATタンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、グルホシネートの除草作用に対する耐性を付与します。

これらの遺伝子のトウモロコシへの導入は、アグロバクテリウム法により行われました。

続きまして、2の宿主の食経験、3、構成成分、そして、4、5、6については記載のとおりでございます。

続きまして、少し飛んで4ページをお願いいたします。

第2の項目です。ZMM28タンパク質はMADSボックス転写因子でありまして、トウモロコシにおける早期発現及び発現増加により、光合成能や窒素利用効率の向上及び初期の栄養成長が促進されることで終了の増加をもたらします。

DP202216においても、2014年から2016年にかけて米国において実施した収量調査の結果、対照トウモロコシと比較しまして平均収量が213kg/ha増加しまして、統計学的に有意な結果となりました。

また、PATタンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートをアセチル化し、無毒なアセチルグルホシネートに変えることで、グルホシネートの除草作用に対する耐性を付与し、除草剤グルホシネートの散布により雑草だけを枯死させ、その防除が可能となります。

続いて、第3、第4に関する事項は記載のとおりでございます。

ここで、事前にお配りした机上配布資料の3番をお願いいたします。メールのほうの本

文にもちょっと書かせていただきましたが、該当するのは5ページの第3の4、アレルギー誘発性に関する事項でございます。

昨年、他社の品目でございますが、トウモロコシに含まれるアレルゲンに関しまして先生からコメントをいただきまして、今回、申請者のほうがそういったことも踏まえまして下線部のとおりトウモロコシのアレルゲンについて追記の情報を記載してきております。

それでは、ファイル、本文のほうに戻ります。ページとしましては11ページ、第5の項目をお願いいたします。

まず1の(1) 供与体については記載のとおりでございます。

(2) 安全性ですが、*zmm28*遺伝子の供与体であるトウモロコシは、安全な食品として長い利用の歴史がございます。

*pat*遺伝子の供与体である*S.viridochromogenes*は土壤中に広く存在し、ヒトに対する病原性は報告されておられません。

続いて、2の(1) クローニング合成方法の項目ですが、①*zmm28*遺伝子は、トウモロコシからクローニングしたものであり、塩基配列は内在性遺伝子と一致しており、アミノ酸配列に変化はありません。

②*pat*遺伝子は、*S.viridochromogenes*由来遺伝子のトウモロコシ中における発現を高めるため、塩基配列の改変を行いました、アミノ酸配列に変化はございません。

(2) は記載のとおりです。

(3) 挿入遺伝子の機能については、下の表5にまとめられているとおりでございます。

15ページをお願いいたします。*zmm28*遺伝子ですが、トウモロコシの内在性遺伝子でございます、植物中で構成的に発現させたスクリーニング調査において収量増加に係る有用因子として同定され、続く検討試験においても収量増加の特性を付与することが確認されました。

この遺伝子がコードするタンパク質は251個のアミノ酸から成り、分子量は約28kDaでございます。ZMM28タンパク質は遺伝子の発現を調節するMADSボックス転写因子ファミリーに属し、さらに当該ファミリーのうち、MIKCタイプに分類されます。MIKCタイプはN末端にあるMADSドメインと、それに続くIドメイン、それから、Kドメイン、そして、C末端ドメインから構成されます。こちらは図3に記載されているとおりです。

また、アミノ酸配列からZMM28タンパク質はMADSドメイン内に核局在シグナルを有していると考えられ、ZMM28タンパク質のDNA結合配列も同定されております。これらのことから、DP202216において、ZMM28タンパク質は、転写因子として機能していると考えられるとしております。

続きまして、DP202216においては、*zmm28*遺伝子発現カセットにトウモロコシ由来の*zm-gos2*プロモーターを用いて、タンパク質を早期かつ増加して発現させており、内在性のタンパク質は6葉期から発現し始め、11葉期にピークを迎え、種子の登熟期にかけて継続して発現します。一方で、DP202216における*zmm28*遺伝子の発現は非組換えトウモロ

コシよりも早期の生育ステージ（2葉期から5葉期から）に発現し始め、実際にDP202216におけるタンパク質は非組換えトウモロコシよりも早期の生育段階から発現し、6葉期から糊熟期の各生育段階において発現量が増加することが報告されています。

このようなZMM28タンパク質の早期発現及び発現増加は、初期栄養成長期におけるDP202216の成長を促し、実際に、対照のトウモロコシと比較し、2葉期から7葉期の各生育ステージにおける草丈、8葉期における葉の乾燥重量及び絹糸抽出期における総葉面積がDP202216において顕著に高くなっていたことが観察されました。

実際に2014から2016年にかけて米国にて実施した収量調査の結果、平均収量は対照トウモロコシと比較し有意に増加しておりました。

続いて、*pat*遺伝子ですが、PATタンパク質をコードし、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変えて無毒化することにより植物にグルホシネート耐性を付与いたします。

続いて、②の項目ですが、ZMM28タンパク質及びPATタンパク質について、毒素タンパク質データベースを用いて構造相同性を有するタンパク質を検索した結果、ヒトに対する既知毒性タンパク質と構造相同性を示すものはございませんでした。

続いて、（4）は記載のとおりでございます。

次のページに行きまして、3のまず（1）プロモーターの項目ですが、*zmm28*遺伝子発現カセットにはトウモロコシ由来の*gos2*遺伝子の*zm-gos2*プロモーターを、*pat*遺伝子発現カセットにはトウモロコシ由来のポリュビキチンの*ubiZM1*プロモーターを、それぞれ用いております。

続いて、（2）ターミネーターですが、こちらは*zmm28*遺伝子遺伝子及び*pat*遺伝子の発現カセットにはジャガイモ由来のプロテアーゼインヒビターⅡ遺伝子の*pinⅡ*ターミネーターを用いております。

（3）その他ですが、目的遺伝子の発現を高めるため、トウモロコシ由来のポリュビキチン遺伝子のイントロン領域を用いております。

続いて、4のベクターへの挿入DNAの組み込み方法、続いて、5の（1）については記載のとおりでございます。

隣のページに行きまして、（2）（3）は記載のとおりです。

（4）導入用プラスミドPHP40099に含まれる全ての遺伝子の性質は明らかとなっており、目的外の遺伝子の混入がないように純化されております。なお、導入用プラスミドの外骨格領域には、スペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子、テトラサイクリン耐性マーカー遺伝子及びその発現調節遺伝子が含まれており、プラスミド構築過程での選抜の際には抗生物質スペクチノマイシンが用いられました。

6、DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項は記載のとおりでございます。

続きまして、20ページをお願いいたします。第6の項目です。1の（1）ですが、①の1）挿入遺伝子のコピー数の確認です。

DP202216のゲノム中に挿入された導入遺伝子のコピー数を調べるため、8個体のT₁世代の葉から抽出したゲノムDNAを用いて、Southern by Sequenceを行いました。約400bpにランダムに断片化した本組換えトウモロコシのゲノムDNAから、構成要素領域を含む導入用プラスミドの特異的配列を対象としたプローブセットを用いて、PHP40099由来の配列を含むDNA断片を選択的に回収し、次世代シーケンサーを用いて解析した結果、試験に用いた8個体のうち6個体が組換え体であり、いずれの組換え体においてもT-DNA領域の配列とゲノムとの接合部は2つ特定され、それぞれT-DNA領域の5'末端と3'末端とゲノムとの接合部でございました。このことから、トウモロコシゲノム中に1コピー移入されていることが確認されております。また、得られたDNA断片にPHP40099の外骨格領域由来の配列は含まれておらず、T-DNA領域だけがゲノムに挿入されていることが確認されました。

続いて、2) でございます。SbS分析の結果から、T-DNA領域由来の配列とゲノムとの接合部は2つ特定され、それぞれT-DNA領域の5'末端、3'末端とゲノムとの接合部であります。これにより、それぞれの遺伝子発現カセットが1コピー挿入されていることが確認されました。

さらに、DP202216に挿入されたDNAの塩基配列決定を行い、挿入遺伝子領域5'末端、3'末端近傍配列の塩基配列を決定しました。また、導入用プラスミド内のT-DNA領域の塩基配列と比較することにより欠損及び挿入の有無を確認した結果、右側及び左側境界領域にそれぞれ22bp、12bpの欠損が認められました。

次のページをお願いいたします。②でございしますが、導入用プラスミドの外骨格領域には、選抜のための抗生物質テトラサイクリン耐性マーカー遺伝子及びスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子が組み込まれております。

T₁世代及びT₃世代の種子から抽出した各ゲノムDNAを用いて、それぞれSbS分析及び外骨格5つの領域を対象としたPCR分析を行った結果、抗生物質耐性遺伝子を含むこれらの外骨格領域が本組換えトウモロコシに導入されていないことを確認しております。

③は記載のとおりです。

④でございします。DP202216の挿入DNAの5'末端及び3'末端近傍配列について、NCBIヌクレオチドデータセット及びESTデータセットを用いたBLASTN検索及びNCBI non-redundantタンパク質データセットを用いたBLASTNxの検索を行いました。

まず5'末端近傍配列における検索結果ですが、NCBIヌクレオチドデータセットを用いた結果、長いので割愛しますが、申請書に記載のものが5'末端近傍配列と最も高い相同性を示しました。

次に、ESTデータセットを用いた検索の結果、申請書に記載のものが5'末端近傍配列と最も高い相同性を示しました。

さらに、タンパク質データセットを用いた結果、こちらも申請書に記載のものが5'末端近傍配列と最も高い相同性を示しました。

以上、それぞれのデータセットを用いた解析結果から、得られた配列は短いが相同性が

低く有意な結果は得られなかった。このことから、DP202216の挿入DNAの5'末端近傍配列にトウモロコシ内在性遺伝子が存在している可能性は低いと考えられるとしております。

続いて、3'末端近傍配列のほうでございますが、まずNCBIヌクレオチドデータセットを用いた検索の結果は、申請書に記載のものが3'末端近傍配列と最も高い結果を示しております。

次に高い相同性を示したもののなのですけれども、こちらはmRNAでございまして、この検査結果は遺伝子予測プログラムに基づく仮想的なmRNAであったということです。

次に、ESTデータセットを用いた検索の結果、こちらは申請書に記載のものが3'末端近傍配列と最も高い相同性を示しております。

さらに、タンパク質データセットを用いた検索の結果ですが、こちら申請書に記載のものが3'末端近傍配列と最も高い相同性を示しました。この検査結果は短く相同性が低い上に、3'末端近傍の相同性を示した配列のほぼ中央にストップコドンが含まれていたということです。

以上のそれぞれのデータセットを用いた解析結果から、ヌクレオチドデータセットから仮想的なmRNAが検出されましたが、いずれもESTデータセット及びタンパク質データセットを用いた結果から、その結果と一致するものではございませんでした。このことから、DP202216の挿入DNAの3'末端近傍配列にトウモロコシ内在性遺伝子が存在する可能性は低いと考えられるとしております。

以上、5'末端及び3'末端の近傍配列における解析の結果から、DNAが挿入された部位に内因性の遺伝子は存在していないと考えられたということです。

続いて、23ページ（2）ORFの有無の事項でございます。

挿入DNAと5'末端及び3'末端近傍配列を含む領域のORFについて調べるために、6つの読み枠で終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する30アミノ酸以上のORF検索を行った結果、141個のORFが検出されました。これらについて、既知の毒性タンパク質及び既知のアレルゲンとのアミノ酸の配列相同性を検討しております。

次のパラグラフですが、データベースを用いまして、アミノ酸配列相同性検索を行い、検索にはE-valueの閾値は 10^{-4} に設定した結果、いずれのORFも既知の毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。

続いて、アレルゲンデータベースのほうですが、連続する80アミノ酸以上について35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンの検索を行った結果、そのようなものは認められませんでした。一方で、連続する8アミノ酸と一致する既知のアレルゲンの検索結果については、推定アレルゲンと一致する潜在的なORFが2つ検出されました。

省略して、67と115と呼ばさせていただきますが、67はPATタンパク質のコーディング配列内に含まれ、PATタンパク質と異なった読み枠における54アミノ酸に相当する潜在的なリーディングフレームであり、67に含まれる連続する8アミノ酸が*Aspergillus fumigatus*の推定アレルゲンであるAsp f7の2つの異型からも見いだされました。Asp f7は呼吸器官に

関するアレルゲンであり、吸入経路での感作であることが知られております。しかしながら、67は終止コドンから終止コドンまでで推定されたリーディングフレームであり、翻訳を可能とする開始コドンを上流に含んでおらず、67が実際に翻訳される可能性は極めて低いと考えられるとしております。したがって、この領域では67を翻訳ではなく、目的としたPATタンパク質が翻訳されると考えられるとしております。

続いて、115はZMM28タンパク質のコーディング配列から継ぎ目の仲介配列の相補鎖に含まれ、ZMM28タンパク質とは異なる読み枠における52アミノ酸に相当する潜在的なリーディングフレームであり、115のZMM28タンパク質のコーディング配列内に含まれる連続する8アミノ酸が*Gallus gallus*の推定的アレルゲンであるミオシン軽鎖からも見いだされました。しかしながら、115は転写を開始する上流のプロモーター因子を有しておらず、また、転写が起こった場合、*zmm28*遺伝子のRNAと相補的なRNAが生じることでサイレンシングが起こると予想されますが、実際に*zmm28*遺伝子のサイレンシングは見られておりません。

また、上述の67と同様に、115は終止コドンから終止コドンまでで推定されたリーディングフレームであり、転写産物の翻訳はフレーム内で開始する必要がありますが、フレーム内に開始コドンや代替開始コドンは存在しておりません。

以上のことから、これらのORFのフレームから実際にペプチドが翻訳される可能性は極めて低いと考えられるとしております。なお、両方の連続した8アミノ酸はほかの一般的に消費されている食品にも含まれており、ブドウやソルガムにおいてそれぞれ検出しております。しかし、これらの既知アレルゲンには先ほどのアミノ酸配列は含まれておりません。

以上のことから、DP202216には潜在的に発現する可能性のあるペプチドが毒性またはアレルギー性を示す可能性は極めて低いと考えられるということでございます。

続いて、25ページをお願いいたします。2の遺伝子産物の組換え体における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項でございます。

DP202216中のZMM28タンパク質及びPATタンパク質の産生量をELISA法により測定し、結果は次のページの表6及び表7に示したとおりでございます。なお、内在性のZMM28タンパク質導入遺伝子から産生されるタンパク質は同一であり、これらを区別することはできないことから、DP202216におけるZMM28タンパク質の産生量は、内在性のタンパク質との合計の値となっております。DP202216の内在性のタンパク質と導入遺伝子から産生されるタンパク質を区別することは不可能ではございますが、対照トウモロコシにおけるタンパク質量を比較することによって、その増加量を推定することができるというようにしております。

27ページに行きまして、3、4の（1）（2）については記載のとおりでございます。

続いて、28ページの下から物理化学的処理の項目ですが、DP202216で産生されるZMM28タンパク質のアミノ酸配列は、トウモロコシの内在性のアミノ酸配列と一致して

おり、また、食用に用いられる商用スイートコーン種であるZMM28タンパク質も同一のアミノ酸配列を有し、さらにほかの食用作物、果物、野菜もZMM28タンパク質と相同性を示すタンパク質を有していることが報告されております。

また、デント種のトウモロコシは食用として利用される完熟期のDP202216で産生されるZMM28タンパク質量は、食用に用いられる乳熟期の商用スイートコーン種で産生されるタンパク質量の範囲内であったということでございます。このことから、DP202216で産生されるZMM28タンパク質の物理化学的性質に起因した新たなアレルギーが誘発する可能性は極めて低いと考えられるとしております。

DP202216で産生されるPATタンパク質のアミノ酸配列は、これまでに承認を得ている組換えトウモロコシで産生されるPATタンパク質のアミノ酸配列と同一のものでございます。

PATタンパク質については、人工胃液を用いたSDS-PAGE分析及び人工腸液を用いたウエスタンブロット分析で、PATタンパク質のバンドが30秒後には検出されないこと、また、90℃、60分間の加熱により免疫反応性が認められたが、酵素活性は失われていることなどが報告されており、これらのことから、PATタンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと結論されております。

続いて、(4) (5) は記載のとおりでございます。

続いて、31ページをお願いいたします。遺伝子の安定性に関する項目です。

導入された遺伝子の安定性を確認するため、5世代の葉の組織から抽出したゲノムDNAを制限酵素で処理し、サザンブロット分析を行った結果、いずれの世代においても同じ本数及びバンドのサイズが認められ、DP202216中の挿入遺伝子は後代に安定して遺伝していることが確認されました。

続いて、35ページからが代謝経路への影響です。

DP202216では、ZMM28タンパク質の早期発現、発現増加により、光合成や窒素代謝効率の向上及び初期の栄養成長が促進されることで収量の増加をもたらされると考えており、実際にDP202216における作用機序を理解するためにZMM28タンパク質の標的として光合成における集光経路、前駆体代謝物とエネルギーの生成、炭水化物の代謝プロセスに関する遺伝子が同定されました。

また、ZMM28タンパク質はトウモロコシ内在性遺伝子であることから、既存の代謝経路に影響を与える可能性が考えられますが、新たな代謝経路が生じるとは考えにくいとしております。したがって、DP202216におけるZMM28タンパク質の発現により、宿主の代謝経路にトウモロコシの種としての範囲を超えた変化が生じる可能性は低いと考えられるということです。

実際に種子の構成成分分析結果においては、非組換えトウモロコシとDP202216との間に相違は認められず、したがって、代謝経路に与える影響は小さいと考えられるとしております。

続いて、PATタンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートに対して基質特異性を有し、L-グルホシネートの光学異性体であるD-グルホシネートをも基質としないことが報告されております。したがって、PATタンパク質が、宿主の代謝経路に影響を及ぼす可能性は低いと考えるということです。

続いて、7、宿主との差異に関する事項です。

種子中の主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル、ビタミン、栄養阻害物質等の分析を行いまして、非組換えトウモロコシとの比較を行いました。

分析結果でございますが、統計学的有意差がないか、あったとしても自社の商業品種の変動の範囲または文献値の範囲内であった場合は、当該分析の項目は従来のトウモロコシと同等であるというように判定をしております。

続きまして、48ページをお願いいたします。諸外国における認可、食用等に関する状況ですが、記載のとおりでございます。この表では、カナダのみ承認されております。

9、10については記載のとおりでございます。

申請書の説明は以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回は、このトウモロコシ、デントコーンで、グルホシネート耐性の*pat*遺伝子については今まで何回も出てきていて、これは何度も審査しておりますが、今回、収量増加に関する*zmm28*遺伝子、これが新しいところでして、この辺で明らかに代謝系に影響を与え得る可能性がありますので、その辺、慎重に御意見いただければと思います。

また、ZMM28、これは内在性のタンパク質であって、スイートコーンにはある程度あるということから、食経験があるということで、人工胃液、人工腸液の試験は行っておりません。それでいいのかどうか。

それから、20ページ、解析方法のところ小さく注釈になっているのですが、キャプチャー技術プラスSouthern by SequenceというSbS法という新しい技術を使っております、それでいいのかという。今回の申請についてはいろいろと議論すべきポイントもあろうかと思います。諸外国でも●●●とかそういう状況で、それでもカナダのように審査終了しているところもあるという状況です。

トウモロコシですし、また、代謝系でややこしそうなので私も本日、欠席とは分かっていたので、〇〇〇のほうから詳しい御意見をいただいております。

事務局のほうから〇〇〇の御意見を紹介していただけますでしょうか。

〇〇〇 事前に〇〇〇のほうに意見を伺いました。全部で5点コメントいただきまして、それぞれ順に紹介させていただきます。

まず1点目、申請書の15ページなのですが、収量増加の作用機作について、Wu *et al.* 2019の論文内容を反映させ、要旨に詳しく記載してはどうかというのがまず1点目でございます。

続いて、2点目が25ページと28ページに関する項目でございますが、ZMM28タンパク質

の発現量について、ここではそれほどGMコーンで増えているわけではないので消化性テストを省略できる根拠の一つと考えます。また、28ページの物理化学的处理について、消化性テストを省略するためには内在性のタンパク質と導入遺伝子に由来する産物が同一であることが必要です。そのことが確認できるウエスタンブロットを概説書に載せ、分子量と発現レベル、分子量の異なるバンドがないことを確認した上で、同等かつ少量しか増えていないことを説明させてはどうでしょうか。

続いて、3点目が31ページになります。後代の安定性についてサザンブロット分析の説明がありません。特に*zmm28*プローブを用いたサザンブロットについては内在性の遺伝子とハイブリするために結果を丁寧に説明する必要があると考えます。

続いて、4点目が35ページ、ZMM28が発現することによる代謝系への影響ですが、発現がゼロの組織で強発現させているわけではないので、しかも、量的な増加がごく限られていることから、代謝系への影響は限定的であり、現在の概説書の記述でよいと思います。

最後に、5点目が20ページです。Southern by Sequenceの精度については、本専門調査会で初めて出てくる解析手法であれば、精度について議論する必要があると思います。

以上の5点でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。〇〇〇の御指摘、本申請書のポイント、よく突いていると思います。

まず、一番最初の概説のところなのですが、由来とか日本への伝来とか、そういうのはよく書いてあるのだけれども、推定量を摂取する以上、全世界との生産高とか利用法とか、そういったところを普通は書いていただくのですが、この辺が書いてありませんので、もう少し詳しく書いていただけたらなとも思うのですが、〇〇〇はポイントを突いてくださっておりますので、それに関連するところから議論したい、それから、全体の議論に移りたいと思うのですが、まず収量増加の作用機作です。

これは非常に興味深いところでもあって、それがまた代謝系にどう影響するのかという、どう影響し得るのかということにも関連するので詳しく書いていただきたいところなのですが、〇〇〇の御意見では、Wuさんの論文内容を反映させて要旨にもう少し詳しく書いていただいたらどうかという御意見が来ております。

この点につきまして、植物関連の先生方、御意見いただきたいのですが、〇〇〇、いかが。

〇〇〇 このWuさんのをちゃんと読んでいないのですが、これはZMM28が増えて全体が活性化するというを言っているが、ZMMタンパクはそんなに増えていないからというのを後で言っているのでは何か矛盾を感じるのです。だから、そのちょっとした差がどうということ、代謝を変えているのかというのがこのWuさんのにちゃんと出ているのならいいのですが、そこをちゃんと知りたいという。例えばタンパクの量は変わらないけれども、会合して働いているのかどうか。だとすると、それが生理的にヒトに対して何か影響があるかどうかというのをやはり知りたいなという気がいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 私、これは知っているのですけれども、ある意味、よくこれはコサプレッションがかからなかったなというのが正直なところ。うまくやって、でも、これはずっと安定に本当にやっていくのは大変だろうなと思って読んでいた内容なののですけれども、結構後代にわたっても安定に、Wuさんの論文を超えた後代について見ているので、やはりそれは概要のところに、評価書のところに書く上においても、一般の方にもこういうものですよということで分かっていたくためには少し書き加えておいていただいたほうが、事務局が評価書を作る上においてもいいのではないかなと思います。

あとは、これはほんのちょっとしか上がらないというか、そこはある意味で肝ですね。めちゃくちゃ上げたらぐちゃぐちゃになるはずと私は考えます。むしろ、これはよく本当にこの量の安定なやつを選んできたなというのは感心しているというのが感想です。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

今日、申請者をお呼びしてその辺をもう少し詳しく説明していただくようお願いするべきかなとも思います。

〇〇〇の2番目のところ、これは発現量で消化性テストを省略しておるのですけれども、GMコーンでそれほど増えているわけではないし、それから、もともと内在性でもある。それから、スイートコーンではそこそここれも検出されているものであるので、消化性テストを省略する根拠の一つと考えますということは、だからといって、消化性テストを無条件に省略してもいいと思っているとまでは言っていないと思うのですが、この辺について、まず〇〇〇、御意見を。

〇〇〇 〇〇〇のほうは発現量が微量であるということと、それから、内在性のタンパクと同等であるということが分かればとあったのですけれども、その点も含めて内在性のタンパクと同等であれば省略してもよいということでもいいのではないかと思います。

〇〇〇 そういうことで、何が何でもそのデータがなければ納得しないとまでは言わないという話でしょうか。

〇〇〇、いかが。

〇〇〇 そうですね。あまりはつきりそれでいいと断言できるほどの知識もないのですけれども、先生方が言われるのでよろしいかと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、いかが。

〇〇〇 私もそ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。

それでは、次は、ただし、〇〇〇のほうから遺伝子産物の物理化学的処理について消化性テストを省略するためには内在性のタンパク質と導入遺伝子に由来する産物が同一であ

ること、そこは説明していただきたいということで、方法としては確認できるウエスタンブロットを概説書に載せる。分子量と同等レベル、分子量の異なるバンドなどがないことを確認した上で、同等かつ少量しか増えていないことを説明させてはどうでしょうかと意見があります。

実際技術的にできるのかどうかというのもあるのですが、こういうように説明してもらえると私も納得いくかなと思うのですけれども、〇〇〇あたり、いかがですか。

〇〇〇 これはタンパクに対する抗体がありますか。ZMM28の抗体があれば、例えばスイートコーンで見られる内在性のタンパク質とこのデントコーンに発現されたものとの比較を抗体で見ることができるのではないかと思います。

〇〇〇 やはりそうですよね。抗体を持っていると、そこは率直に申請者を呼びますので聞いてみたいと思うのですが、それでその後、また議論したいと思います。いいかな。ほかに先生方、この点につきまして。

それでは、次、3番目、後代の安定性についてはサザンブロット分析の説明がありません。確かに内在性があるのでサザンブロットのパターンが結構複雑なパターンになっていて、それに対して、ただ単に図が載っているだけで説明がないのは不親切ではないかというのが多分真意だと思うのですけれども、この辺、〇〇〇、いかがでしょう。

〇〇〇 すみません、これは今までなかったでしたか。ちょっと私も記憶が定かでない、昔、これに似た例があったような記憶があるのですが、私はこの方法でいいと思うのです。その時の話しにおいて、どのぐらいの精度で解析できるかというのと難易度の話、たしかトウモロコシにおいてはゲノムが大きいのでサザンをやれる人がいなくなったので、そういう非常に高度なテクニックを持っている人を雇うお金を考えたら次世代に回したほうが全然安くて精度が高いということでたしか随分変わった、そちらにほとんどシフトしたはずなのです。

これがもう6、7年前に●●●がたしか論文に出したと思うので、そのときはトウモロコシともう一つの植物種（ダイズ？）をやった論文があると思うのです。だから、私は、これはある意味、もう新しい一つのサザンと同等な、サザンより優れたとは言いませんが、今までのサザンと同じテクニックで同等な感度で示しているというようにたしかそういうことを私、随分昔に言った覚えがあり、私はこれでいいと思うのですけれどもね。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

Southern by Sequenceのこことも関連して、そういうことかなと私も実は自分でこの辺、やったこととか全然ないので。ただ、精度については、一度はもう少し詳しい説明をいただきたいと思うのですが、トウモロコシでそもそもサザンが難しいというのはそういうことなのですね。ありがとうございます。

この点について、〇〇〇の御意見もいただきたいのです。

〇〇〇 これもやはりもうちょっと説明をしていただいて、こういうように使えばいいの

だというのを出示してもらおうと、この後、使えていいと思うのです。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、あと最後の1個、35ページにある代謝系への影響なのですが、発現がゼロの組織で強発現させているわけではないので、また、量的増加がごく限られているから現在の概説書の記述でよいと思いますとおっしゃっておられます。これは先ほどの〇〇〇のお話にもあったとおり、多分ぼんと増やすと多分いろいろなことが起こってぐしゃぐしゃになってということで、微妙なバランスの株をよくぞ選んだという感じ、多分その辺が実情なのだろうと思うのですけれども、そうすると35ページの書きぶりというのもおのずと限られるのですが、〇〇〇は35ページ、この程度の記述でいいのではないかとおっしゃっているようです。私もこれでいいのか、もう少し納得できるよう書いてほしいと思うのか、ちょっと微妙なところなのですが、〇〇〇、ここはいかが。

〇〇〇 私はこのぐらいでいいと思うのですけれども、1点、これは気にかかる問題であって、このコンストラクトではターミネーターだけが、ジャガイモなのですが、これを取り外して、元のターミネーターにして、それだけで、そこだけ切り出してパーティクルガンで打ち込んで、若いうちに大きい、見た目がちょっと大きくなるよねというやつが畑の上で出てきたら、それはセルフクロニングだよねということで評価対象にならないということがないように、食品安全委員会のルールではなっているもの、そういうものなのです。

ですから、私、それを考えると、あまりこれはきつくは言えない。要するにこの遺伝子が遺伝子重複して出てくる個体と同じはずなのです。天然にも恐らくひょっとすると、いたかもしれない、それを見つけれなかったかもしれないというように考えると、これはジャガイモのターミネーターさえ使っていなければ自然界に起こり得るものだよねと言われたときにちょっとぐうの音が出ないよなというのが本音です。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、ここはこのくらいのところであまり突っ込まなくてもと思います。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 今のところなのですが、私、逆にこの程度だったら今までの古典的な育種の中で拾っていたのではないかと思うのですね。何でこれが今まで、5、6葉のときにこんなわっと伸びるのを抑えているこういう転写因子があるということは何か意味があるのではないかという気がして、ちょっと不思議な気がしているのです。そういう意味で、この仕組みがもし分かっているのだったらここまで分かっているというのがあれば本当はいいので、でなかったら何かが、〇〇〇はうまく取ったらという言い方だと思うのですけれども、膨大なスクリーニングをしていけば自然に取れたものではないのという気はします。

以上です。

〇〇〇 これは聞いてみましょうか。〇〇〇の御指摘は大体こんなところなのですが、あと先生方、これは時間の許す限り早めに申請者を呼んで、多分今日中にこれでオーケーにはならないと思いますので、申請者を呼んで議論を始めたいと思うのですが、あとぜひこの点はと今のうちに何かございますでしょうか。

〇〇〇 ウェスタンブロットの件なのですが、ZMM28は内在性タンパク質と区別がつかないので、タンパクを抽出してきたときに一緒に取られてきてしまうので、コントロールのタンパク質と比べることが果たして意味があるかどうかというところと、あと同一であるということを申請者は添付資料3でリアルタイムPCRのデータを提出しています。ということを一応付け加えさせていただきます。

〇〇〇 その辺も申請者に説明いただければいいかなと思うのですが、今のうちありますでしょうか。では、時間が限られていますので、申請者をお呼びして議論したいと思います。よろしくお願いします。

(コルテバ・アグリサイエンス日本株式会関係者入室)

〇〇〇 御出席ありがとうございます。

自己紹介、お願いします。会社名とお名前と。

〇〇〇 コルテバグループの〇〇〇と申します。

〇〇〇 同じく〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じく〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じく〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 時間は限られておりますので、今回、新しい遺伝子を導入してということで、トウモロコシデント種に関して、序盤のところで由来等々書いてあります。また、推定摂取量がありますが、推定摂取量を計算するための根拠として、この全世界での生産高とか、それから、主な利用法などについても一般的なことです、もう少し記述していただければと思います。

それから、15ページのあたり、やはり *zmm28* 遺伝子による収量増加のメカニズムについてなのですが、この作用機作について、2019年のWuさんの論文内容などを反映していただいてももう少し詳細に記述していただくことはできますか。

〇〇〇 今、15ページに書いてあるメカニズムのほうは調べたもの、表現型のほうを記載しておりまして、もう少し細かいことになると35ページの6のところで代謝系への影響に関する事項のところ、どのような遺伝子等々が見つかってきたかということがこちらに記載しておりますが、こちらの記載を先ほど申し上げました15ページのところに追記するという形でよろしいでしょうか。

〇〇〇 15ページのところを読んで、それでももう少し分かるように丁寧に書いていただけるといいなということなのですが、お願いできますか。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 今回のこの発現量、ZMM28タンパク質、消化性テストはやっていないというこ

となのですが、内在性ですし、特に増えていないので、絶対必要というわけでもないとも考えられるのですが、まず先にこれをお尋ねしたいのですが、ZMM28タンパク質について、抗体をお持ちですか。

〇〇〇 ウェスタンブロッティング等は実施をしておりますので、抗体は持っていると理解しております。

〇〇〇 なるほど。消化性テストを省略、絶対なければいけないか、この場合は必ずしもそうでなくてもいいかなと思うのですが、その場合、内在性のタンパク質と、それから、今回導入した遺伝子に由来するタンパク質が同一であるということが当然前提条件になりますので、抗体をお持ちであれば、それを確認できるウェスタンブロットなり、分子量と発現レベルとか、それから、分子量の異なるバンドとか分解産物なり、そういうものがないということを確認する。

それから、こいつが同等なり別にちょっと増えていたらいけないというわけではなくて、当然導入しているわけだからその分増えているとは思いますが、これが著しく問題になるほど増えていないとか、それから、スイートコーンでは、これもあるということなので、そういうのに比べて著しく増えていないという説明はいただきたいと思うのですが、そういう実験をこれは可能ですか。

〇〇〇 ウェスタンブロッティングのデータを書くことは可能です。一方で、著しく増えていないということは、いわゆる植物体内でのZMM28のタンパク質量のお話ということでしょうか。

〇〇〇 それでよろしいかと思います。要するに、このトウモロコシ、食べて安全かどうかというところがポイントですので、転写因子なのでそんなに安定性の高いものではないだろうとも思いますし、また、これが即そのまま毒というわけでもないだろうとは思いますが、その辺の説明をいただきたいなと思います。

〇〇〇、何か足すことはありますか。

〇〇〇 たしか28、29ページに測定したデータが入っていますが、これは、タンパクはELISAとかで測定してらっしゃるのでしょうか。タンパク質の量ですね。表の8とかで解析しているのはタンパク質。ZMM28タンパク質というのはELISAとかで、こういった方法で測定をされていますでしょうか。

〇〇〇 こちら、今、手元で確認をいたしますが、表8のデータをウェスタンブロッティングで実施しております。なお、先ほど御指摘いただいたタンパク質の発現量のデータにつきましては、26ページの表6のほうに本組換えトウモロコシと対照のトウモロコシの発現量のデータを記載しております。こちらで増加量等は推定することができると考えておりますが、いかがでしょうか。

〇〇〇 これは表6の見方としては代謝だから。

〇〇〇 表6の上の段が、DP202216が本組換えトウモロコシにおけるZMM28タンパク質の発現量です。一方で、こちら、ZMM28タンパク質は、内在性、内在のタンパク質も出

ておりますので、下の段がトウモロコシ、対照のいわゆる非組換えトウモロコシの発現量となっております。

したがって、組換えトウモロコシのほうで出ているものというものは、いわゆる内在のZMM28タンパク質と外来の遺伝子から発現したタンパク質の合計量となっております。この2つを実際区別する、全く同じタンパク質ですので区別することは困難なのですが、下の段の対照のトウモロコシの内在性の発現量から外来の遺伝子由来のタンパク質がどれくらい出ているかということは推定することは可能でございます。

〇〇〇 引き算をする形ですね。分かりました。

〇〇〇 そうですね。それを見ていただくと大体どの組織でもppbレベルで増えているということで、そんなに何倍にもというわけではなくて、10億分の1ぐらいのレベルの範囲で増えているということがこちらから推定できます。

〇〇〇 この辺りもどれくらい増えたかというのは文章の中にでも入れていただければ、25ページですね。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 〇〇〇、ここはよろしいですか。

33ページ、サザンブロットの図なのですが、34ページの*pat*のサザンブロット、これは、*pat*は外来で、内在性がないのできれいにしているのだが、33ページのほう、内在性の遺伝子があるせいもあってこんなかなり複雑なパターンになっていると思うのですが、それにしても、このサザンのパターンについて何も説明がないというのは少々これでは納得いかないもので、少々詳しくこの説明をいただきたいと思います。これ、よろしくお願いできますか。

〇〇〇 サザンブロットの結果について説明を追記するという事で承知いたしました。

〇〇〇 それから、20ページ、Southern by Sequence、SbSによって解析を行った。これは新しい技術でもありますので、これについて、この精度が、従来今まで証明に使われてきた手段を上回るものであって十分同等以上であるということを説明いただきたいのですが、それはすぐできますよね。

〇〇〇 そうですね。どれくらいキャプチャーできているか等の回収効率等を含めて説明することは可能です。

〇〇〇 割とこの方法で解析したデータで、それをもって評価、審議するというのがございますので、この点については従来の方法に比較してということも含めて、少々詳しく説明等をお願いいたします。

それから、発現の代謝系への影響について35ページにこの記述がございまして、現時点で書けるのはこのくらいなのかもとも思うのですが、ここはどうしようかな。〇〇〇、もう少し突っ込んでいただけますか。

〇〇〇 ちょっとお伺いしたいのですが、これは転写因子のタンパク質なのですが、ちょっと上がっただけでこれだけ5、6葉のときに生育がわっとよくなるというのですと、これ

は遺伝子を導入して組み込むよりも、組み込んでもいいのですが、普通の今までの古典的な自然突然変異だとかああいうのでも出てきそうな気がするのですが、これで組み込んだときに何か違いがあるのでしょうか。特に何かやってあるということはありませんか。

〇〇〇 もちろん、ふだんの一般的な育種においても収量というのは一つの大事な形質でございますので、それを増やすよう、一つ目標としてはしておりますけれども、ZMM28タンパク質におきまして、自然的な育種でこのようなものが取れてくれればいいのですが、今回は組換え技術を使ってこの部分をターゲットにして収量を上げたという方法を選択したということでございます。

〇〇〇 ということは、自然でもできることはできるけれども、早く育種するにはこの方法を取ったというような考え方でいいのですか。

〇〇〇 それはZMM28の発現が突然変異等で上がる可能性があるかということでしょうか。

〇〇〇 何か代謝が変わるのを抑えている仕組みが本当はほかにあるのではないかという気がしたので、それをもし外されているのだったら、この代謝が変わったところを書かなくてはいけないと思うので、そうではないのだと、ただ、今、〇〇〇がおっしゃられたように普通の育種でも取れるものをここでやったのですと、組換えでやったのですということなのかどうかというのをちょっと知りたかったのです。

〇〇〇 収量増加というものはいろいろなバランスの上に成り立っているものですので、なかなかどういうようにしたら上がるかということを申し上げるのは難しいところではあるのですけれども。

〇〇〇 先ほど言ったように代謝の流れを変えるのをやはりあまりに変えるとめっちゃになるので抑えているものがあって、それが外れるというような仕組みでなっているのか、ただ、増加されただけだったのかというのをちょっと。それによってこの書き方は変わるかと思いましたのでお伺いしました。

〇〇〇 そうです。何か抑制しているものを止めているというよりかは、内在にあるものを少し早く発現させることによって効率をよくするというように考えております。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 35ページの代謝経路に関する、これとも絡むのですけれども、やはり代謝系、微妙なバランスの上でもっている。恐らくそのとおりだろうと思いますが、代謝系に関して余計なところに影響していないという保証もこちらとしてはいただきたいところではあるので、現状で分かっている限りのこの転写因子の支配下にある遺伝子とかその特徴とか、そういうこのモチーフの持っているものは非常に限られているから、ほかには影響が及ぶ可能性が低いとか、そういうもう少し35ページのところを分かる限り細かくというか詳しく書いていただけるとありがたいのですが、それはお願いできますか。

〇〇〇 承知いたしました。そういう流れで言いますと、例えば今、ここ、35ページではZMM28タンパク質の発現増加によって光合成における集光経路、また、エネルギーの生

成や炭水化物の代謝プロセス等に関与する遺伝子が上昇したり変化するということが同定されておりますので、その辺りを先ほどの15ページの部分に追記した上で議論させていただければと考えております。

〇〇〇 15ページに移すべきものと、それから、35ページとして、ここはここでまとめた議論でいただきたいと思いますので、多少の重複はよろしいと思いますが、それぞれでまとめて一貫性のある記述にさせていただけるよう、よろしくお願いいたしますと思います。

先生方、ほかにこの申請者の方に質問したいことはございますでしょうか。よろしいでしょうか。ありがとうございます。

お忙しいところ、御出席ありがとうございます。質問はここまでです。

〇〇〇 ありがとうございます。失礼いたします。

(コルテバ・アグリサイエンス日本株式会社関係者退室)

〇〇〇 それでは、申請者は退室しましたので、ということで、いろいろと宿題が出ましたので、これでオーケーということにはならないかと思いますので、先生方からいただいた意見等々で、これで申請書案、確認事項、この指摘事項案、これを取りまとめて先生方と、それから、私とで確認した上で厚生労働省を通じて申請者に対して指摘したいと思います。この件に関して、少々じっくり慎重に議論したいなとも思いますので、先生方、しばらくまたお付き合い、お願いいたします。

では、食品が駄目なので自動的に飼料のほうも後回しということで、議題（1）についてはこれで終わりたいと思います。

議題（2）その他ですが、事務局のほうからございますか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 それでは、本日の議題について、これで終了ということにしたいと思います。

以上をもちまして、第208回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、閉会いたします。

予定時間を超過して申し訳ございませんでした。ありがとうございます。