

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼに係る食品健康影響評価（令和 2 年 3 月 31 日付け厚生労働省発生食 0331 第 20 号）については、令和 2 年 7 月 16 日に開催された第 201 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

2. JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼに係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

令和 3 年 3 月 30 日（火）開催の食品安全委員会（第 810 回会合）の翌日の令和 3 年 3 月 31 日（水）から令和 3 年 4 月 29 日（木）までの 30 日間。

2) 受付体

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。



(案)

## 遺伝子組換え食品等評価書

JPAN003 株を利用して生産された  
グルコアミラーゼ

2021年3月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## 目 次

|                                                                     | 頁  |
|---------------------------------------------------------------------|----|
| ＜審議の経緯＞ .....                                                       | 3  |
| ＜食品安全委員会委員名簿＞ .....                                                 | 3  |
| ＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞ .....                                 | 3  |
| 要 約 .....                                                           | 4  |
| II. 食品健康影響評価 .....                                                  | 5  |
| 第 1. 安全性評価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<br>伝子組換え添加物及び組換え体との相違 ..... | 5  |
| 1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料 .....                                       | 5  |
| 2. 宿主及び導入 DNA .....                                                 | 6  |
| 3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料 .....                                  | 6  |
| 4. 宿主の構成成分等に関する資料 .....                                             | 6  |
| 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料 .....                                    | 6  |
| 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<br>及び組換え体と宿主等の相違点 .....       | 7  |
| 第 2. 宿主に関する事項 .....                                                 | 7  |
| 1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項 .....                                | 7  |
| 2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項 .....                                    | 7  |
| 3. 寄生性及び定着性に関する事項 .....                                             | 8  |
| 4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項 ...                             | 8  |
| 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 .....                              | 8  |
| 第 3. ベクターに関する事項 .....                                               | 8  |
| 1. 名称及び由来に関する事項 .....                                               | 8  |
| 2. 性質に関する事項 .....                                                   | 8  |
| 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 .....                          | 9  |
| 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 .....                                          | 9  |
| 2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物<br>の性質に関する事項 .....         | 9  |
| 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<br>項 .....                    | 11 |
| 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 .....                                   | 11 |
| 5. 構築された発現ベクターに関する事項 .....                                          | 11 |
| 6. DNA の宿主への導入方法に関する事項 .....                                        | 12 |
| 7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 .....                                    | 12 |
| 第 5. 組換え体に関する事項 .....                                               | 12 |
| 1. 宿主との差異に関する事項 .....                                               | 12 |
| 2. 遺伝子導入に関する事項 .....                                                | 12 |
| 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 .....                                  | 13 |

|                                                   |    |
|---------------------------------------------------|----|
| 1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること .....              | 13 |
| 2. 添加物の製造原料又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<br>こと ..... | 13 |
| 第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....                          | 13 |
| 1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....                       | 13 |
| 2. 組換え体の残存に関する事項.....                             | 14 |
| 3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項 .....                   | 14 |
| 4. 精製方法及びその効果に関する事項.....                          | 14 |
| 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 ....            | 14 |
| 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<br>事項 ..... | 14 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価結果 .....                               | 14 |
| <参照> .....                                        | 15 |

### ＜審議の経緯＞

2020 年 4 月 3 日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食 0331 第 20 号）、関係書類の接受

2020 年 5 月 19 日 第 781 回食品安全委員会（要請事項説明）

2020 年 7 月 16 日 第 201 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021 年 3 月 30 日 第 810 回食品安全委員会（報告）

### ＜食品安全委員会委員名簿＞

佐藤 洋（委員長）  
山本 茂貴（委員長代理）  
川西 徹  
吉田 緑  
香西 みどり  
堀口 逸子  
吉田 充

### ＜食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿＞

中島 春紫（座長）  
児玉 浩明（座長代理）  
安達 玲子                      近藤 一成  
飯島 陽子                      手島 玲子  
岡田 由美子                   樋口 恭子  
小関 良宏                      山川 隆  
小野 竜一                      吉川 信幸  
橘田 和美

## 要 約

「JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Penicillium oxalicum* LCT23 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して  $\beta$ -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性、アレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

## I. 評価対象添加物の概要

名 称：JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ  
用 途：デンプン糖製造時の糖化効率の向上  
申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社  
開発者：Novozymes A/S（デンマーク）

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Penicillium oxalicum* LCT23 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロースやアミロペクチン等の多糖類の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して  $\beta$ -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

## II. 食品健康影響評価

### 第 1. 安全性評価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

#### 1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

##### (1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称：グルコアミラーゼ

基 原：*Aspergillus niger*

有効成分：グルコアミラーゼ

IUB No.： EC 3. 2. 1. 3

CAS No.： 9032-08-0

##### (2) 製造方法

グルコアミラーゼは、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過により除去される。

##### (3) 用途及び使用形態

グルコアミラーゼは、デンプン糖の製造において、デンプンの液化後に生成したデキストリンを糖化してグルコースにまで分解することにより、糖化効率を向上させることを目的として使用される。

##### (4) 摂取量

グルコアミラーゼが全てのデンプン糖製造に使用され、100%最終製品中に残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.029 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日である（参照 1、2）。

## 2. 宿主及び導入 DNA

### (1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*A. niger* BO-1 株である。*A. niger* BO-1 株は、自然界から分離された *A. niger* C40-1 株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼの生産性を向上し、夾雑酵素である  $\alpha$ -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した株である。

### (2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコアミラーゼ (*amgPOPE001*) 遺伝子の供与体は、*P. oxalicum* LCT23 株である。選抜マーカーであるオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* NRRL1092 株である。

### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*amgPOPE001* 遺伝子は、*P. oxalicum* LCT23 株の野生型グルコアミラーゼのアミノ酸配列の 1 アミノ酸が置換したグルコアミラーゼ (*amgPOPE001*) をコードする。*pyrG* 遺伝子は、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選抜マーカーに用いた。

*amgPOPE001* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を含む発現カセットを、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。

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）。

## 3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

*A. niger* は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されている。また、*A. niger* は、日本において黒麹菌として焼酎、食酢等の発酵食品の製造に広く用いられている。

## 4. 宿主の構成成分等に関する資料

*A. niger* は、オクラトキシン A 及びフモニシン B<sub>2</sub> を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株がオクラトキシン A 及びフモニシン B<sub>2</sub> を産生しないことは分析により確認されている（参照 3）。

## 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

### (1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は、以下のとおりである。

製品名：amgPOPE001

有効成分：グルコアミラーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 3

CAS No. : 9032-08-0

(2) 製造方法

amgPOPE001 は、JPAN003 株を生産菌として、従来のグルコアミラーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、2 回の除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

amgPOPE001 は、従来のグルコアミラーゼと同様に、デンプン糖製造時の糖化工程において、デキストリンをグルコースにまで分解するために使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

amgPOPE001 は、従来のグルコアミラーゼと同様に、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 $\beta$ -D-グルコースを生成する酵素である。

**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**

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

amgPOPE001 と従来のグルコアミラーゼとの相違点は、アミノ酸残基数、基原及び至適温度が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAN003 株と宿主との相違点は、JPAN003 株には *amgPOPE001* 遺伝子が複数コピー導入され、グルコアミラーゼの高産生性を獲得している点、*pyrG* 遺伝子を導入している点及びグルコアミラーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点である。

以上 1 から 6 までから、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、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**

**1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項**

宿主は、*A. niger* BO-1 株である。

**2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項**

*A. niger* は、病原性で問題となる菌種ではないとされており、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）1 に相当する（参照 4）。

*A. niger* は有害生理活性物質であるオクラトキシン A 及びフモニシン B<sub>2</sub> を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株はこれらのマイコトキシンを産生しないことが確認されている（参照 3）。

*A. niger* は、アレルギー性において特に問題となる菌種ではないとされているが、*A. niger* 由来の酵素として  $\beta$ -キシロシダーゼ、セリンプロテアーゼ及び 3-フィターゼ B がアレルゲンデータベース<sup>a</sup>に登録されている。これらの酵素は吸入性アレルゲンとして報告されており、*A. niger* 由来の酵素によるとして報告されたアレルギーは、特定職種での高頻度ばく露が起因と考えられる。*A. niger* は、国内では焼酎等の製造に安全に使用されてきた経験があるが、これらの酵素を原因とするアレルギーと *A. niger* のアレルギー性との関連性を否定できないことから、リスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分に気をつける必要がある（参照 5）。

以上のことから、適切な環境で扱われている限り、*A. niger* BO-1 株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

### 3. 寄生性及び定着性に関する事項

*A. niger* には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

### 4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

*A. niger* には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

### 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

*A. niger* の近縁種には、日和見感染及び気管支アレルギーの原因菌である *A. fumigatus* や、オクラトキシン産性能を有する *A. carbonarius* が知られている。

## 第3. ベクターに関する事項

### 1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV016 の作製には、*E.coli* 由来のプラスミド pBluescript SK-が用いられた。

### 2. 性質に関する事項

#### (1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pBluescript SK-の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

#### (2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pBluescript SK-の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

---

<sup>a</sup> WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee 検索日：2018 年 6 月

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pBluescript SK-の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pBluescript SK-には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pBluescript SK-には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pBluescript SK-の複製開始配列は、*E. coli* で機能する。

#### 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

##### 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

*amgPOPE001* 遺伝子の供与体は *P. oxalicum* LCT23 株、*pyrG* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(2) 安全性に関する事項

*P. oxalicum* は、農業やバイオ技術等の分野で広く利用されている (参照 6)。

*A. nidulans* は、食経験は認められていないが、*pyrG* 遺伝子は、選抜マーカーとして長年利用されてきた実績を有する。

*P. oxalicum* 及び *A. nidulans* はともに、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する (参照 4)。

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

*amgPOPE001* 遺伝子は、*P. oxalicum* LCT23 株のゲノム DNA を鋳型として、野生型のグルコアミラーゼ遺伝子の分泌シグナルを含む配列を PCR 法で増幅し、1 カ所のアミノ酸が置換するように変異を導入して得られた。

*pyrG* 遺伝子は *A. nidulans* NRRL1092 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR により得られた。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

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いる (参照 7)。

### (3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

#### ① *amgPOPE001* 遺伝子

*amgPOPE001* 遺伝子がコードする *amgPOPE001* は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 $\beta$ -D-グルコースを生成する。

##### a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

*P. oxalicum* LCT23 株のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索<sup>b</sup>を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

##### b. 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

*amgPOPE001* を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。また、*P. oxalicum* LCT23 株のグルコアミラーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索<sup>b</sup>を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

##### c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

###### (a) 人工胃液に対する感受性

*amgPOPE001* の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 0.5 分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（参照 8）。

###### (b) 人工腸液に対する感受性

*amgPOPE001* の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 30 分以降より徐々に消化されることが示されたが、試験開始後 6 時間においても完全には分解されないことが示された（参照 8）。

###### (c) 加熱処理に対する感受性

*amgPOPE001* の加熱処理に対する感受性について確認した結果、約 80°C・30 分で失活することが確認された。

##### d. 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

*amgPOPE001* と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース<sup>c</sup>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で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして Sch c1 (*Schizophyllum commune* 由来のグルコアミラーゼ) が検出された（参照 9）。

<sup>b</sup> PubMed、検索日：2018 年 10 又は 12 月

<sup>c</sup> ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version18)

*S. commune* は、一般的に観察される真正担子菌であり、アレルギー性気管支肺真菌症（ABPM）等の特定のアレルギー疾患を引き起こすとの報告があり、アレルゲンとしてグルコアミラーゼ（Sch c1）が同定されている（参照 10）。しかしながら、人工胃液処理に対する感受性が高いことから amgPOPE001 のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

なお、amgPOPE001 は、グルコース製造過程のカラム精製工程において除去されるため、amgPOPE001 が摂取される可能性は低い。

## ② *pyrG* 遺伝子

*pyrG* 遺伝子は、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、ウリジン要求性を相補する選抜マーカー遺伝子として長年使用されてきた。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼがアレルギー誘発性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、amgPOPE001 及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼがアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

## 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

### (1) プロモーターに関する事項

amgPOPE001 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *na2* 遺伝子のプロモーター配列である。*pyrG* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のプロモーター配列である（参照 11）。

### (2) ターミネーターに関する事項

amgPOPE001 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーター配列である（参照 11）。

### (3) その他、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には、その由来、性質等が明らかであること

amgPOPE001 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 (*payA* 5'UTR 配列) を用いた（参照 11）。

そのほか、インテグラーゼ認識配列 (FRT-F / FRT-F3 配列) が用いられている。

## 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pBluescriptSK- に、インテグラーゼ認識配列を両端に配した amgPOPE001/*pyrG* 遺伝子発現カセット、インテグラーゼ遺伝子等を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pJPV016 を作製した。

## 5. 構築された発現ベクターに関する事項

### (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV016 の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 11）。

(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が含まれていないこと  
第 5－2－（2）に記載のとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクターpJPV016 の FRT-F 配列から FRT-F3 配列までの遺伝子発現カセットを含む領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクターpJPV016 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

## 6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

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 pJPV016 を導入し、インテグラーゼの作用により、ベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある *amgPOPE001/pyrG* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*pyrG* 遺伝子による選抜を行った後に、*amgPOPE001* の産生量を指標として形質転換体を選択した。

## 7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV016 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。このことは、シーケンス解析により確認されている（参照 7）。

## 第 5. 組換え体に関する事項

### 1. 宿主との差異に関する事項

JPAN003 株は、*amgPOPE001/pyrG* 遺伝子発現カセットが導入され、グルコアミラ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点で宿主と異なる。

### 2. 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

各遺伝子座への *amgPOPE001/pyrG* 遺伝子発現カセットの挿入を確認するためにシーケンス解析を行った結果、設計通り全長の遺伝子発現カセットが挿入された遺伝子座及び *pyrG* 遺伝子が重複した遺伝子座があることが確認さ

れた。また、挿入領域近傍の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（参照 7）。

## （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

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  
（以下「ORF」という。）の有無を確認するために、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複  
数の遺伝子座で、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  
合計 982 個検出された。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、ア  
レルゲンデータベース<sup>c</sup>を用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ  
酸以上の配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 ア  
ミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、Sch c 1 が検出されたが、第 4  
－ 2 －（3）に記載のとおり、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられた。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認す  
るために、MvirDB データベース（参照 12）を用いて E-value<0.02 を指標と  
して検索を行った。その結果、2 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（参  
照 13～16）。

## 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

### 1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

amgPOPE001 製剤の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使  
用されてきた実績がある。

### 2. 添加物の製造原料又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

amgPOPE001 製剤の製造原料及び製造器材は、安全に使用されてきた実績を  
有することから、有害性はないと考えられる。また、本製品の原料は Food  
Chemicals Codex（FCC）等の規格に適合している。

## 第 7. 遺伝子組換え添加物に関する事項

### 1. 諸外国における認可、食用等に関する事項

amgPOPE001 製剤は、フランス及びカナダにおいて、食品用加工助剤及び食  
品酵素のポジティブリストに収載されている（参照 17、18）。

---

<sup>c</sup>ネブラスカ大学アレルゲンデータベース（FARRP version18）

## **2. 組換え体の残存に関する事項**

ドットブロット解析により、amgPOPE001 製剤前の酵素サンプルには組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 19）。

## **3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項**

amgPOPE001 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（参照 20）。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、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

## **4. 精製方法及びその効果に関する事項**

amgPOPE001 製剤は、生産菌の培養物を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考えられる。

## **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**

amgPOPE001 製剤の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられる。

## **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**

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。

## **Ⅲ. 食品健康影響評価結果**

「JPAN003 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）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と判断した。

## <参照>

1. 平成29年国民健康・栄養調査報告.
2. Typical Composition\*\*\*. (社内文書)
3. Analysis of selected strains derived from *A.niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内文書)
4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊 1 「病原体等の B S L 分類等」
5. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology, Review* 2002;59(4-5):426-435.
6. Kubátová A, Hujšlová M, Frisvad JC, Chudíčková M, Kolařík M. Taxonomic revision of the biotechnologically important species *Penicillium oxalicum* with the description of two new species from acidic and saline soils. *Mycological Progress, Article* 2018:1-14.
7. Sequence of the \*\*\* loci in JPAN003 (社内文書)
8. Digestibility and Purity of amgPOPE001 protein in a toxbatch \*\*\* (社内文書)
9. Sequence homology of ORFs in the \*\*\* on the genome of JPAN003 to allergens and toxins (社内文書)
10. 臨床検体より *Schizophyllum commune* が分離された症例の検討. *日本医真菌学雑誌* 1999;40:175-181.
11. 遺伝子導入ベクター pJPV016 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
12. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD et al. MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D391-394.
13. da Silva ACR, Ferro JA, Reinach FC, Farah CS, Furlan LR et al. Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature, Article* 2002;417(6887):459-463.
14. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK et al. A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science, Article* 2003;299(5615):2074-2076.
15. Chien MC, Morozova I, Shi SD, Sheng HT, Chen J et al. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. *Science, Article* 2004;305(5692):1966-1968.
16. Albert-Weissenberger C, Sahr T, Sismeiro O, Hacker J, Heuner K et al. Control of Flagellar Gene Regulation in *Legionella pneumophila* and Its Relation to Growth Phase. *Journal of Bacteriology, Article* 2010;192(2):446-455.
17. 仏国の食食用加工助剤ポジティブリスト .  
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000020667468> [accessed Feb 17, 2020]

18. List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives).  
<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/5-enzymes.html> [accessed May 16, 2018.
19. The analysis of residual DNA in \*\*\* by means of dot blot hybridization (社内  
文書)