

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 JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼに係る食品健康影響評価（令和 3 年 5 月 17 日付け厚生労働省発食 0517 第 4 号）については、令和 3 年 7 月 21 日に開催された第 213 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. JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダ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 4 年 1 月 18 日（火）開催の食品安全委員会（第 844 回会合）の翌日の令和 4 年 1 月 19 日（水）から令和 4 年 2 月 17 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

JPAo008 株を利用して生産された
アミノペプチダーゼ

令和4（2022）年1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
Ⅰ. 評価対象添加物の概要	5
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 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	7
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	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	8
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 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 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	12
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	13
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	13
第 5. 組換え体に関する事項	13
1. 宿主との差異に関する事項	13
2. 遺伝子導入に関する事項	13
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	14

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	14
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	14
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	14
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	15
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	15
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事項	15
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

＜審議の経緯＞

2021 年 5 月 18 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 0517 第 4 号）、関係書類の接受

2021 年 5 月 25 日 第 817 回食品安全委員会（要請事項説明）

2021 年 7 月 21 日 第 213 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2022 年 1 月 18 日 第 844 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

2021 年 6 月 30 日まで	2021 年 7 月 1 日から
佐藤 洋（委員長）	山本 茂貴（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）	浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹	川西 徹（委員長代理 第二順位）
吉田 緑	脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり	香西 みどり
堀口 逸子	松永 和紀
吉田 充	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＞

2021 年 9 月 30 日まで	2021 年 10 月 1 日から
中島 春紫（座長）	中島 春紫（座長）
児玉 浩明（座長代理）	山川 隆（座長代理）
安達 玲子	安達 玲子
飯島 陽子	小野 竜一
岡田 由美子	岡田 由美子
小関 良宏	近藤 一成
小野 竜一	小関 良宏
橘田和美	樋口 恭子
	小野 道之
	藤原 すみれ

要 約

「JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、宿主株由来のアミノペプチダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼである。本添加物は、タンパク質又はペプチドのアミノ末端から加水分解する酵素であり、タンパク質加水分解物製造時の苦味除去及び風味向上に使用される。

「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 of 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。

以上のことから、「JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼ」は、人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

(申請内容)

名 称：JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼ

用 途：タンパク質加水分解物製造時の苦味除去及び風味向上

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 oryzae* IFO4177 株を宿主として、宿主由来のアミノペプチダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼである。本添加物は、タンパク質又はペプチドをアミノ末端から加水分解する酵素である。また、タンパク質加水分解物の製造における苦味除去及び風味向上に使用される。

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：アミノペプチダーゼ

基 原：*Aspergillus oryzae*

有効成分：アミノペプチダーゼ

IUB No.：EC 3. 4. 11. 1

CAS No.：9001-61-0

(2) 製造方法

アミノペプチダーゼは、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、菌体成分の除去等の処理を行った後、ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

アミノペプチダーゼは、タンパク質又はペプチドのアミノ末端からアミノ酸を遊離させる酵素である。

アミノペプチダーゼは、タンパク質加水分解物の製造において、苦味除去及び風味向上の効果をすることによる品質の向上を目的に、加工助剤として使用されている。

(4) 摂取量

既存のアミノペプチダーゼ製品が全て本添加物を用いた製品に置き換

わり全ての「その他の調味料」^aの製造に使用され、最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は 3.7 mg TOS (Total Organic Solids) / kg 体重/日である。

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. oryzae* IFO4177 株である。*A. oryzae* IFO4177 株は、清酒麴から分離された野生株である。(参照 1)

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

アミノペプチダーゼ (*apeAO*) 遺伝子の供与体は、*A. oryzae* IFO4177 株である。オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子及びロイシン要求性 (*LEU2*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. oryzae* IFO4177 株及び *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171T 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

apeAO 遺伝子は、アミノペプチダーゼ (*apeAO*) をコードする。*pyrG* 及び *LEU2* 遺伝子は、それぞれオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ及び *S. cerevisiae* のロイシン合成酵素をコードし、選択マーカーに用いた。

アミノペプチダーゼの生産性を高めるために、*A. oryzae* IFO4177 株の α -アミラーゼをコードする *amyC* 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た (参照 2)。この際、セルフクローニングに該当しなかったため、オープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) 検索を行い、安全性を検討した (第 5-2-(2) 参照)。

apeAO 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pJPV039 をプロトプラスト形質転換法により宿主のゲノム DNA に導入した。

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. oryzae は、食品や食品用酵素の製造において、長年安全に利用されている。また、日本において、麴菌として味噌、醤油、醸造酒等の発酵食品の製造に広く用いられている。(参照 3、4)

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae は、アフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、シクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を産生する株の報告がある。(参照 5)

^a 平成 29 年「国民健康・栄養調査報告」食品群別摂取量の分類

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 : *apeAO*

有効成分 : アミノペプチダーゼ

IUB No. : EC 3.4.11.1

CAS No. : 9001-61-0

(2) 製造方法

apeAO は、JPAo008 株を生産菌として、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

apeAO は、従来の添加物と同様に、タンパク質加水分解物の製造において、品質の向上を目的に加工助剤として使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

apeAO は、従来の添加物と同様に、タンパク質又はペプチドのアミノ末端を加水分解する。

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

apeAO と従来のアミノペプチダーゼとの相違点は、生産菌が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo008 株と宿主との相違点は、JPAo008 株には *apeAO* 遺伝子が複数コピー導入され、アミノペプチダーゼの高産生性を獲得している点、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子を導入している点並びに *amyC* 遺伝子を欠失している点である。

以上 1 から 6 までから、本添加物と従来の添加物及び本添加物の生産菌と宿主は、それぞれ比較可能であると判断し、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. oryzae* IFO4177 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. oryzae 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 6、7）

A. oryzae の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸を産生する株が報告されている（参照 5）。

A. oryzae 由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及び TAKA アミラーゼは、アレルゲンデータベース^bに登録されている（参照 8）。これらは産業用酵素として使用された際に吸入性アレルゲンとして報告されていることから、*A. oryzae* 由来の酵素によるとして報告されたアレルギーは、特定職種における高頻度のばく露に起因すると考えられる。一方、*A. oryzae* は、国内では味噌、醤油、醸造酒等の製造において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. oryzae* によるアレルギー誘発性との関連を否定できないことから、リスク低減のため、本菌を扱うときは、他の糸状菌と同様、胞子が飛散しないように十分気をつける必要がある。

以上のことから、適切な環境で扱われる限り、*A. oryzae* IFO4177 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. oryzae には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

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. oryzae には、ヒトに対して病原性を有する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. oryzae 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* 及びアフラトキシン産性能を有する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* が知られている。（参照 9）

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 pJPV039 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 が用いられた。

2. 性質に関する事項

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

- (1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項
プラスミド pUC19 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 pUC19 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。
- (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 pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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
apeAO 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の供与体は *A. oryzae* IFO4177 株である。
LEU2 遺伝子の供与体は *S. cerevisiae* CBS1171T 株である。
- (2) 安全性に関する事項
A. oryzae は、食品や食品用酵素の製造において、長年安全に利用されている。
S. cerevisiae は、パン酵母やアルコール発酵用酵母として、食品製造において長年安全に利用されてきた。
A. oryzae 及び *S. cerevisiae* は、いずれも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 7）

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又は合成方法に関する事項
apeAO 遺伝子は、*A. oryzae* IFO4177 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られた。
pyrG 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子は、それぞれ *A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られた。

(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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *apeAO* 遺伝子

apeAO 遺伝子がコードする *apeAO* は、タンパク質又はペプチドのアミノ末端を加水分解する。(参照 10)

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

A. oryzae のアレルギー誘発性については、第 2-2 に記載のとおりである。適切な環境で扱われる限り、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられた。

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

apeAO 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報告はない。*A. oryzae* 由来のアミノペプチダ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^cを行った。その結果、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

apeAO の人工胃液中での消化性は、既存のアミノペプチダーゼと同等と考えられるため、実施していない。

(b) 人工腸液に対する感受性

apeAO の人工腸液中での消化性は、既存のアミノペプチダーゼと同等と考えられるため、実施していない。

(c) 加熱処理に対する感受性

apeAO の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH8.0 の各温度帯で 15 分処理した後の活性を測定した。その結果、70℃の処理によって完全に失活することが示された。

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

apeAO と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び

^c PubMed (検索：2020 年 4 月)

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(FARRP version 20)

連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは、いずれも検出されなかった。（参照 11）

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択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。

③ *LEU2* 遺伝子

LEU2 遺伝子は、ロイシン合成酵素をコードし、ロイシン要求性を相補する選択マーカー遺伝子として長年使用されてきた。ロイシン合成酵素がアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから、*apeAO*、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ及びロイシン合成酵素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

apeAO 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に、*A. nidulans* Glasgow 野生株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させた *na2/tpi* プロモーター配列である。*pyrG* 遺伝子のプロモーターは、チアミン合成酵素をコードする *thiA* 遺伝子の改変プロモーター配列が用いられた。*LEU2* 遺伝子のプロモーターは、自身の野生型プロモーター配列である。（参照 12）

（2）ターミネーターに関する事項

apeAO 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。*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子のターミネーターは、それぞれ自身の野生型ターミネーター配列である。（参照 12）

（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

部位特異的組換えの標的配列及び導入後のマーカー遺伝子断片が含まれる。

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 pUC19 に、*na2* プロモーター断片、*apeAO* 遺伝子断片、*pyrG* 遺伝子断片、*LEU2* 遺伝子断片、マーカー遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片及び *pyrG* ターミネーター断片等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV039 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 pJPV039 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 12)

(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

遺伝子導入用ベクター pJPV039 について、*apeAO* 遺伝子、マーカー遺伝子の部分配列、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子以外の ORF の有無を確認するため、全領域の 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 222 個検出された。(参照 13)

次いで、上記の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベース^eを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲンは、検出されなかった。一方、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンとして、コナヒョウダニ由来のアレルゲン (Der f 15.0101) が検出された。しかしながら、このコナヒョウダニ由来の Der f 15.0101 は、吸入をばく露経路とする呼吸器感作性アレルゲンであり、食物アレルゲンとして登録されていないこと、この ORF と既知アレルゲンとの間で認められた 8 アミノ酸の一致は 1 箇所のみであることから、食物アレルギー感作性の懸念は小さいと考えられた。

さらに、上記の ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を調べる目的で、MvirDB データベース^f (参照 14) を用いて E-value<0.02 を指標として相同性検索を行った。その結果、3 個の ORF がデータベース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)

したがって、遺伝子導入用ベクター pJPV039 には、アレルギー誘発性及び毒性タンパク質をコードする ORF が含まれる可能性は低いと考えられた。

^e ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 20)

^f MvirDB (検索: 2020 年 3 月)

- (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pJPV039の全領域である。

- (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pJPV039は、構築の過程において精製されていることから、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

apeAO/pyrG 遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクターpJPV039をプロトプラスト法により標的遺伝子座へ導入した。

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pJPV039は、アンピシリン耐性遺伝子を含まない。このことは、シーケンス解析により確認している。(参照12)

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

JPAo008株は、pJPV039の挿入により *apeAO*、*pyrG* 及び *LEU2* 遺伝子が導入され、アミノペプチダーゼの生産性を高めるために *amyC* 遺伝子を欠失させている。

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

JPAo008株の *apeAO/pyrG* 遺伝子発現カセットの導入を確認する目的で、シーケンス解析を行った。その結果、標的遺伝子座に *apeAO* 遺伝子が挿入されたことを確認した(参照15)。さらに、ドロップレットデジタルPCR (ddPCR) 法を用いてコピー数を解析した結果、複数コピーの *apeAO* 遺伝子が導入されたことを確認した(参照16)。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。

- (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ORFの有無を調べる目的で、標的遺伝子導入座における挿入DNAが組み込まれた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ついて、ORF検索を行った(参照17)。また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えについて、異種遺伝子断片の残存する遺伝子座において、同様にORF検索を行った(参照18)。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 190 個検出された。

次いで、上記の ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、アレルゲンデータベース^gを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは、いずれも検出されなかった。（参照 17、18）

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調べる目的で、MvirDB データベース^h（参照 14）を用いて E-value<0.02 を指標として相同性検索を行った。その結果、データベースのタンパク質と相同性を示した ORF はなかった。（参照 17、18）

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

apeAO 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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

apeAO 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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

apeAO 製品は、米国において GRAS として認証された後、2019 年から販売されている（参照 19）。

2．組換え体の残存に関する事項

apeAO 製品中に組換え DNA の残存がないことをドットブロット分析により確認した。（参照 20）

3．製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

apeAO の製品化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、シクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシン B₁ の産生量を分析した結果、検出限界以下であることを確認している。（参照 21）

^g ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(FARRP version 20)

^h MvirDB （検索：2020 年 3 月）

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行われるならば、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

apeAO 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。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

apeAO 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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

「JPAo008 株を利用して生産されたアミノペプチダーゼ」について、「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」（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、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 坂口勤一郎、山田浩一. 麹菌の形態と其の分類に就て（其の1）, 日本農芸化学会誌. 1944年20巻1号:p.65-73
2. 欠失導入用ベクターを用いたDNA欠失の概要（社内文書）
3. Wood BJB. Oriental Food Uses of *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (editors). The British Mycological Symposium. London: Academic Press; 1977. pp. 481-498.
4. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 1992;36(5):569-572
5. Frisvad JC, Moller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology 2018;102(22):9481-9515.
6. 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BSL分類等」
7. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程（改訂第三版）
8. Search Results with *Aspergillus oryzae* from Allergen Nomenclature (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee)
9. 参考資料13. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. Food Technology and Biotechnology 2003;41(1):29-36
10. 食品酵素化学の最新技術と応用II ―展開するフードプロテオミクス―: 株式会社シーエムシー出版; 2011
11. Assessment of Sequence homology of aminopeptidase expressed by JPAo008 to allergens（社内文書）
12. 遺伝子導入ベクターpJPV039のDNA塩基配列並びに構成（社内文書）
13. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV039 on the genome of JPAo008 to proteins from MvirDB and allergens（社内文書）
14. 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
15. JPAo008株の遺伝子挿入部位の塩基配列（社内文書）
16. Copy number determination of the apeAO expression cassette in production strain NZYM-BU（社内文書）
17. Sequence homology of ORFs in the flanking regions of the pJPV039

- insertion on the genome of JPAo008 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
18. Sequence homology of ORFs in the AmyC locus on the genome of JPAo008 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
 19. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices> [accessed May11, 2020]
 20. The analysis of residual DNA in apeAO product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)
 21. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from JPAo008 (社内文書)