

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 JPAN004 株を利用して生産された α -アミラーゼに係る食品健康影響評価（令和 3 年 9 月 28 日付け厚生労働省発生食 0928 第 3 号）については、令和 3 年 12 月 22 日に開催された第 220 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. JPAN004 株を利用して生産された α -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 4 年 3 月 8 日（火）開催の食品安全委員会（第 850 回会合）の翌日の令和 4 年 3 月 9 日（水）から令和 4 年 4 月 7 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

JPAN004 株を利用して生産された
 α -アミラーゼ

令和4年（2022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
Ⅰ. 評価対象添加物の概要	5
Ⅱ. 安全性に係る知見の概要	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	9
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	10
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	12
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	12
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	15
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	15
2. 組換え体の残存に関する事項	15
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	15
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	15
<参照>	16

＜審議の経緯＞

2021 年 9 月 28 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 0928 第 3 号）、関係書類の接受

2021 年 10 月 5 日 第 834 回食品安全委員会（要請事項説明）

2021 年 12 月 22 日 第 220 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2022 年 3 月 8 日 第 850 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

山本 茂貴（委員長）

浅野 哲（委員長代理 第一順位）

川西 徹（委員長代理 第二順位）

脇 昌子（委員長代理 第三順位）

香西 みどり

松永 和紀

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）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 小野 竜一

岡田 由美子 近藤 一成

小関 良宏 樋口 恭子

小野 道之 藤原 すみれ

＜第 220 回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿＞

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

手島 玲子（岡山理科大学獣医学部教授）

要 約

「JPAN004 株を利用して生産された α -アミラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Rhizomucor pusillus* IFO2457 株由来の α -アミラーゼ遺伝子に *A. niger* BO-1 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子のデンプン結合ドメイン配列を付加した *amyJA126PE096* 遺伝子を導入して作製した JPAN004 株を利用して生産された α -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 α -1,4 結合を加水分解する酵素であり、デンプン糖製造に使用される。

「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。

以上のことから、「JPAN004 株を利用して生産された α -アミラーゼ」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：JPAN004 株を利用して生産された α -アミラーゼ

用 途：デンプン糖製造

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、*Rhizomucor pusillus* IFO2457 株由来の α -アミラーゼ遺伝子に *A. niger* BO-1 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子のデンプン結合ドメイン配列を付加した *amyJA126PE096* 遺伝子を導入して作製した JPAN004 株を利用して生産された α -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 α -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、デンプン糖製造に使用される。

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： α -アミラーゼ

基 原：*Aspergillus oryzae*

有効成分： α -アミラーゼ

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

CAS No. : 9000-90-2

(2) 製造方法

α -アミラーゼは、培養、ろ過、製剤化等の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

α -アミラーゼは、アミロースやアミロペクチン等のグルコース重合体の α -1,4-グルコシド結合をエンド型で加水分解する酵素の総称である。

既存添加物である α -アミラーゼは、デンプン糖製造において、主に液化の工程で使用される。原料であるデンプンをデキストリンまで分解するデンプン糖製造を目的に、加工助剤として使用されている。

(4) 摂取量

既存の α -アミラ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「砂糖・甘味料類」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 0.73 µg 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. 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 α -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

amyJA126PE096 遺伝子の供与体は、*R. pusillus* IFO2457 株及び *A. niger* BO-1 株である。アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amyJA126PE096 遺伝子は、 α -アミラーゼ (*amyJA126PE096*) 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た。

amyJA126PE096 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む (*amyJA126PE096/amdS*) 遺伝子発現カセットを、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、生産菌の作製において、あらかじめ *pyrG* 遺伝子を含む欠失導入ベクターを用いた相同組換えにより複数遺伝子を欠失させた。セルフクロニングに該当しない一部の遺伝子座では、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）。

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、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（参照 1）。また、日本において、焼酎や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 及びフモニシンを産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株からオクラトキシン A 及びフモニシンが産生されないことは分析により確認されている。（参照 2）

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：amyJA126PE096

有効成分： α -アミラーゼ

IUB No. : EC 3.2.1.1

CAS No. : 9000-90-2

(2) 製造方法

amyJA126PE096 は、JPAN004 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

amyJA126PE096 は、従来の添加物と同様に、デンプン糖製造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

amyJA126PE096 は、従来の添加物と同様に、デンプンの α -1,4-グルコシド結合を加水分解する。

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

amyJA126PE096 と従来の α -アミラーゼとの相違点は、生産菌、アミノ酸残基数及び分子量が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAN004 株と宿主との相違点は、JPAN004 株には *amyJA126PE096* 遺伝子が複数コピー導入され、 α -アミラーゼの高産生性を獲得している点、*amdS* 及び *pyrG* 遺伝子を導入している点並びに α -アミラーゼの生産性を高めるため複数の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 3、4)

A. niger は、有害生理活性物質として、マイコトキシンの一種であるオクラトキシン A 及びフモニシンを産生する可能性が示唆されている(参照 1、5)。これらの産生性について分析した結果、*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た(参照 2)。

A. niger は、アレルギー誘発性において、適切な管理条件下で使用される限り、特に問題となる菌種ではないとされているが、*A. niger* 由来の酵素である β -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^aに登録されている(参照 6~8)。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. 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. niger* は、国内では焼酎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. niger* 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. 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. niger には、ヒトに対して病原性を示す外来因子の報告はない。

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* 及びオクラトキシン産性能を有する *A. carbonarius* 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 pJPV026 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBluescript SK-が用いられた。

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (検索：2018 年 6 月)

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。

(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

amyJA126PE096 遺伝子の供与体は *R. pusillus* IFO2457 株及び *A. niger* BO-1 株である。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(2) 安全性に関する事項

A. niger については、第2に記載の通りである。

R. pusillus は、高熱性の糸状菌で、ヒトにおいてまれに日和見感染症を引き起こすことが報告されている。

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

R. pusillus 及び *A. nidulans* 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 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又は合成方法に関する事項

R. pusillus IFO2457 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により α -アミラーゼをコードする遺伝子を得た後、位置特異的変異導入法によって変異を導入した。さらに、*A. niger* BO-1 株ゲノムより得たグルコアミラーゼのデンプン結合ドメイン配列を付加して *amyJA126PE096* 遺伝子を構築した。なお、*A. niger* BO-1 株由来の α -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナル配列が付加されている。

amdS 及び *pyrG* 遺伝子は、それぞれ *A. nidulas* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株のゲノム 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 *amyJA126PE096* 遺伝子

amyJA126PE096 遺伝子がコードする *amyJA126PE096* は、デンプンの α -1,4-グルコシド結合を加水分解する。*amyJA126PE096* は、 α -アミラーゼ活性ドメイン及びデンプン結合ドメインより構成され、 α -アミラーゼ活性ドメインは、熱安定性向上の目的で複数のアミノ酸が置換されている。デンプン結合ドメインは、酵素活性の向上を目的に付加されている。（参照 10～12）。

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

R. pusillus のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^b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。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

amyJA126PE096 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。*R. pusillus* IFO2457 株由来の α -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^b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

^b PubMed（検索：2019年5月）

amyJA126PE096 の人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析において、試験開始後 30 秒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。ウェスタンブロット分析では、amyJA126PE096 の全長と考えられるバンドは試験開始後 30 秒以内に消失した。（参照 13）

（b）人工腸液に対する感受性

amyJA126PE096 の人工腸液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、両試験において、6 時間の処理においても完全に分解されないことが示された。（参照 13）

（c）加熱処理に対する感受性

amyJA126PE096 の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH5.5 の各温度帯で 30 分処理した後の活性を測定した。その結果、90℃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

amyJA126PE096 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^c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として、真菌由来のアレルゲン Asp o 21 及びキノコ由来のアレルゲン Sch c 1 が認められたが、いずれも安全性に影響を有する可能性は低いと考えられた。なお、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検出されなかった。（参照 14～17）

詳細は、第 5－2－（2）に記載のとおりである。

② *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解し、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

③ *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及び毒性を示す報告はない。

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21)

以上の試験結果から、*amyJA126PE096*、アセトアミダーゼ及びオロチジン 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

amyJA126PE096 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の中性アミラーゼIIをコードする *na2* 遺伝子の *na2* プロモーター配列である。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *tef1* 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 18)

(2) ターミネーターに関する事項

amyJA126PE096 遺伝子及び *amdS* 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* 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のターミネーター配列である。(参照 18)

(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

amyJA126PE096 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。また、*amyJA126PE096* 遺伝子の転写産物を安定化させ遺伝子発現量を向上させるため、Tabacco mosaic virus の coat protein 遺伝子の 3'側非翻訳領域 (*CP* 3'UTR 配列) を用いた。(参照 18)

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 pBluescript SK-に、インテグラーゼ認識配列を両端に配した *amyJA126PE096/amdS* 遺伝子断片発現カセット、インテグラーゼ遺伝子等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクターpJPV026 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pJPV026 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 18)

- (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pJPV026 の全配列を対象とした ORF 検索は実施していない。

遺伝子導入座における ORF 検索は、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pJPV026 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pJPV026 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

宿主の標的遺伝子座に、あらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した後遺伝子導入用ベクターpJPV026 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 *amyJA126PE096/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、*amyJA126PE096* 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pJPV026 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している。

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

JPAN004 株は、*amyJA126PE096/amdS* 遺伝子発現カセットが導入され、 α -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している。

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

JPAN004 株の各標的遺伝子座への *amyJA126PE096/amdS* 遺伝子発現カセットの導入を調べる目的で、シーケンス解析を行った。その結果、

設計通り各遺伝子座に全長の発現カセットが挿入されたことが確認された（参照 19）。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、各標的遺伝子導入座における挿入 DNA の 5'近傍配列領域を含む領域、並びに 3'近傍配列を含む領域について、ORF 検索を行った（参照 14～17）。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 ORF 検索を行った（参照 20～22）。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 1,029 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^c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既知のアレルゲンとして、真菌由来 Asp o 21、キノコ由来 Sch c 1 及びコナヒョウダニ由来 Der f 15 のアレルゲンが検出されたが、いずれも安全性に影響を有する可能性は低いと考えられた。（参照 14～17）

また、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が宿主の染色体塩基配列から得られた ORF に検出されたが、遺伝子導入により新たに生じたものではなかった。（参照 16）

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、タンパク質データベース^dを用いて E-value $<1.0 \times 10^{-5}$ 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 14～22）

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

amyJA126PE096 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

amyJA126PE096 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

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(The Food Allergy Research and Resource Program; FARRP, version 21)

^d NCBI データベース（検索：2021 年 7 月）

えられる。また、本製品の原料は、Food Chemicals Codex 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

amyJA126PE096 製品は、欧州及び北米を中心に販売されている。フランスではポジティブリストに掲載されている（参照 23）。米国においては、GRAS として認証されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

amyJA126PE096 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 24）

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

amyJA126PE096 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（参照 25）。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ことはないと考えられる。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

amyJA126PE096 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

amyJA126PE096 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

「JPAN004 株を利用して生産された α -アミラーゼ」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. 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.
2. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内文書)
3. 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」
4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (改訂第三版)
5. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, Article 2007;25(2):221-231.
6. Sander I, Raulf-Heimsoth M, Siethoff C, Lohaus C, Meyer HE et al. Allergy to *Aspergillus*-derived enzymes in the baking industry: Identification of beta-xylosidase from *Aspergillus niger* as a new allergen (Asp n 14). *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Article 1998;102(2):256-264.
7. Shen HD, Tam MF, Chou H, Han SH. The importance of serine proteinases as aeroallergens associated with asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*, Review 1999;119(4):259-264.
8. Doekes G, Kamminga N, Helwegen L, Heederik D. Occupational IgE sensitisation to phytase, a phosphatase derived from *Aspergillus niger*. *Occupational and Environmental Medicine*, Article 1999;56(7):454-459.
9. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, Article; Proceedings Paper 2003;41(1):29-36.
10. Juge N, Nohr J, Le Gal-Coeffet MF, Kramhoft B, Furniss CSM et al. The activity of barley alpha-amylase on starch granules is enhanced by fusion of a starch binding domain from *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, Article 2006;1764(2):275-284.
11. Li X, Yu J, Zhang J, Sun H, Zhang X. Backbone and side-chain assignments for a novel CBM69 starch binding domain AmyP-SBD. *Biomolecular Nmr Assignments* 2017;11(2):235-237.
12. Peng H, Li R, Li FL, Zhai L, Zhang XH et al. Extensive hydrolysis of raw rice starch by a chimeric alpha-amylase engineered with alpha-amylase (AmyP) and a starch-binding domain from *Cryptococcus* sp S-2. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Article 2018;102(2):743-750.
13. Digestibility and Purity of amyJA126POPE096 protein in a toxbatch

*** (社内文書) .

14. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN004 to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
15. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN004 to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
16. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN004 to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
17. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN004 to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
18. 遺伝子導入ベクターpJPV026のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
19. JPAN004株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
20. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
21. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
22. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
23. 仏国の食品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]
24. The analysis of residual DNA in *** by means of dot blot hybridization (社内文書)
25. Characterization of GMM Amylase sub- and to batches, Tox batch *** from *Aspergillus niger* (社内文書)