

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

MAM 株を利用して生産された  
 $\alpha$ -アミラーゼ

令和3年（2021年）12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 of 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 of 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.....	7
3. 寄生性及び定着性に関する事項.....	7
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.....	7
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.....	7
第3. ベクターに関する事項.....	7
1. 名称及び由来に関する事項.....	7
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.....	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	8
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.....	8
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.....	9
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	10
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	10
第5. 組換え体に関する事項.....	11
1. 宿主との差異に関する事項.....	11
2. 遺伝子導入に関する事項.....	11

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.....	11
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.....	11
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.....	12
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....	12
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	12
2. 組換え体の残存に関する事項.....	12
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項.....	12
4. 精製方法及びその効果に関する事項.....	12
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.....	12
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.....	12
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	12
<参照>.....	14

### <審議の経緯>

2020年12月1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1120第2号）、関係書類の接受

2020年12月8日 第799回食品安全委員会（要請事項説明）

2020年12月18日 第206回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年9月27日 第215回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年12月7日 第841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

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

2021年7月1日から

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>

2021年9月30日まで

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

2021年10月1日から

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

## 要 約

「MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -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、*Bacillus subtilis* DS18174 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入して作製された MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -アミラーゼである。本添加物は、デンプン等の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を加水分解することにより、低分子化する酵素である。パン製造における品質維持に使用される。

本添加物について、「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、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、「MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -アミラーゼ」については、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)

品 目：MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -アミラーゼ

用 途：パン製造における品質維持

申請者：DSM 株式会社

開発者：DSM (オランダ)

本添加物は、*Bacillus subtilis* DS18174 株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入して作製された MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -アミラーゼである。本添加物は、デンプン等の  $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を加水分解することにより、低分子化する酵素である。パン製造における品質維持に使用される。

## 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、有効成分等は以下のとおりである。

名 称 :  $\alpha$ -アミラーゼ

基 原 : *Geobacillus stearothermophilus*

有効成分 :  $\alpha$ -アミラーゼ

IUB 番号 : EC 3.2.1.1

CAS 番号 : 9000-90-2

##### (2) 製造方法

$\alpha$ -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、除菌ろ過により除去される。

##### (3) 用途及び使用形態

$\alpha$ -アミラーゼは、デンプン等の  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解することにより、低分子化する酵素である。パン製造における品質維持を目的として使用される。

##### (4) 摂取量

$\alpha$ -アミラーゼが、パン類及びその他の小麦加工品の製造工程に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.0076 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、*B. subtilis* DS18174 株である。野生株 *B. subtilis* 168 株から変異原処理及びセルフクローニングにより構築された。

### (2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

$\alpha$ -アミラーゼ (*amyM*) 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* である。

### (3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*amyM* 遺伝子は、*G. stearothermophilus* 由来の  $\alpha$ -アミラーゼをコードする。

*amyM* 遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクター pGBB21MAM1 を相同組換えにより宿主ゲノム挿入した（参照 1）。

## 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

*B. subtilis* は、長期にわたり食品用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。

## 4. 宿主の構成成分等に関する資料

*B. subtilis* が有害生理活性物質を生産するという報告はなく（参照 2）、American Type Culture Collection (ATCC) では、バイオセーフティーレベル（以下「BSL」という。）1 に分類されている（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、有効成分等は以下のとおりである。

製品名 : Bakezyme MAM

有効成分 :  $\alpha$ -アミラーゼ

IUB 番号 : EC 3.2.1.1

CAS 番号 : 9000-90-2

### (2) 製造方法

Bakezyme MAM は、MAM 株を生産菌として、培養後、生産菌の不活性化、製剤化等の工程を経て製造される。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

Bakezyme MAM は、従来の  $\alpha$ -アミラーゼと同様に、パン製造に使用される。

### (4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Bakezyme MAM は、従来の  $\alpha$ -アミラーゼと同様に、デンプンの  $\alpha$ -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

Bakezyme MAM と従来の  $\alpha$ -アミラーゼは、アミノ酸配列は同一であり、相違点は生産菌が異なる点である。

### (2) 組換え体と宿主

MAM 株と宿主との相違点は、MAM 株には *amyM* 遺伝子が導入され、 $\alpha$ -アミラーゼ生産能を獲得している点及び孢子形成能を欠失している点である。

以上から、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、*B. subtilis* DS18174 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

*B. subtilis* が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、ATCC において BSL1 に分類されている（参照 3）。

### 3. 寄生性及び定着性に関する事項

*B. subtilis* には、ヒトを含む動物及び植物に対する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

*B. subtilis* 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

*B. subtilis* は、哺乳動物の病原体として知られている *B. cereus* や *B. anthracis* とは明確に区別されている。

## 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 pGBB12MAM1 の作製には、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pE194、pUB110 及び *Bifidobacterium longum* 由来の pMB1 の複製開始配列が用いられた。

## 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 pE194、pUB110 及び pMB1 の複製開始配列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 pE194 及び pUB110 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 pE194、pUB110 及び pMB1 の複製開始配列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 pE194 にエリスロマイシン耐性遺伝子、pUB110 にはネオマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシ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 pE194 及び pUB110 の伝達を可能とする塩基配列は、遺伝子導入用ベクター pGBB12MAM1 に含まれていない。

### (6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pUB110 の複製開始配列は導入用ベクターに含まれていない。pE194 の複製開始配列は *Staphylococcus* 属及び *Bacillus* 属、pMB1 のそれは *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

*amyM* 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* である。

#### (2) 安全性に関する事項

*G. stearothermophilus* は、ヒトに対する病原性及び毒素産生成は知られておらず、ATCC では BSL1 に分類される。また、既存添加物  $\alpha$ -アミラーゼの基原の1つである。

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

#### (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

*amyM* 遺伝子は、*G. stearothermophilus* ゲノムより 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

*amyM* 遺伝子発現カセットの塩基数、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 4）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

*amyM* 遺伝子がコードする  $\alpha$ -アミラーゼは、デンプンの  $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解し、主にマルトースを生成する酵素である。コード領域内に分泌シグナル配列を含む。

①挿入遺伝子の供与体及び遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

*G. stearothermophilus* 及び *G. stearothermophilus* 由来の  $\alpha$ -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>a</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。

②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

既存添加物である  $\alpha$ -アミラーゼとアミノ酸配列は同一であり、消化性も同等と考えられことから、人工胃液・腸液処理試験は行わなかった。

加熱に対する感受性を調べた結果、85℃以上・15分で失活することが確認された。

③遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相関性に関する知見

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、データベース<sup>b</sup>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%以上の相同性を有する既知アレルゲンが、4 個検出されたが、同一配列を有する既存添加物の  $\alpha$ -アミラーゼにアレルギー誘発の報告はないことから、本添加物のアレルギー誘発性は低いと考えられた。

以上のことから総合的に判断し、本添加物は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

*amyM* 遺伝子のプロモーターは、*B. subtilis* 由来のプロモーター配列である。

---

<sup>a</sup> PubMed、検索日：2019年8月

<sup>b</sup> Allergen Online version20（検索日：2020年6月）

(2) ターミネーターに関する事項

*amyM* 遺伝子は、宿主の標的遺伝子座におけるターミネーター配列を利用して転写が終結する。

(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

該当する配列はない。

#### 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

*amyM* 遺伝子発現カセットを挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pGBB12MAM1 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 pGBB12MAM1 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 5）。

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、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

遺伝子導入用ベクター pGBB12MAM1 上の意図する挿入領域は、*amyM* 遺伝子発現カセットである。

(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 pGBB12MAM1 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

相同組換えにより遺伝子導入用ベクター pGBB12MAM1 を宿主ゲノムの標的遺伝子座へ導入し、遺伝子導入用ベクター pGBB12MAM1 にコードされる抗生物質耐性マーカーを指標に選抜した。

#### 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 pGBB12MAM1 はブレオマイシン及びネオマイシン耐性遺伝子を持ち、宿主に導入されるが分子内相同組換えによりベクター部分が除

去されているため、MAM 株には残存しない。

## 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

MAM 株は、*amyM* 遺伝子発現カセット導入され、胞子形成能関与遺伝子を欠失し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

遺伝子挿入領域の塩基配列及び制限酵素切断地図は明らかになっている（参照 4）。シーケンス解析の結果、*amyM* 遺伝子発現カセットは、標的遺伝子座に挿入されたことが確認された。（参照 6）。

#### (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' 近傍配列及び 3' 近傍配列を含む領域における 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 71 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 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして TAKA アミラーゼを含む 3 つのアレルゲンが検出された。これらのアレルゲンは従来の  $\alpha$ -アミラーゼでも同様に検出されたことから、アレルギー誘発性の懸念は従来の添加物と同等であると考えられた。連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

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、データベース<sup>d</sup>を用いて E-value<0.01 を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかった（参照 7）。

## 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

Bakezyme MAM 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。

---

<sup>c</sup> AllergenOnline v19B

<sup>d</sup> ToxProt(release 2019\_2)

## 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

Bakezyme MAM は、Good Manufacturing Practice (GMP)、HACCP 及び EU の食品衛生規則に準拠して製造されており、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（参照 8）。

## 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

Bakezyme MAM は、これまでロシア、フランス、デンマーク、メキシコ、ブラジル及び中国で食品への使用が許可されている。

### 2. 組換え体の残存に関する事項

本酵素原体に、組換え DNA が検出されないことを PCR 法により確認した（参照 9）。

### 3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Bakezyme MAM の製剤前のサンプルは、the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) の食品用酵素の規格値（参照 10）及び食品添加物公定書の規格値（参照 8、11、12）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

Bakezyme MAM は、生産菌の培養液を除菌ろ過等により除菌した後、複数の工程を経て製造されるものであり、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物質が混入するとは考えにくい。また、第 7-3 に記載した規格値を満たしていることから精製は効果的に行われていることと考えられる。

### 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

Bakezyme MAM 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な事項

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る。

## III. 食品健康影響評価結果

「MAM 株を利用して生産された  $\alpha$ -アミラーゼ」については、「遺伝子組換え微生物

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. Schematic visualization of vector pGGB21MAM1 and integration of the amyM gene (社内文書)
2. Anne Sietske de Boer and Berge Diderichsen, On the safety of Bacillus subtilis and B. amyloliquefaciens: a review, Applied Microbiology Biotechnology 36, 1-4, 1991
3. Bacillus Subtilis Product Sheet, American Type Culture Collection
4. Restriction map and sequence of amyM (社内文書)
5. Nucleotide sequence and restriction map of pGGB21MAM1 (社内資料)
6. Genomic sequencing of recipient DS18174 and GMM MAM strain (社内文書)
7. Analysis of sequence elements introduced within B. subtilis strain MAM (社内文書)
8. Statement on Food Enzymes Compliance (社内文書)
9. Proof of absence of recombinant DNA in the food enzyme (社内文書)
10. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)
11. Certificate of Analysis, Bakezyme MAM (社内文書)
12. JSFA Certificate of Analysis, Bakezyme MAM (社内文書)