

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAN009 株を利用して生産された
グルコアミラーゼ

令和3年（2021年）10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	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	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	14

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	15
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. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	17

<審議の経緯>

- 2021年3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0318第5号）、関係書類の接受
- 2021年3月23日 第809回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年5月26日 第211回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年8月25日 第214回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年10月26日 第837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>

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

「JPAN009 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、*Trametes cingulata* TC42432 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN009 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 α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して β -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、「JPAN009 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

(申請内容)

名 称：JPAN009 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、*Trametes cingulata* TC42432 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子（以下「*amgTC*遺伝子」という。）を導入して作製した、JPAN009 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ（以下「*amgTC*」という。）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 α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して β -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、0.065 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日である（参照1）。

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、きょう雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能が欠失した株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

amgTC 遺伝子の供与体は、*T. cingulata* TC42432 株である。選抜マーカーである 5-アミノレブリン酸合成酵素 (*hemA*) 遺伝子、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 (*URA3*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. niger* BO-1 株、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amgTC 遺伝子は、*amgTC* をコードする。*hemA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子は、それぞれ 5-アミノレブリン酸合成酵素、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をコードし、選抜マーカーに用いた。

amgTC 遺伝子、*hemA* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pJPV029 並びに *amgTC* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pJPV030 をプロトプラスト法により宿主ゲノム DNA 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。

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利用されている。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 B₂ 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 B₂ を産生し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：amgTC

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

amgTC は、JPAN009 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

amgTC 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

amgTC 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 α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -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

amgTC と従来のグルコアミラーゼの相違点は、基原、アミノ酸残基数、至適 pH 及び温度が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAN009 株と宿主との相違点は、JPAN009 株には *amgTC* 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、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を導入している点並びに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。

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）。

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 B₂ を産生する可能性が示唆されているが、*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2）。

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。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暴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4）。

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 pJPV029 及び pJPV030 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

(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。

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee

- (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
amgTC 遺伝子の供与体は *T. cingulata* TC42432 株である。*hemA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. niger* BO-1 株、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である
- (2) 安全性に関する事項
T. cingulata は、食経験は認められていないが、バイオ燃料生産の応用として研究されている糸状菌であり、ヒトに対しての病原性は認められていない。
A. niger BO-1 株は第2. に記載のとおりである。
A. nidulans は、食経験は知られていないが、*amdS* 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。
S. cerevisiae は、パン酵母などの食品製造に長く安全に使用されている。
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3)。

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
amgTC 遺伝子、*hemA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子は、それぞれのゲノム 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *amgTC* 遺伝子

amgTC 遺伝子がコードする *amgTC* は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -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

T. cingulata 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

amgTC 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、*T. cingulata* 由来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^b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

amgTC 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 20 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 5）。

(b) 人工腸液に対する感受性

amgTC 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、両試験において、試験開始後 6 時間においても分解されないことが示された（参照 5）。

(c) 加熱処理に対する感受性

amgTC の加熱処理に対する感受性について確認した結果、75°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

amgTC 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^c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、Asp n 14、Sch c 1 が検出された。また、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして Sch c 1 が検出された。

Asp n 14 は、*A.niger* 由来の β -キシロダーゼであり、これは食物アレルギー

^b PubMed、検索日：2021 年 6 月

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(FARRPversion21)

ンとしては登録されておらず、呼吸器感作性のアレルゲンである。

Sch c 1 は *Schizophyllum commune* 由来のグルコアミラーゼであり、*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 c 1) が同定されている。amgTC との構造相同性は 69.9% と高く、8 アミノ酸配列が一致する箇所が複数認められた。しかしながら、amgTC は人工胃液処理に対して感受性があること、グルコース製造過程のカラム精製工程において amgTC は除去されること及び想定摂取量が低いことから、総合的に amgTC はアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

② *hemA* 遺伝子

hemA 遺伝子がコードする 5-アミノレブリン酸合成酵素は、本遺伝子が導入された菌株では 5-アミノレブリン酸が存在しない培養液中では生育できることから、選抜マーカーとして使用された。5-アミノレブリン酸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。

③ *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する酵素であり、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、選抜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。

④ *URA3* 遺伝子

URA3 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のアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、amgTC、5-アミノレブリン酸合成酵素、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

amgTC 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* 遺伝子のプロモーター配列に加えて、この *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。

hemA 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger*

BO-1 株由来の *hemA* 遺伝子のプロモーター配列、*A.nidulans* Glasgow 野生株由来の *amdS* プロモーター配列及び *S.cerevisiae* FL100 株由来の *URA3* 遺伝子のプロモーター配列である（参照 6、7）。

(2) ターミネーターに関する事項

amgTC 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。

hemA 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *hemA* 遺伝子のターミネーター配列、*A.nidulans* Glasgow 野生株由来の *amdS* ターミネーター配列及び *S.cerevisiae* FL100 株由来の *URA3* 遺伝子のターミネーター配列である（参照 6、7）。

(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

(1) 及び (2) の他に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は組み込まれていない。

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、*na2/tpi* プロモーター断片、*amgTC* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*hemA* 遺伝子断片（プロモーター及びターミネーター含む。）を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV029 を作製した。

プラスミド pUC19 に、*na2* プロモーター断片、*na2/tpi* プロモーター断片、*amgTC* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*amdS* 遺伝子断片（プロモーター及びターミネーター含む。）を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV030 を作製した。

なお、*URA3* 遺伝子（プロモーター及びターミネーター含む。）は、ベクター構築過程でマーカー遺伝子として使用され、そのまま遺伝子導入用ベクター pJPV029 及び pJPV030 に残存している。

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 pJPV029 及び pJPV030 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 6、7）。

(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 pJPV029 及び pJPV030 において、*amgTC* 遺伝子、*hemA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子以外の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、pJPV029で168個、pJPV030で174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^cを用いて相同性検索を行った結果、第4-2-(3)d.と同じ結果が得られた。

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^d(参照8)を用いてE-value<0.02を指標として検索を行った。その結果、7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。

したがって、遺伝子導入用ベクターpJPV029及びpJPV030には、アレルギー誘発性及び毒性をコードするORFが含まれる可能性は低いと考えられた。

(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pJPV029及びpJPV030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pJPV029及びpJPV030は、全長塩基配列を解析した結果、その配列は構築したとおりであることが確認され、精製されたものが用いられていることから、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

遺伝子導入用ベクターpJPV029を宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入後、*hemA*遺伝子による選抜を行った。続いて遺伝子導入用ベクターpJPV030を同様に宿主ゲノムへプロトプラスト法にて導入し、*amdS*遺伝子による選抜を行った後に、グルコアミラーゼ活性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pJPV0029及びpJPV030は、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有していない。

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

JPAN009株は、*amgTCI hemA*遺伝子発現カセット及び*amgTCI amdS*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

^d 検索日：2021年6月

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

宿主ゲノムへの *amgTC* 遺伝子の挿入を確認するために、シーケンス解析を行った結果、*amgTC / hemA* 遺伝子発現カセット及び *amgTC / amdS* 遺伝子発現カセットはそれぞれ別の染色体の 1 箇所に挿入されたことを確認した。さらに定量 PCR 解析の結果、*amgTC* 遺伝子が複数コピー挿入されたことが確認された。(参照 9)。

(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 の有無を確認するために、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。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 135 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^oを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは認められなかった(参照 10~13)。

また、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、1 個の ORF に対して 3 種類(いずれも同一の連続した 8 アミノ酸配列)が認められた(参照 13)。これらはウシ、タイセイヨウサケ及びバラマンディ由来 I 型コラーゲンの基本骨格であるプロ α1 及び 2 鎖のタンパク質であり、ウシ由来タンパク質はワクチン接種をばく露経路とするアレルゲンとして、タイセイヨウサケ及びバラマンディ由来タンパク質は魚アレルギー患者血清での反応が確認され、食物アレルゲンとして登録されている。当該 ORF は 80 アミノ酸残基で 35%以上の条件ではいずれの 3 種類のタンパク質とも相同性を示していない。また、この 8 アミノ酸配列に一致するアレルゲンエピトープは認められていないことから、仮にこの ORF が転写・翻訳されたとしてもアレルギー性を有する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^d(参照 8)を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った結果、相同性を示す ORF は認められなかった。

したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられた。

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

amgTC 製品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

amgTC 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

amgTC 製品は、フランス、米国で添加物として使用が認められている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットプロット分析により、amgTC 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 14）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

amgTC 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 15）。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

amgTC 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。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

amgTC 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、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は得られている。

III. 食品健康影響評価結果

「JPAN009 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. 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. 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.
5. Digestibility and Purity of amgTC protein in a product formulation (社内文書)
6. 遺伝子導入ベクターpJPV029のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
7. 遺伝子導入ベクターpJPV030のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
8. 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
9. Copy number determination of the amgTC gene in the GM production strain NZYM-BR (社内文書)
10. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking region of the pJPV029 insertion on the genome of JPAN009 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
11. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking region of the pJPV029 insertion on the genome of JPAN009 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
12. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking region of the pJPV030 insertion on the genome of JPAN009 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
13. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking region of the pJPV030 insertion on the genome of JPAN009 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
14. The analysis of residual DNA in an amgTC product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)
15. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from JPAN009 (社内文書)