

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

LFS 株を利用して生産された
リパーゼ

2021年8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.....	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 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.....	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.....	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.....	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.....	10
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.....	11
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.....	12

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	12
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	13
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	13
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	13
<参照>	14

<審議の経緯>

- 2020年7月15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0713第1号）、関係書類の接受
- 2020年7月28日 第785回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2020年9月30日 第203回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年6月21日 第212回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年8月24日 第829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

「LFS 株を利用して生産されたリパーゼ」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* ISO-528 株を宿主として、*Fusarium* 属株由来のトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子を導入して作製した LFS 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、脂肪を加水分解する酵素であり、製パン等生地の品質改善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及び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、「LFS 株を利用して生産されたリパーゼ」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：LFS 株を利用して生産されたリパーゼ

用途：製パン等生地の品質改善

申請者：DSM 株式会社

開発者：DSM (オランダ)

本添加物は、*Aspergillus niger* ISO-528 株を宿主として、*Fusarium* 属菌由来のトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子を導入して作製した LFS 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、脂肪を加水分解する酵素であり、製パン等生地の品質改善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：リパーゼ

基原：糸状菌 (*Aspergillus niger*)

有効成分：トリアシルグリセロールリパーゼ

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

CAS No. : 9001-62-1

(2) 製造方法

リパーゼは、糸状菌の培養液から抽出し、除菌、精製工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

リパーゼは、脂肪を加水分解する酵素であり、リパーゼのうち、トリアシルグリセロールリパーゼは、トリグリセリドを加水分解して脂肪酸、モノ及びジグリセリドを生成する。ミックスフレーバー等の製造、酒造米の改質、油脂・エステル類の分解及び合成、油脂の改質等に用いられ、海外では、*Fusarium* 属菌由来のリパーゼが製パン用途等で使用されている (参照 1)。

(4) 摂取量

リパーゼが小麦・加工品のうちパン類 (菓子パンを除く)、菓子パン類、その他の小麦加工品並びに菓子類のうちケーキ・ペストリー類、ビスケット類及びその他の菓子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の最大一日摂取量は、0.059 mg TOS (Total Organic Solids)/ 人/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* ISO-528 株である。*A. niger* ISO-528 株は、*A. niger* 野生株 NRRL3122 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

トリアシルグリセロールリパーゼ (*lfs*) 遺伝子の供与体は、*Fusarium culmorum* を含む9種類の *Fusarium* 属菌である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

lfs 遺伝子は、9 種類の *Fusarium* 属菌由来のトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子の配列情報を基に合成され、トリアシルグリセロールリパーゼをコードする。また、N 末端及び C 末端のそれぞれ一部領域が切断され、成熟型となる。

グルコアミラーゼ (*glaA*) 遺伝子のプロモーター、*lfs* 遺伝子及び *glaA* 遺伝子のターミネーターを含む *glaA* 遺伝子の下流配列から構成される *lfs* 遺伝子発現カセットを、プロトプラスト-PEG 法により宿主ゲノムの標的部位に導入した。

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. 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。*A. niger* ISO-528 系列株は、食品安全委員会において評価済みである酵素アスパラギナーゼの生産菌として利用されている。

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、フモニシン及びシユウ酸を産生することが知られている。*A. niger* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程において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 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：Panamore Golden

有効成分：トリアシルグリセロールリパーゼ

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

CAS No. : 9001-62-1

(2) 製造方法

Panamore Golden は、LFS 株を生産菌として、従来のトリアシルグリセロ

ールリパーゼと同様に、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、不活化され、除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

Panamore Golden は、顆粒製剤として、製パン及び製菓の工程において小麦粉に含まれる脂肪を加水分解して親水性の脂質を生成させ、生地 の物性を改善させる目的で使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Panamore Golden の有効成分は、従来のトリアシルグリセロールリパーゼと同様に、トリグリセリドのエステル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

Panamore Golden と従来のトリアシルグリセロールリパーゼとの相違点は、アミノ酸残基数、基原、至適 pH 及び温度が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

LFS 株と宿主との相違点は、LFS 株には *lfs* 遺伝子が複数コピー導入されトリアシルグリセロールリパーゼ産生性を獲得している点である。

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、第2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* ISO-528 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、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL 1 に相当する（参照 2）。

A. niger はオクラトキシン A 及びフモニシン合成遺伝子を有する（参照 3）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger に、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、ヒト及び動物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. niger の近縁種には、オクラトキシン A 産性能を有する *A. carbonarius* や *A. citricus* 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

導入用プラスミド pGBTOPLFS-7 の作製には *E. coli* 由来のプラスミド pTZ19R 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 pTZ19R 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 pTZ19R 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 pTZ19R 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 pTZ19R 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 pTZ19R 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 pTZ19R の複製開始配列は、*E. coli* のみにおいて機能する。

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

lfs 遺伝子の供与体は、*F. culmorum* を含む 9 種類の *Fusarium* 属菌である。

(2) 安全性に関する事項

Fusarium 属菌は、米国でリパーゼの基原として安全に使用されている。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 2）。

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若しくは合成方法に関する事項

lfs 遺伝子は、9 種類の *Fusarium* 属菌に由来するトリアシルグリセロールリパーゼ遺伝子の配列を基に合成された。

(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

lfs 遺伝子の塩基数、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

lfs 遺伝子がコードするトリアシルグリセロールリパーゼは、N 末端及び C 末端のそれぞれ一部領域が切断され、成熟型となる。

① 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

WHO/IUIS のアレルゲンデータベースに、*Fusarium* 属由来の 4 種類のタンパク質が登録されているが、いずれもトリアシルグリセロールリパーゼとの関連性はない。

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

a. 人工胃液に対する感受性

Panamore Golden の人工胃液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析を行った。その結果、試験開始後 30 秒以内に完全長のバンドは消失し、分解物と考えられるバンドも試験開始後 15 分以内に消失した（参照 5、6）。

b. 人工腸液に対する感受性

Panamore Golden の人工腸液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析を行った。その結果、試験開始後 60 分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

Panamore Golden の加熱処理に対する感受性について確認するため、相対活性を測定した。その結果、50℃・5 分で失活することが示された。

③ 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

Panamore Golden 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、アレルゲンデータベース^a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は検出されなかった（参照 7）。

^a AllergenOnLine（検索日：2020 年 12 月）

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

lfs 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* 由来の *glaA* 遺伝子のプロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

lfs 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* 由来の *glaA* 遺伝子のターミネーター配列である。

(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

該当する塩基配列はない。

4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項

プラスミド pTZ19R に、*lfs* 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 pGBTOP_{LFS}-7 を作製した（参照 4）。

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 pGBTOP_{LFS}-7 より、制限酵素処理を行い、*lfs* 遺伝子発現カセットを分離し、単離された DNA 断片を形質転換に用いた。挿入 DNA 断片の塩基数、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）。

(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

遺伝子導入用ベクター pGBTOP_{LFS}-7 上の意図する挿入領域は、*lfs* 遺伝子発現カセット領域である。

(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

挿入 DNA 断片は、電気泳動による単離・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 ISO-528 株の親株に複数箇所存在する *glaA* 遺伝子座を、プロモーター領域及びコード配列を欠失させた Δ *glaA* 座位を制限酵素認識配列で標識したプラ

グ部位とし、さらに、複数の遺伝子の欠失等を行い宿主 ISO-528 株を得た（参照 8）。制限酵素認識配列で標識した宿主のプラグ部位に、*lfs* 遺伝子発現カセット及び *amdS* 遺伝子発現カセットを相同組換えにて導入し、選択培地で *amdS* 遺伝子を脱落させた後、*lfs* 遺伝子発現カセットが多重化した LFS 株を得た。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

挿入 DNA 断片には、抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれておらず LFS 株には挿入されない。

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

LFS 株は、*lfs* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入され、トリアシルグリセロールリパーゼ高生産能を有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

lfs 遺伝子発現カセットの宿主ゲノムへの導入を確認するために PCR 法及びサザンブロット分析を行った結果、標的遺伝子座に複数コピー導入されていることが確認された。また、*amdS* 遺伝子発現カセット及び遺伝子導入用ベクター pGBTOP/LFS-7 の *lfs* 遺伝子発現カセット以外の領域は生産菌に残存していないことが確認された。なお、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素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、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いて 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 32 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^b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、2 種類の環境アレルゲン及びパンコムギ由来のアレルゲンが検出された。パンコムギ由来のアレルゲンは食物アレルゲンとして登録されており、当該タンパク質と相同性がみられた ORF は、*lfs* 遺伝子とは逆向きであり、開始コドンを持たず、翻訳される可能性は低い。また、パンコムギ由来のアレルゲンとのアライメントには顕著なギャップが認められ構造的類似性も低かった。なお、連続す

^b AllergenOnLine (ver.20)

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、NCBI データベースを用いて 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検出されなかった（参照 9）。

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

Panamore Golden の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

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

Panamore Golden の製造原料及び製造器材は、上記のとおり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。

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

Panamore Golden は、アメリカ、オーストラリア、ニュージーランド、カナダ、デンマーク等の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

PCR 法により、Panamore Golden の酵素原体には組換え DNA は残存しないことが確認された（参照 10）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Panamore Golden の製剤前の酵素サンプルを用い、JECFA の食品用酵素及び食品衛生法の規格基準を満たしていることを定期的に確認している（参照 11、12、13）。また、オクラトキシン A 及びフモニシンが含まれていないことを確認している（参照 11、14）。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ており、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

Panamore Golden 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て製造されるものであり、生産菌の残存していないことや固形物を取り除かれることから、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ことは考えにくい。

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

Panamore Golden の製造原料及び製造方法は従来 of 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は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「LFS 株を利用して生産されたリパーゼ」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. Lien R. Gerits, Bram Pareyt, Jan A. Delcour, A lipase based approach for studying the role of wheat lipids in bread making, Food Chemistry, 2014
2. 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」国立感染症研究所, 平成22年6月
3. Jens C. Frisvad, Lars L. H. Møller, Thomas O. Larsen, Ravi Kumar and José Arnau, 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
4. pGBTOPLFS-7 map, sequence and annotation (社内文書)
5. In vitro digestibility of Panamore Golden (LFS) (社内文書)
6. Digestibility of Panamore - FUR crude granulate under simulated gastric conditions (社内資料)
7. Bioinformatics testing for putative allergenicity of triacylglycerol lipase of *A. niger* (社内文書)
8. van Dijck PW, Selten GC, Hempenius RA, On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains: Regulatory Toxicology and Pharmacology Vol.38, 27-35, 2003.
9. Analysis of sequence elements introduced within *A. niger* strain LFS (社内文書)
10. Proof of absence of rDNA in the food enzyme triacylglycerol lipase from a genetically modified strain of *Aspergillus niger* LFS (社内文書)
11. Certificate of Analysis (社内文書)
12. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)
13. CERTIFICATE OF ANALYSIS_Panamore Golden (社内資料)
14. Method of analysis for mycotoxins (社内資料)