

遺伝子組換え食品等評価書

CF307 株を利用して生産された
キシラナーゼ

2020年9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.....	5
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.....	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.....	11
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	11
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.....	12

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.....	13
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	13
2. 組換え体の残存に関する事項.....	13
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項.....	13
4. 精製方法及びその効果に関する事項.....	13
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>

2019年11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1128第1号）、関係書類の接受

2019年12月3日 第766回食品安全委員会（要請事項説明）

2019年12月20日 第196回遺伝子組換え食品等専門調査会

2020年6月19日 第200回遺伝子組換え食品等専門調査会

2020年9月1日 第788回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

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

<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

「CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ」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、*Bacillus subtilis* BG125株を宿主として、*Bacillus subtilis* 168株由来の改変キシラナーゼ遺伝子を導入して作製したCF307株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、パン生地の品質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、「CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ」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

名 称：CF307 株を利用して生産されたキシラナーゼ
用 途：パン製造における生地品質向上
申請者：ダニスコジャパン株式会社
開発者：Danisco US, Inc. (米国)

本添加物は、*Bacillus subtilis* BG125 株を宿主として、*Bacillus subtilis* 168 株由来の改変キシラナーゼ遺伝子を導入して作製した CF307 株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、キシランの 1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、パン生地の品質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：キシラナーゼ

基 原：*Aspergillus niger*、*Trichoderma reesei*

有効成分：キシラナーゼ

IUB No.：EC 3.2.1.8

CAS No.：9025-57-4

(2) 製造方法

キシラナーゼは、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

キシラナーゼは、パンの製造工程において、原料となる小麦粉中のキシランを加水分解し可溶性糖類を生成することで、生地の弾力を向上させることを目的として使用される。

(4) 摂取量

キシラナーゼが菓子パンを除くパン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、0.005 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* BG125 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変キシラナーゼ (*BS3.2-xylanase*) 遺伝子の供与体は、*B. subtilis* 168 株である。クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (*catH*) 遺伝子の供与体は、*Staphylococcus aureus* 由来の pC194 である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

BS3.2-xylanase 遺伝子は、BS3.2 キシラナーゼをコードする。パンの製造において小麦粉に含まれるキシラナーゼ阻害物質による抑制作用を受けにくくするため、*B. subtilis* 168 株の野生型キシラナーゼ遺伝子がコードするキシラナーゼのアミノ酸残基のうち 2 アミノ酸を置換する様に改変が行われている (参照 1)。宿主ゲノムの標的遺伝子座へ、コンピテントセルを用いた形質転換により *BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセット及び *catH* 遺伝子発現カセットを含む BS3-*catH* DNA 断片を導入した。なお、*catH* 遺伝子は形質転換の選抜マーカー遺伝子として用いた。

また、BS3.2 キシラナーゼの生産性を高めるため、内在性の *amyE* 遺伝子を含む複数遺伝子を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

B. subtilis は、長期にわたり食品用酵素の生産菌として安全に使用されている。*B. subtilis* の一種である納豆菌 (*B. subtilis* var. *natto*) は、長年の食経験を有する。

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、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 : 未定 (便宜上「BS3.2 キシラナーゼ」という。)

有効成分 : キシラナーゼ

IUB No. : EC 3.2.1.8

CAS No. : 9025-57-4

(2) 製造方法

BS3.2 キシラナーゼは、CF307 株を生産菌として、従来のキシラナーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

BS3.2 キシラナーゼは、顆粒製剤としてパン材料に添加し、パンの品質向上を目的として使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

BS3.2 キシラナーゼは、従来のキシラナーゼと同様に、キシランの 1,4-β-D キシロイド結合を特異的に切断する酵素である。従来のキシラナーゼと比較して、小麦粉に含まれるキシラナーゼ阻害物質の影響を受けにくい。

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

BS3.2 キシラナーゼと従来の添加物である *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei* 由来のキシラナーゼとの相違点は、アミノ酸置換により小麦粉に含まれるキシラナーゼ阻害物質の影響を受けにくい点である（参照 3）。

(2) 組換え体と宿主

CF307 株と宿主との相違点は、CF307 株は *BS3.2-xylanase* 遺伝子が複数コピー導入され BS3.2 キシラナーゼ生産能を獲得している点及び CF307 株が *amyE* 遺伝子を含む複数遺伝子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* BG125 株である。これは *B. subtilis* 168 株の突然変異株である。

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 が病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当する（参照 2）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis 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

B. subtilis 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

B. subtilis は、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

導入に用いた BS3-catH DNA 断片は、BS3-catH DNA サークル（環状 DNA）を線状 DNA としたものである。BS3-catH DNA サークルのうち、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセットには、プラスミド pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 が用いられ、*catH* 遺伝子発現カセットには、*S. aureus* 由来の pC194 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

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている（参照 4）。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 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

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 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（参照 4）。

(4) 薬剤耐性に関する事項

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 には、クロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 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

pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 及び pC194 の複製開始配列は、それぞれ *E. coli* 及び *B. subtilis* 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

BS3.2-xylanase 遺伝子の供与体は、*B. subtilis* 168 株である。*catH* 遺伝子

の供与体は、*S. aureus* 由来の pC194 である。

(2) 安全性に関する事項

B. subtilis は、アミラーゼ等食品添加物の生産菌として用いられている。第 2-2 に記載の通りである（参照 2）。

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若しくは合成方法に関する事項

BS3.2-xylanase 遺伝子は、*B. subtilis* 168 株由来の野生型キシラナーゼ遺伝子の塩基配列に基づき、アミノ酸残基のうち 2 アミノ酸を置換導入したものを PCR により作製した。また、野生型キシラナーゼの分泌シグナルペプチド配列が付加されている。

catH 遺伝子は、pC194 から制限酵素処理して得られた。

(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

BS3.2-xylanase 遺伝子発現カセット及び *catH* 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

BS3.2-xylanase 遺伝子がコードする BS3.2 キシラナーゼは、キシランの 1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素である。

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

B. subtilis のアレルギー誘発性の可能性を調べるためデータベース^aを用いて検索した結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

② 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

BS3.2 キシラナーゼ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かった。

③ 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

BS3.2 キシラナーゼ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 分析では、完全長のバンドは徐々に薄くなり試験開始後 60 分でほぼ消失した。ウェスタンブロット分析においても、完全長のバンドは試験開始

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature (<http://www.Allergen.org/index.php>) 検索日：2018 年 4 月 9 日

後 60 分で大幅に減衰した。

b. 人工腸液に対する感受性

BS3.2 キシラナーゼの人工腸液中での消化性について確認するため、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、いずれの分析においても試験開始後 6 時間においても分解されないことが示された。

c. 加熱処理に対する感受性

BS3.2 キシラナーゼは、パン生地添加到されることから、焼成条件を想定した 100°C での免疫反応性を ELISA 法を用いて確認した。その結果、2.5 分の加熱で免疫反応性が消失することが示された。

④ 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

第 5 - 2 - (2) に記載のとおりである。

以上のことから総合的に判断し、BS3.2 キシラナーゼ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

BS3.2-xylanase 遺伝子のプロモーターは、*B. subtilis* 168 株由来の *aprE* 遺伝子のプロモーター配列である。

catH 遺伝子のプロモーターは、pC194 由来の *catH* 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

BS3.2-xylanase 遺伝子のターミネーターは、*B. amyloliquefaciens* 由来の *apr* 遺伝子のターミネーター配列である。

catH 遺伝子のターミネーターは、pC194 由来の *catH* 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

BS3.2-xylanase 遺伝子に *B. subtilis* 168 株野生型キシラナーゼ遺伝子 (*xynA*) の分泌シグナルペプチド配列を付加した。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

ベクター pJHPaprE-xynAss-BS3xylanase#1 から制限酵素処理により切り出した 3.2-xylanase 遺伝子発現カセット DNA 断片と、ベクター pUC219 から同様

に切り出した *catH* 遺伝子発現カセット DNA 断片を結合させて BS3-*catH* DNA サークルを得た。

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

BS3-*catH* DNA サークルの塩基数、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。

(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

BS3-*catH* DNA サークル全体が、宿主ゲノムに挿入される。

(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

BS3-*catH* DNA サークルの構築には、精製キットを用いて調製した DNA 断片を用いた。なお、BS3-*catH* DNA サークルを増幅する際に大腸菌由来の DNA 断片が生産菌ゲノムに導入されている。

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、*amyE* 遺伝子を含む複数遺伝子を欠失させている。BS3-*catH* DNA サークルを線状 DNA として増幅した後、*B. subtilis* コンピテントセルに組み込み、そのゲノムを用いて宿主に導入し、クロラムフェニコール含有培地で選抜を行い、CF307 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

ゲノムに導入された BS3-*catH* DNA 断片は、*catH* 遺伝子を含む。*catH* 遺伝子は、*S. aureus* 由来の pC194 由来であり、安全性に問題はない。

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

CF307 株は、BS3.2-*xylanase* 遺伝子発現カセット及び *catH* 遺伝子発現カセットが導入され、BS3.2 キシラナーゼ産生能及びクロラムフェニコール耐性を付与されている点並びに BS3.2-キシラナーゼの生産性を高めるために複数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

全ゲノム解析により、*BS3.2-xylanase* 遺伝子発現カセット及び *catH* 遺伝子発現カセットが複数コピー挿入されていることが推定された。また、環状 DNA を線状 DNA として増幅する際に混入したと考えられる大腸菌由来の DNA は、毒性タンパク質及びアレルゲンをコードする配列ではないと推察された。なお、CF307 株に導入された BS3-catH DNA 断片の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までで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 32 個検出された（参照 5）。

これらの ORF に対して既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、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 アミノ酸配列以上で 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、データベース^cを用いて E-value < 10.0 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 5）。

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

BS3.2 キシラナーゼ製剤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

BS3.2 キシラナーゼ製剤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し、また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

^b AllergenOnline v18B

^c UniProtKB (UniProt release 2018_07)

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

BS3.2 キシラナーゼ製剤は、米国、デンマーク、フランス、オーストラリア及びニュージーランドにおいて2009年までに承認されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

PCR法により確認した結果、BS3.2 キシラナーゼ製剤からは生産菌に由来するDNA断片は検出されなかった（参照6）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

BS3.2 キシラナーゼを有効成分とする酵素製剤は、JECFAの食品用酵素の規格を満たしている（参照7）。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、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

BS3.2 キシラナーゼ製剤は、生産菌の培養液を除菌ろ過、限外ろ過等の工程を経て製造されるものであり、安全性に問題のある物質が混入するとは考えにくい。

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

BS3.2 キシラナーゼ製剤の製造原料及び製造器材は、従来の食品用酵素の製造に使用されているものであり、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

「CF307株を利用して生産されたキシラナーゼ」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. *****d
2. 国立感染症研究所,“(A)国立感染症研究所 病原体等安全管理規程 平成 22 年,(B) 国立感染症研究所 病原体等安全管理規定 別冊 1「病原体等の BSL 分類等”.
3. ドゥビセル, ウィノク, “キシラン分解酵素の阻害剤”. 日本 特許番号: 特表 2001-523104 号, 2012.
4. ダニスコジャパン, “ベクターの DNA 配列,” (社内文書).
5. DuPont Industrial Biosciences, “ORF 解析報告書,” 2018 (社内文書) .
6. DuPont Industrial Biosciences, ***, (社内文書)
7. DuPont Industrial Biosciences, ***, (社内文書)

^d 参照した論文を明らかにすることにより、本申請品の内容が推測されることで、企業の知的財産等が開示され特定の者に不当な利益若しくは不利益をもたらすおそれがあるため、伏せ字とした。