

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第247回) 議事録

1. 日時 令和6年3月27日(水) 10:56~12:10

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)
(Web会議システムを併用)

3. 議事

(1) 遺伝子組換え食品等に係る食品健康影響評価について

・ *Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産されたフィターゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

児玉座長、伊藤専門委員、岡田専門委員、小野道之専門委員、小野竜一専門委員、
佐々木専門委員、柴田専門委員、手島専門委員、樋口専門委員、藤原専門委員

(食品安全委員会)

川西委員、脇委員

(事務局)

中事務局長、及川事務局次長、前間評価第二課長、今井評価情報分析官、
奥藤課長補佐、山口係長、今村技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

① *Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産されたフィターゼ

6. 議事内容

〇〇〇 皆様、少し時間は早いですけれども、始めたいと思います。それでは、ただいまから第247回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催したいと思います。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づいて、非公開で行います。

また、本日は、Web会議システムを併用して行います。

本日の議題は、新規品目である「*Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産された

フィターゼ」の安全性についての審議です。

それでは、事務局から資料の確認をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、配付資料を確認いたします。

配付資料は、議事次第、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料、机上配付資料が1-1、1-2、2となっております。

資料の不足等はありませんでしょうか。不足等がございましたら、事務局まで御連絡ください。

また、本日は、「*Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産されたフィターゼ」の申請者でございます一般社団法人日本科学飼料協会の方をお呼びしております。申請品目の審議の際に質疑応答に対応していただく予定としております。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づき、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について報告をお願いします。

〇〇〇 事務局において、専門委員の皆様にご提出いただきました確認書を確認したところ、平成15年10月2日付け委員会決定の2の(1)に規定する調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいませんでした。

〇〇〇 本日は、Webで会議に参加される専門委員もいらっしゃいますので、審議に入る前に、Web会議における注意事項について事務局から説明をお願いします。

〇〇〇 Web会議形式の注意事項をお伝えいたします。

1点目、発言者の音質向上のため、発言しないときはマイクをオフにしてください。

2点目、発言の際は、赤い挙手カードを提示していただくか、Web会議画面の挙手ボタンを押してください。座長よりお呼びしますので、マイクをオンにして名前を発言いただいた上で、御発言をお願いいたします。座長より指名がない場合は、直接マイクから呼びかけてください。発言の最後には「以上です」と御発言いただき、マイクをオフにしてください。

3点目、音声接続不良時や通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにしたり、再入室することにより改善する場合があります。マイクが使えない場合は、Web会議システムのメッセージ機能によりお知らせください。万が一全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話ください。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますが、青い同意カードを挙げていただくか、手で丸をつくるなど、意思表示をお願いします。

以上がWeb会議における注意事項となります。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 それでは、新規品目である「*Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産されたフィターゼ」について審議を行いたいと思います。

事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

まず、「*Trichoderma reesei* RF8694株を利用して生産されたフィターゼ」と記載されました黄色の紙ファイルを御用意ください。

今回の申請品目は飼料添加物でございます。豚、鶏、ウズラ、養殖水産動物の飼料に使用されるものでございます。こちらの養殖水産動物の飼料に使用されるということで、今までの飼料及び飼料添加物の考え方と変わっているところがございますので、まずこの飼料及び飼料添加物の安全性の評価の考え方について、おさらいも含めて御説明をしたいと思います。

机上配付資料1をお手元に御準備ください。

こちらに、平成16年5月6日付で食品安全委員会決定となっております「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」というものがございます。飼料とか飼料添加物の申請が来た際には、この考え方に基づいて安全性の評価を行っております。

こちらは、1ページ目の3のところでございますけれども、安全性評価の方法といたしまして、基本的にはタンパク質が畜産物の乳とか肉とか卵に移行しないということが前提で移行して、何か有害なものをつくったり、有害なものが蓄積されたりしないということを確認していきましょうという考え方になっております。

令和5年当時、それもフィターゼだったのですけれども、申請が来た際に、申請要旨の中に初めて養殖水産動物に使用しますという記載がされたものの提出がございました。その際に、当時の専門調査会の専門委員でございました〇〇〇から、この平成16年の飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方は、畜産物への移行等といったことを考えたものであって、水産動物への移行とか蓄積というのがこの考え方の中にはちゃんと反映されていないのではないかという御指摘をいただきました。

そこで、令和5年の5月22日に開催いたしました第236回の当専門調査会におきまして、資料の3ページ目に記載してございますが、〇〇〇という魚の専門家の先生に御参加いただきまして、魚における消化吸収のメカニズムとか、そういったところについていろいろと教えていただきました。その際に使用された資料が机上配付資料1-2になります。

それをまとめたものを机上配付資料1-1の3ページに書いてございますけれども、まず通常の魚、大きなブリとかスズキとかそういう養殖をよくされる大きな魚につきましては、有胃魚と言われるものでございまして、胃がきちんとあるものでございます。この有胃魚のタンパク質の消化吸収の方法といたしましては、消化器官の形態等は多少異なっていますが、消化吸収の大筋はほかの脊椎動物と類似しているということで、畜産物と同様に考えていいのではないかということでございます。

もう一つ魚の種類としてございますのが無胃魚、胃がないような魚であったり、仔魚、稚魚とも言いますけれども、まだ成長途中で消化管が未発達な魚、こういったものがございまして、こういったもののタンパク質の消化吸収の方法といたしましては、消化管内で消化吸収が未発達なうちは飲作用によりタンパク質の取り込みと消化を行うということで、

摂取されたタンパク質は細胞内消化により低分子化されまして、血流へ吸収されていくということで、細胞がタンパク質を取り込んで、そのままの中で消化されて吸収されていくということです。タンパク質が魚の筋肉の細胞に移行して、その魚を食べることでアレルゲンとかといったところの懸念が出てくるのではないかというような懸念がございました。

ただ、3つ目の矢印に書いてございますが、〇〇〇のお話では、細胞間隙輸送や経細胞輸送による抗原タンパク質の移行については、哺乳類でも知られているようなものでございまして、特段魚類に特有のものであるということまでは言えないのではないかということでした。

この資料の4ページに当時の議事録の抜粋も記載しておりますが、専門委員の先生方で議論をいただいた結果、3ページの【対応】のところに書いてございます。養殖水産動物に使用する遺伝子組換え飼料及び飼料添加物につきましては、この「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」の3の(1)の考え方に加えて、ゲノムに挿入される遺伝子発現カセットのオープンリーディングフレーム及び導入後の接続領域のオープンリーディングフレームの既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との構造相同性について確認をしましょうということになってございます。

ですので、今回の申請資料でもオープンリーディングフレームの確認であるとか、そういったところが少し丁寧に説明されておりますし、評価書の中にもその部分を確認したということで記載がされているものでございます。

前置きが長くなって申し訳ありません。それでは、今回の申請資料の説明に入りたいと思います。

お手元に黄色の紙ファイルを御用意いただきまして、3枚めくっていただいて1ページ目を御覧ください。

従来の添加物に関する事項でございます。第1の1(1)名称はフィターゼでございます。有効成分は6フィターゼでフィチン酸のイノシトール環の第6位にあるリン酸エステル結合を最初に加水分解するものでございます。

(2) 製造方法は、表1に宿主と挿入されたフィターゼ遺伝子ごとにまとめられておりますが、生産菌株の培養液から抽出、除菌、精製などの工程を経て製造されるものでございます。

3ページ目を御覧ください。

(3) 用途及び使用形態は、植物飼料原料に含まれるフィチン態の単胃動物における利用性を改善する目的で飼料に添加されるものでございます。豚、鶏、ウズラ、養殖水産動物の飼料に使用され、使用量、摂取量は記載のとおりとなっております。

17行目の2 宿主及び導入DNAでございます。

(1) 宿主は *Trichoderma reesei* RF8694株で、この菌株は分子生物学分野で遺伝子組換え菌株の宿主として広く利用されている野生型QM6a株から、紫外線やニトロソグアニジ

ンによる処理で誘導したセルラーゼ高生産変異株を基に自然突然変異により得られたウリジン要求性株となっております。

(2) 供与体については、4ページの表3にまとめられてございます。

まず、表3の一番上の*cbh1*遺伝子プロモーターですが、性質・機能に修正が入っておりますので、机上配付資料2をお手元に御準備いただきまして、1枚めくっていただくと4ページと書かれたページがございますので、そちらを御覧ください。

黄色マーカーのとおり、培地にメタノールを使用するということはないと申請者から回答を得てございます。

表3の上から4つ目が目的のフィターゼを発現する*qpt2*遺伝子でございます。*E.coli* B株由来の*appA*遺伝子を基に設計、合成したものでございます。

今回の申請品目である、このフィターゼをQPT2フィターゼと呼んでおります。また、表3の下から2つ目の*amdS*遺伝子を選択マーカーとして使用しており、この供与体が*A.nidulans* VH1-TRSX6株となっております。

黄色い紙ファイルに戻っていただきまして、6ページ目を御覧ください。

3行目の4 宿主の構成成分等でございます。宿主であるRF5307株は、国立感染症研究所の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2、3には含まれておらず、宿主であるRF5307株を誘導した野生型のQM6a株は、ATCCにおいてバイオセーフティレベル1、EPAでは発酵中に有害生理活性物質を産生せず、ヒト、家畜、野生動物に対する病原性もないと評価されているものでございます。

7ページを御覧ください。

5 遺伝子組換え添加物に関する事項です。

(1) 製品名はQuantum Blueで、液状製剤、粉末製剤、顆粒状の製剤がございます。有効成分は6-フィターゼです。

(2) 製造方法は図1のとおりで、生産菌株の培養液を菌体分離、ろ過、精製化、製剤化などの工程を経て製造されております。

(3) の用途及び使用形態は既存のフィターゼと同様です。

8ページを御覧ください。

4行目から、(4) 従来の添加物との比較です。反応特異性は既存の6-フィターゼと同様です。9ページの表5に比較表がまとめられてございますが、QPT2フィターゼでの至適温度は既存のフィターゼより高いことから、高温条件下で製造されるペレット飼料中で安定性が高いとされております。

続いて、8ページの16行目、6(1) 組換え添加物と従来の添加物の相違点でございます。国内で既に飼料添加物として指定されている*E.coli* B株由来のフィターゼ遺伝子を挿入しているAppAフィターゼとAppA2フィターゼを比較対象として記載しております。

20行目からの記載ですが、今回のQPT2フィターゼはAppAに由来していますが、熱安定性を高めるために21行目から22行目に記載されたアミノ酸置換を行っております。また、

第4の6でも説明いたしますが、今回のRF8694株には複数コピーのフィターゼ遺伝子が挿入されており、そのうち●●●に点突然変異が生じているため、先ほどのアミノ酸置換に加えて、25行目に記載されているアミノ酸置換が生じているものでございます。本申請資料では、点突然変異が生じるフィターゼのことをQPT2フィターゼ2と呼んでおります。

8ページが一番下からの記載ですが、相違点は至適pHと至適温度としてございます。

また、9ページの9行目からの記載になりますが、先ほど説明したとおり、今回のQPT2フィターゼでは2種類の分子の混合物になっておりますが、表5の一番下の行で示しておりますフィターゼ活性はこの混合物の活性を示すものであるとしてございます。

続きまして、11ページの3行目からの記載を御覧ください。

(2) 組換え体と宿主との相違点は、組換え体がQPT2フィターゼ生成能、アセトアミドを唯一の窒素源とする培地での増殖能といったものを獲得している点、あと、エンドグルカナーゼI・II、セロビオハイドラーゼI・II、ヒドロフォビンIIを欠失している点、ウリジン要求性を示さない点となっております。

続きまして、第2 宿主に関する事項です。

13ページを御覧ください。

一番上からの記載ですが、宿主の同属の中には免疫不全患者への日和見感染が知られるものやマイコトキシンを産生することが報告されているものがございますが、*T.reesei*にはこのような報告はございません。

8行目から第3 ベクターに関する事項です。

こちらにも記載に修正がございましたので、机上配付資料2の13ページを御覧ください。

第3の1、ベクターの構築にはプラスミドpUC19が使用されております。11行目から記載されている7つのベクターと15行目に記載している、pAB600-QPT2を用いて遺伝子組換えを行っております。

このままこの机上配付資料で説明をさせていただきます。机上配付資料2の18ページと書かれているページを御覧ください。

第4 挿入DNA等に関する事項です。

まず、挿入DNAの供与体に関する事項です。

27行目から(2) 安全性に関する事項です。QPT2フィターゼを発現する*qpt2*遺伝子は、病原性及び有害物質の産生がないとされている*E.coli* B株由来の*appA*遺伝子を基に設計合成しています。*S.cerevisiae*及び*A.nidulans*は、いずれも分子生物学の分野で広く利用されており、国立感染症研究所の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1に相当すると考えられるとしてございます。

19ページを御覧ください。

2の(1) 挿入遺伝子の合成方法等を御覧ください。*qpt2*遺伝子をコードするフラグメント等は人工合成により得られたもので、*amdS*遺伝子をコードするフラグメントは●●●を鋳型とするPCRにより得られたものでございます。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項ですが、21ページの5行目の④を御覧ください。

④ *qpt2* 遺伝子の記載でございます。*E. coli* B株由来のフィターゼ *appa* 遺伝子を基に17アミノ酸を置換したQPT2をコードしております。ORFfinderを用いて同領域上のORF検索を行ったところ、30アミノ酸以上のORFが27個同定されておりました。これらのORFについて、Non-redundant protein sequencesのversion 5でE-valueを1未満として、BLASTp検索を行った結果、幾つかのタンパク質と相同性が確認されましたが、有害性を示すタンパク質はヒットしなかったとしております。

また、bといたしまして、既知のアレルゲン等の相同性を確認するため、Allergenic Protein Sequence Searchesで検索した結果、既知のアレルゲンが複数ヒットしましたが、80アミノ酸で35%の相同性を持つ、または連続する8アミノ酸が一致するアレルゲンは確認されなかったとしてございます。

その他の遺伝子やプロモーター、ターミネーター等についても①から⑧で記載されてございます。

23ページに行っていただきまして、14行目の⑨を御覧ください。発現カセット全体のORF検索の記載でございます。①から⑧で記載された各ユニットの接続により、発現カセット上に意図しないORFが出現しているか否かを確認するために、発現カセット全体でgetorfプログラムを用いて終止コドンから終止コドンの間で30アミノ酸以上のORFを検索した結果、151個のORFが同定されたとしております。これらについて、CD-hitプログラムを用いていずれかのORFと100%の相同性のある重複したORFを排除した結果、同定されたORFが88個に絞り込まれております。

これらのORFについて、aで有害タンパク質との相同性を確認するため、NCBIを用いてE-valueを0.01未満として検索を行った結果、相同性は確認されませんでした。

また、bでAllergenOnlineを用いて既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、こちらも一致は見られませんでした。

27ページを御覧ください。

6 DNAの宿主への導入方法です。宿主であるRF5307株の●●●に欠失導入カセットを挿入し、形質転換を複数回行い、28ページの15行目から記載されておりますRF6033株を取得してございます。

24行目からの記載になりますけれども、このRF6033株から自然突然変異により選抜した低プロテアーゼ変異体であるRF7727株に25ページの図5-2に示した発現カセットを導入して形質転換することにより、今回のRF8694株を得ているというものでございます。このRF8694株には*amdS*遺伝子が導入されているため、アセトアミドを唯一の窒素源とした最小培地を用いて選抜をしております。

続きまして、7の抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項ですけれども、29ページの2行目から記載されておりますが、生産菌であるRF8694株には薬剤耐性マーカーが存在していないということを確認してございます。

また、6行目からの(2)の記載で、サザンブロット解析により生産菌であるRF8694に *AmpR* 遺伝子が混入していないということも確認をしております。

30ページを御覧ください。

2の導入遺伝子に関する事項の(1)制限酵素による切断地図に関する事項です。RF8694株の全ゲノム解析を行った結果、●●●に *qpt2* 遺伝子を含むほぼ完全長の発現カセットが●●●コピーと *amdS* 遺伝子の周辺領域が●●●コピー、*cb1h* 遺伝子プロモーター領域が●●●コピーの合計●●●コピーが導入されていたという説明になっております。

ただ、32ページの8行目からの記載になりますけれども、発現カセットの塩基配列とRF8694株の挿入部位の塩基配列を比較した結果、合計で●●●か所の変異が生じたということで、挿入されたこの *qpt2* 遺伝子●●●コピーのうち、●●●つについては●●●ということになってございます。

33ページを御覧ください。

14行目からの記載ですけれども、(2)のORFの有無のところでございます。発現カセット導入により新たに形成されたORFを確認するために、6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して、挿入部位の塩基、結合部位の塩基、発現カセット上にSNPが生じ、また、塩基をまたぐORFを検索した結果、30アミノ酸以上のORFが170個同定されました。これらのORFについて *E*-valueを1未満としてデータベース検索を行った結果、毒性が報告されるものとの相同性は確認されなかったとしてございます。

34ページを御覧いただきまして、4行目からの記載になりますが、これらのORFについて Allergenic Protein Sequence Searchesによる解析を行った結果、80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンは確認されませんでした。1つのORFは連続する8アミノ酸が●●●の配列と一致しました。この配列は *T.reesei* の TrD0641W という配列に由来したもので、*T.reesei* 自体にアレルギー誘発性が報告されていないということ、あと、この配列のフレームシフトも確認されていないということから、安全性は問題ないと判断したと考察をしております。このほかのORFでは、80アミノ酸残基で35%以上の一致、または連続する8アミノ酸が一致する既知のアレルゲンは確認されなかったということでございます。

さらに、接合部位を含む領域で意図しないORFが出現していないかを確認するために検索を行ったところ、142個のORFが同定されました。これらについて、*E*-valueを0.01未満としてBLASTp検索を行った結果、細菌のHicAタンパクと相同性の高いORFが確認されましたが、このHicAタンパクがバクテリアや古細菌が有する毒素-抗毒素システムにおいて毒素として働くというものでございまして、真核生物に対する毒素は知られていないということでございます。

また、今回のこのORFはプロモーター由来でございまして、このORFが発現して毒素を示す可能性は低いと考えられるという考察になってございます。

29行目からの記載になりますが、次にAllergenOnlineを用いて検索を行った結果、2つ

のORFの連続する8アミノ酸が●●●と*Aspergillus fumigatus*のアレルゲンと一致したという結果が出てございます。しかし、これらの配列は*T.reesei*のTrD0641Wの配列に由来したものでございまして、*T.reesei*自体にもアレルギー誘発性が報告されていないこと、この塩基配列にフレームシフトが行われていないことから、RF8694株の安全性は問題ないと判断されたという考察が記載されてございます。

ここで黄色の紙ファイルの申請要旨に戻っていただきまして、35ページ目を御覧ください。

35ページ目の16行目からの記載になります。第7 遺伝子組換え飼料添加物に関する事項の1 諸外国における認可ですけれども、2020年12月現在でEU諸国、米国、オーストラリアを含む世界73ヶ国で承認、販売されておりました、EUでは2014年にEFSAが豚及び家禽用飼料添加物として安全性への懸念がない旨の評価を踏まえて認可をしております。また、米国でも、AAFCOのOfficial Publicationに収載されているというものでございます。

38ページ目を御覧ください。

15行目からの大きさになりますけれども、第8の記載で、まず(1)当該遺伝子組換え飼料もしくは飼料添加物の中に組換え体由来の新たな有害物質が生成され、これが肉、乳、卵等の畜産物中に移行する可能性はないものと考えするという考察になってございます。

続きまして、39ページ目を御覧ください。

(2)といたしまして、一般的に飼料添加物の生産に使用される組換え株に挿入された遺伝子や挿入遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、卵等の畜産物に移行するという報告はなく、データベースによる文献検索の結果でもQPT2フィターゼが水産物中に移行するという報告もございません。また、これまで販売実績の中で安全性に問題があるという報告もないことから、QPT2フィターゼが肉、卵等の畜水産物に移行して有害物質に変換・蓄積される可能性はないと考えられるという考察になってございます。

続きまして、(3)といたしまして、フィターゼの給与により、鶏、豚及び養殖水産動物の代謝系に作用するという報告はないことから、新たに有害物質を産生する可能性はないものと考えられるという考察にしてございます。

説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請資料の確認に入りたいと思います。

まず第1から第3、ベクターに関する事項のところまで、申請書の1ページから18ページのところでお気づきの点がありましたら、御指摘をお願いいたします。

では、私のほうから、3ページの上から4行目のところにフィターゼの酵素活性の話が出てくるのですけれども、このFTUという単位がどういう単位なのか書いていないので、簡単な記載の追記をお願いしたいと思います。

〇〇〇 了解いたしました。

〇〇〇 それから、黄色い紙ファイルのほうの9ページ目ですけれども、上から3行目のと

ころに「結晶構造は類似している」と出てくるのですが、結晶は多分取っていないので、立体構造ぐらいにしておいていただいたほうが、結晶化は十中八九というか絶対してはいないと思うので、お願いします。

〇〇〇 了解しました。

〇〇〇 それから、13ページのところ、ここが一番面倒くさそうだなと思ったのですが、第3のベクターに関する事項の1の名称及び由来に関する事項ですが、ここは作ったプラスミドと、それを使ってどう作ったかというのが書いてあるのですが、これは本当はベクターなので、pUC19を書くべきなのです。なので、書式の問題なので安全性上の問題ではないのですが、一応pUC19のことをここに入れ込んでほしいというか、どういう由来で、どういうのが入っていて、安全性、こういうのに使われていますみたいなよくあるパターンのもをここに書いてほしいと思います。

〇〇〇 分かりました。伝えます。

〇〇〇 ほかの先生方、いかがでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 〇〇〇です。

細かいところですが、図4のシリーズでベクターがいくつも書かれており、図6にも同様の表記があります。特に図4-8と図6において、矢印の表記でプロモーターやターミネーターを示しているのが、違和感があります。具体的には、プロモーター領域がここからここまで、ターミネーター領域がここからここまでという意図だと思うのですが、矢印を使うのではなく、図4-7のように領域を示す方法の方が適切だと思います。ORFは矢印を使って書くことが一般的ですが、プロモーターやターミネーターに関しては矢印で示すのは一般的ではなく、誤解を招く恐れがあります。この表記方法の修正を提案します。

〇〇〇 では、全体に修正箇所が多いので、修正版の確認をするときまでに修正してもらうようにお願いします。

それでは、申請書の18ページから29ページ、第4の挿入DNA、遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項のところでお気づきの点がありましたらお願いいたします。

ここでもかなり事細かくORFの検索をやられているのですが、事務局のほうで確認したところで皆様の意見を確認しておきたいところがあるということなので、説明をお願いします。

〇〇〇 〇〇〇です。

今、御覧になっている黄色いフォルダの申請書で見ていただくと、2か所ありまして、23ページの28行目、実施日2023年という検索の部分と34ページの27行目以降の部分、やはり実施日2023年になっているものなのですが、もしお手元で添付資料8を開くことができるようでしたら、御覧ください。

これらは、申請書のほうで見ますと、34ページの27行目から読みますと、次に、これらのORFのアミノ酸配列を問合わせ配列として、AllergenOnline.org databaseに対して

Sliding 80mer window search及び8merのsearchを行ったと書いてあるのですが、この添付資料8をよく読みますと、確かに30アミノ酸以上のORFをまず絞り込んだ後、80merのSliding window searchについては99アミノ酸長のものに限って行ったということが書かれております。そういったサーチをしたことの正当性というか理屈も一応述べてあって、それは既にAllergenOnlineのFull FASTA search、FASTA36のアルゴリズムで全体を見ているので、大体カバーされている。短いものはほとんどカバーされているはずなので、99アミノ酸長のものだけをやったと書いてあります。

その主張の正しさの判断は別として、申請書には27行目にこれらのORFという形で、その上の12行目から18行目までに書かれている30アミノ酸以上のORFという限定的なものを対象にしているように書かれているので、ここは申請書の書き方が不正確かなと思いますので、一つは申請書の修正は必ず必要になる。もう一つは、この99アミノ酸を超える範囲で今回80merのSliding window searchをしたというその結果をそのまま受け入れてよいかという点の御判断をお願いしたいと思います。

以上です。

〇〇〇 事務局から気がついた点をいただきましたけれども、まず〇〇〇、この点についてコメントがありましたらお願いします。

〇〇〇 確かに、添付資料8の7ページ目に、80merのsliding window searchを行い、99アミノ酸以上のORFについて、35%以上の相同性のある配列の有無を検定に用いたということが書かれていますが、申請書には、30アミノ酸以上のORFについて80merのsliding window searchを行ったと書かれています。今まで、30アミノ酸以上のORFについて行った80merのsliding window searchの結果で検定を行うことを通常としてきておりましたので、今回も、その旨、明確にしてもらったほうがいいと思います。

〇〇〇 99アミノ酸以上のORFについて、80mer Sliding windowをやったということですよ。

〇〇〇 はい。99アミノ酸未満で80merのSliding window searchを行ったことが明確でないので、できる配列に関してはやってもらおうというほうが、今までもそういうふうにやっていたのかとは思うのですけれども。

〇〇〇 そうすると、追加でやってもらったほうがいいということですね。

〇〇〇 AllergenOnlineのほうの説明がどうなっているかですけれども、今までと同じような形でやってもらったほうがいいと思います。

〇〇〇 では、やってもらおうようにしましょう。80merから99merの間なので、そんなに手間はかからないはずだと思いますので、ささっとできるのはできると思うのですけれども。

その他、先生方、ございますでしょうか。

〇〇〇 私のほうから1つあるのですが、細かいところなのですけれども、20ページの①のbになるのですが、遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性に関する知見というところの次の行で、上記で確認されたORFのアミノ酸配列を問合わせ配列としてAllergenic

Protein Sequence Searchesを行ったということなのですが、ここでFASTAというアルゴリズムを使っているということなのですが、そのときに「既知のアレルゲンが複数ヒットしたが」と5行目にありまして、「80アミノ酸部分で35%以上の同一性を持ち」と言っているのですが、ここの既知のアレルゲンが複数ヒットしたというところの説明が難しく、これがFASTAの方法でやってE-valueを1でやっているのでアレルゲンとしてヒットした。そのヒットした中で80アミノ酸で35%、連続する8以上のアミノ酸の一致を調べたということですので、まず、こういう場合はE-valueを書いてもらって、最初にFull FASTAでE-value幾らでヒットさせて、それから8アミノ酸のほうの検索を行ったという書き方にしてもらえればと思います。

〇〇〇 そうすると、20ページの該当箇所はE-valueを記載してもらって。

〇〇〇 そうですね。既知のアレルゲンが複数ヒットしたというのは、バリューを幾つにしたときにアレルゲンが複数ヒットしたがとしてもらえればいいかと思います。

〇〇〇 では、そこは記載の整備という形でお願いいたします。

〇〇〇 〇〇〇、確認してもいいでしょうか。

20ページ以外のところも、今、全部は確認できないのですが、①から⑧まで同じような「既知のアレルゲンが複数ヒットしたが」という記載が全部にあるのですが、それは全てということでもいいですか。

〇〇〇 そうですね。E-valueは入れてもらったほうが分かりやすい。

〇〇〇 分かりました。ありがとうございます。

〇〇〇 本来は発現コンストラクトを全体でぱっとやっしまえば一番楽だったのですが、ここのパーツでやって、さらに全体でやってという読むほうもかなり大変な形になってしまっているのですが、記載整備は正しくやっていただきたいと思います。

では、後から戻っても構いませんので、次は第5から第8、申請書の29ページから39ページ、最後までですね。ここについてコメントがありましたらお願いいたします。

〇〇〇、お願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

33ページの上のほうなのですが、●●●コピー入ったうちの●●●は変異が確認されなかったが、●●●番目では●●●が起きていて、●●●については●●●と書いてあるのですが、これらについて、当該ORFの翻訳産物はフィターゼ活性を持つとは考えにくいとだけあって、これがその後の例えばアレルゲンの検索ですとか毒性タンパク質の検索では引っかかってきていないようなのですが、これはもともと酵素タンパク質であったものの一部がタンパク質になり得るということであると、断片化したものあるいはアミノ酸置換が生じたものというのが何かほかの酵素活性を持たないのかどうかですとか、そういうことに関する記述がどこにもないようなのです。

製剤を作るときの製造工程を見ても、正しい大きさのタンパク質以外のタンパク質を除去するというような工程はどうも入っていないようですし、出来上がった製品の電気泳動

図、SDS-PAGEの図が38ページの図10にありますけれども、低分子量のものが除去されているというふうにも見えないので、この変異したORFが問題のないものであるということをもう少し合理的に説明をしていただく必要があるのではないかと思いますのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 ストップコドンがたくさん入ったところの部分ですけれども、今、先生がおっしゃったように違うタンパク質が生産される可能性はあるかと思います。なので、フィターゼ活性を持つとは考えにくいというのはそうかもしれませんが、特にプロモーターの下流から最初に出てくるORF、途中でちぎれているのでしょうかけれども、そのORFについては少し記述してもらったほうがいいかなと。●●●以降はそんなに翻訳される可能性は高くないかと思いますので、少なくとも最初に出てくる、恐らく正規のATG、開始コドンから始まるような、途中でちぎれたようなものについては少し記述を足していただいて、どういうタンパク質が想定されるかみたいなものとか、それは少し記述を足してもらったほうがよろしいかなと思いますけれども、〇〇〇、そのような対応でよろしいでしょうか。

〇〇〇 あと、●●●について、この前後の文章を読んでも、これはどうなのかというのが読み取れないです。この段落の一番最後の「翻訳産物はフィターゼ活性を持つとは考えにくい」に●●●も入ってきているのか、入っていないのかというのも読み取れない文章になっているかと思います。

〇〇〇 その点については、今日申請者が来ておりますので、少しお聞きしたいと思いますので、後で〇〇〇のほうから御質問をよろしいでしょうか。

〇〇〇 分かりました。ありがとうございます。

〇〇〇 〇〇〇、よろしくお願いします。

〇〇〇 今の変異の根拠となっているシーケンスについてなのですけれども、**Oxford nanopore sequencing technology**を用いてと書いてありますが、それだけだったということでもよろしいのでしょうか。そうすると、よく読み間違っていることが結構あって、このシーケンスが違っていたというのが本当にそうなのかというのをもう一度確認していただいたほうがよいのではないかなと思うのですけれども、いかがでしょうか。よく間違っていて、私の少ない5~6個の経験の中でも、終止コドンが入っていて大変だと思ったら、実はちゃんとその部分をサンガー法で決め直してみると、違ったね、大丈夫だったとかということがあったりしますので、ちょっと信頼性が薄いような気がしているのですけれども。

以上です。

〇〇〇 では、その点も申請者に直接聞いてみたいと思いますので、〇〇〇、後でよろしく願いいたします。

〇〇〇 よろしく申し上げます。

〇〇〇 組換えの手順は結構数が多いですけれども、〇〇〇のほうで御確認いただけますでしょうか。

〇〇〇 事前に御指摘いただいていたところなので、私のほうでも確認しましたがけれども、特に組換え法のほうは一般的な方法を使っていて外来DNAを導入しているので、特に問題はないと判断いたしました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

あと、私のほうから、36ページにマイコトキシンの測定値が出てくるのですが、マイコトキシンは最近話題なのであれですが、このアフラトキシン、ゼアラレノンとかデオキシニバレノールとか、これは *Trichoderma* がそもそも作るものなのか、作ることが報告例があるようなものなのか、それとも一般的なマイコトキシンだからやりましたというパターンなのか、そこが分からなくて、これをやっている理由と伺いますか、そこは開発者のほうに聞いてみたいと思います。

〇〇〇、ここら辺、何か御存じのことがあったら。

〇〇〇 一般的に食品とかで使われている糸状菌とかではそういうものが生産されないものを使われていたり、あと、遺伝子が潰れていたりということが既に分かっていると思うので、恐らく問題ないのかと思って判断しています。

以上です。

〇〇〇 そのほか、全体にわたって御意見等がありましたらお願いいたします。

では、申請者をお呼びします。しばらくお待ちください。

(申請者入室)

〇〇〇 それでは、音声等トラブルがあるようですけれども、説明者の方、自己紹介をお願いします。会社名と名前だけで結構です。

〇〇〇 〇〇〇です。よろしくお願いします。

〇〇〇 〇〇〇です。よろしくお願いします。

〇〇〇 〇〇〇さんが〇〇〇の責任者ということですね。

それでは、質疑応答に入りたいと思います。

最初に〇〇〇のほうからお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

いただいた資料の33ページのほうで、*qpt2*遺伝子●●●コピーのうち●●●コピーについては変異が生じていて、まず、●●●番目については●●●して、その結果、●●●していると予想されるということなのですが、これがフィターゼ活性を有しているのかどうかということについてまずお伺いしたいと思います。いかがでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇です。

今の御質問の件なのでございますけれども、データのほうを確認した上で回答させていただきます。

〇〇〇 分かりました。

そうしましたら、その次の●●●番目のコピーについては、●●●予測されています。

●●●ので、これらの翻訳産物がフィターゼ活性を持つとは考えにくいというのはそうかなと思うのですが、これは元が酵素タンパク質ですので、短いものがほかの酵素活性を持たないかどうかというような懸念を払拭する何か合理的な説明が必要であると思われるということ。

あと、製剤について、38ページのほうでSDS-PAGEによって主にはフィターゼが含まれていて、糖鎖修飾あり、なしとあるという記述があるのですが、ここの中に短い異常なORFに相当すると思われるようなバンドが見られたかどうかですね。これも併せて記述いただくと、予期せぬORFというのが問題ないということが合理的に説明されるかと思えます。いかがでしょうか。

〇〇〇 分かりました。そのように修正させていただきます。

〇〇〇 〇〇〇、よろしいでしょうか。

〇〇〇 修正された文章を拝見して、また検討したいと思えます。よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 それでは、〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 〇〇〇と申します。よろしくお願ひいたします。

30ページになるわけなのですが、今の●●●つ遺伝子に変異されていたということを確認した根拠になっておりますシーケンシングについてお伺ひしたいと思えます。ここは13行目から、塩基配列を明らかにするため、Oxford nanopore sequencing technologyを用いてゲノム解析を行ったと書いていらっしゃいますけれども、さらに塩基配列が違って予期せぬ変異になっていた部分というのに関しまして、ほかのシーケンシングの方法を用いて確認をされたかどうかをお伺ひしたいと思えます。いかがでしょうか。

〇〇〇 〇〇〇です。

海外の担当者のほうに確認を取った上で回答させていただきます。

〇〇〇 ありがとうございます。

割とよく知られていることなのですが、このOxfordのテクノロジーだけだと、概要は分かるのですが、塩基配列に誤りがしばしば生じているということがありまして、もちろん続く文章には「予測される」と書いていらっしゃるので、そういうことではあるのですが、もし変異がないとすると、先ほど〇〇〇も御質問になっていたことに関しては答えなくてもよくなるかもしれませんし、このシーケンスの根拠に関しては一度確認していただいたほうがよろしいのではないかなと考へました。

以上です。

〇〇〇 それでは、私のほうから1つ、申請書の36ページにマイコトキシンの測定値が載っていますけれども、このアフラトキシン、ゼアラレノンとか、この手のマイコトキシンは*T.reesei*がそもそも作った例があるとか*Trichoderma*属でそういう作った報告例があるといったことがあるのかなのかということをお聞ひしたいと思えます。

〇〇〇 資料としてはっきりとそう書いてあるものは、今、手元には持っていないのです

けれども、*T.reesei*がかび毒を産生するという話は聞いたことはありません。

〇〇〇 分かりました。

そうすると、一般的なマイコトキシンの代表としてこの3つを測りましたという理解でよろしいですか。

〇〇〇 そうですね。規制されているというか、飼料中でよく問題にされるかび毒ということで選択しています。

〇〇〇 分かりました。

そのほか、先生方から全体にわたってコメントがありましたらお願いいたします。

よろしいですか。

それでは、説明者の方、どうもありがとうございました。これから質疑のほうに戻りますので、御退出をお願いいたします。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、質疑のほうで追って確認するということが多いので、今回は持ち越しといたしますか、修正箇所も非常に多いので少し整理していただいて、その上で改めて皆様に御審議していただきたいと思います。なので、専門委員の先生方から提出されました意見や確認事項を指摘事項案として取りまとめ、各専門委員に御確認いただいた上で、農林水産省を通じて申請者に対して指摘したいと思います。

それでは、議題（1）については終わりたいと思います。

議題（2）のその他ですけれども、事務局から何かございますでしょうか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 ありがとうございました。

本日の議題についてはこれで終了いたします。

以上をもちまして、第247回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。