

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第257回) 議事録

1. 日時 令和6年10月25日(金) 14:41~17:37
2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)
(Web会議システムを利用)
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
 - ・コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP51291)
(食品・飼料)
 - ・LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ
 - (2) その他
4. 出席者
 - (専門委員)
児玉座長、伊藤専門委員、小野道之専門委員、佐々木専門委員、柴田専門委員、
爲廣専門委員、手島専門委員、藤原専門委員、百瀬専門委員
 - (専門参考人)
中島専門参考人、山川専門参考人
 - (食品安全委員会)
頭金委員、祖父江委員
 - (事務局)
及川事務局次長、古田評価第二課長、今井評価情報分析官、奥藤課長補佐、
岩瀬評価専門職、山口係長、今村技術参与、坂本技術参与
5. 配布資料
資料 食品健康影響評価に関する資料
 - ① コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP51291)
(食品)
 - ② コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ(DP51291)
(飼料)
 - ③ LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 それでは、皆様、仕切り直しで、定刻になりましたので、ただいまから第257回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたします。

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。

本日は、所用により〇〇〇は御欠席です。

また、専門参考人として〇〇〇に御出席をいただいております。

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「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP51291）（食品・飼料）」と「LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ」の安全性についての審議です。

「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ」については〇〇〇、「LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ」の審議については〇〇〇にそれぞれの審議の際に御出席いただきます。

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 ありがとうございます。配付資料を確認いたします。

配付資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料といたしまして「食品健康影響評価に関する資料」、机上配布資料といたしまして、トウモロコシDP51291の関係のものが机上配布資料1、LDN487株プルラナーゼ関係のものが机上配布資料2-1から2-3となっております。

資料の不足等はございませんでしょうか。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、「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP51291）（食品・飼料）」の申請者であるコルテバ・アグリサイエンス日本株式会社の方、「LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ」の申請者であるダニスコジャパン株式会社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。

以上です。

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いたします。

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会議で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いたします。

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。座長より呼びかけますので、マイクをオンにして、お名前を発言いただいた上で御発言をお願いします。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。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 それでは、新規品目である「コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ（DP51291）（食品・飼料）」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 それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。御登庁いただいている先生方におきましては、緑の紙ファイルの最初のブロックが当該申請品目の申請要旨となっております。6ページをお開きください。

まず初めに、今回専門調査会で御審議いただきますトウモロコシDP51291でございますが、令和5年に審議が終了しているトウモロコシDP23211と類似の品目になります。今回の審議品目であるトウモロコシDP51291とDP23211の違いでございますが、審議が終了しているトウモロコシDP23211では、*Dvssj1*遺伝子の断片、*ipd072Aa*遺伝子、*pat*遺伝子、*pmi*遺伝子の4つの遺伝子を導入してございましたが、今回の審議品目であるトウモロコシDP51291では、*Dvssj1*遺伝子の断片を除く3つの遺伝子を導入してございます。

申請書の第1の「1 宿主及び導入DNAに関する事項」でございます。今回、宿主はトウモロコシのデント種PHR03系統でございます。

(2) DNA供与体と(3) 挿入DNAの性質及び導入方法につきまして、今回3つの遺伝子がアグロバクテリウム法にて組み込まれてございます。

1つ目の*ipd072Aa*遺伝子は、*Pseudomonas chlororaphis*を供与体としてIPD072Aaタンパク質を発現する遺伝子でございます。こちらは特定のコウチュウ目害虫の中腸上皮細胞を破壊することで殺虫作用を示すタンパクでございます。

2つ目、*pat*遺伝子でございます。*Streptomyces viridochromogenes*を供与体としてPATタンパク質を発現する遺伝子でございます。除草剤グルホシネート抵抗性の遺伝子でございます。

3つ目、*pmi*遺伝子でございますが、形質転換体の選択マーカーとして用いられているものでございまして、*Escherichia coli* (K-12株) を供与体としてございます。

8ページに進んでいただきまして、最下段のパラグラフ、6、安全性評価において検討が必要とされる相違点でございますが、トウモロコシDP51291が宿主と相違する点は、*ipd072Aa*遺伝子、*pat*遺伝子及び*pmi*遺伝子を有することによるIPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質の産生であるとしてございます。

導入された遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項で、そのほかにつきましては従来のトウモロコシと相違はないことから、DP51291系統の食品健康影響評価においては、比較対象となる既存の宿主があると判断してございます。

10ページをお願いいたします。中段より少し下から第3の「4 アレルギー誘発性に関する事項」についてでございます。トウモロコシは一般的にアレルギー誘発性食品とはみなされておらず、我が国のアレルギー表示対象品目及び国際的な食品アレルギー表示規制の対象品目ではないとのことでございます。

12ページをお願いいたします。「第4 ベクターに関する事項」でございます。遺伝子導入方法として今回アグロバクテリウム法を用いております。このページの中頃から(3)既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項でございます。導入用プラスミドPHP74638の外骨格領域に含まれる遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列は含まれていないとしております。

(4) ベクター中の薬剤耐性遺伝子について、導入用プラスミドPHP74638の外骨格領域には、微生物を用いて当該プラスミドを増殖させる際に用いた抗生物質スペクチノマイシン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子が含まれており、これらの遺伝子の性質は明らかであるとしてございます。

17ページまでお進み願います。第5、挿入DNAに関する事項でございます。こちらのページの差し替えをいただいておりますので、机上配布資料1を1枚めくっていただきまして、下に記載のページで17ページをお開きください。1の(1)挿入DNAの供与体については、先ほど御説明した第1の1(2)のとおりでございます。

(2)の安全性についてでございますが、各遺伝子のアレルギー誘発性及び毒素産生性についても確認しているということを追記いただいております。*ipd072Aa*遺伝子の供与体である *Pseudomonas chlororaphis*、*pat* 遺伝子の供与体である *Streptomyces viridochromogenes*、*pmi*遺伝子の供与体である *E.coli* (K-12株) は、それぞれヒトへの病原性、アレルギー誘発性、毒素産生性は知られていないとしております。

申請要旨にお戻りいただきまして、18ページをお開きください。挿入遺伝子のクローニング方法でございますが、導入された遺伝子はそれぞれの供与体のゲノムDNAまたはcDNAからPCR法によってクローニングされたとのことでございます。

19ページから20ページにまたがる表4でございますが、(3)挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。挿入DNA領域の構成要素は記載のとおりでございます。

21ページでございますが、こちら差し替えがございましたので、机上配布資料1の21ページを御覧ください。遺伝子の機能並びに発現タンパクの性質及び機能についてでございます。まず、*ipd072Aa*遺伝子でございますが、こちらはIPD072Aaタンパク質がウェスタンブロットワーム等のコウチュウ目昆虫の中腸上皮細胞の受容体に特異的に結合して細胞を破壊することで殺虫作用を示すと考えられるものでございます。IPD072Aaタンパク質につきまして、標的昆虫特異性であるかどうかについて確認しており、ウェスタンブロットワーム以外のコウチュウ目昆虫については100ppm、チョウ目昆虫においては1,000ppmでも生存率への影響がなかったことを確認してございます。

要旨に戻りまして、22ページを御覧ください。IPD072Aaタンパク質に関する記述の続きになります。評価済みであるトウモロコシDP23211の審議の際に、こちらのタンパク質について利用の経験がなく、ヒトの腸管上皮細胞での試験を追加で実施しております。ヒト腸管上皮細胞株であるT84及びCaco-2をIPD072Aaタンパク質溶液に48時間ばく露した結果、T84及びCaco-2のいずれについても、5µg/mlのIPD072Aaタンパク質へのばく露による細胞のバリア機能及び生存率への影響は認められなかったとしてございます。

*pat*遺伝子がコードするPATタンパク質は、除草剤グルホシネートの活性成分であるL-グルホシネートをアセチル化し、N-アセチル-L-グルホシネートに変えて無毒化し、*pmi*遺伝子がコードするPMIタンパク質はマンノース-6-リン酸とフルクトース-6-リン酸を可逆的に相互変換します。組換え植物の選抜マーカーとして用いられるとのことでございます。

発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性については22ページの下段から記載のある②でございます。IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質、PMIタンパク質につきましては、毒性タンパク質データベースを用いて検索したところ、既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかったことを確認してございます。

続いて、25ページの「6 DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項」でございます。今回の導入方法につきましては、導入用プラスミドPHP74638の挿入DNA領域を、3回の形質転換により導入しております。1回目の形質転換では、宿主である非組換えトウモロコシPHR03系統のゲノムDNAにプラスミドPHP50742のT-DNA領域であるLP配列をアグロバクテリウム法にて挿入してございます。得られた形質転換体のうちゲノムDNAにT-DNA領域であるLP配列が1コピー挿入されており、かつPHP50742由来の意図しないDNA断片が含まれていない1個体を選抜し、中間系統1としました。

続いて、2回目の形質転換でございますが、申請要旨では30ページからの記載になっております。2回目の形質転換では中間系統1が有するLP配列を改変しております。*ip3-h5*遺伝子発現カセットの除去及び*pmi*遺伝子発現カセットを別の選抜マーカーである*npt II*遺伝子発現カセットに置き換えることを目的に形質転換を行っております。

2回目の形質転換は1回目の形質転換で作出された中間系統1の細胞に5種類のプラスミド、PHP46438、PHP5096、PHP16072、PHP21139及びPHP31729をパーティクルガン法で導入してございます。この5つのプラスミドのうち、挿入標的配列を有するのが

PHP46438で、その構成要素が次の31ページの図6及び32ページの表6で示されております。

要旨の30ページにお戻りください。下から3行目の記載になりますが、4つのプラスミドにつきましては、中間系統1への導入後、それぞれFLPタンパク質、Creタンパク質、WUS2タンパク質、ODP2タンパク質を一過的に産生することとさせていただきます。こちらにつきまして、本年6月25日付で改正しました種子植物の食品健康影響評価指針で新たに追加された項目に関連してさせていただきます。指針の第4の5、そのほかの導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性能に関する事項でございますが、こちらでは既存品種の細胞に導入してもゲノムに挿入されない遺伝子を用いており、その遺伝子から産生されるタンパク質がある場合は、その由来及び機能並びに安全性等が明らかであることとさせていただきます。

2回目の形質転換で4種類のプラスミドはタンパク質を一過的に産生することとしたので、申請者にその由来、機能並びに安全性を確認したところ、33ページの資料に差し替えがさせていただきます。机上配布資料33ページのように由来を追記させていただいております。

要旨に戻りまして、34ページの図7を御覧ください。上段に記載の図Aが中間系統1のLP配列の概要になります。図Aの右側の記載になりますが、中間系統1に導入されたPHP5096からはFLPタンパク質が産生され、既に中間系統1のゲノムDNAに挿入されているLP配列中のFRT1及びFRT87と、挿入標的配列を含むプラスミドPHP46438中のFRT1及びFRT87との間で部位特異的組換えを誘導します。その結果、下段のBに記載のありますとおり、LP配列中の*pmi*遺伝子発現カセット及び*pat*遺伝子発現カセットを含む領域がPHP46438由来の*npt II*遺伝子発現カセット及び*AmCyan1*遺伝子発現カセットを含む領域に置換されます。

また、図Aの左側の記載になりますが、中間系統1に導入されたPHP16072から産生されるCreタンパク質は、中間系統1のゲノムDNAに挿入されているLP配列中に2か所存在する標的配列*loxP*の間で部位特異的組換えを誘導し、2か所の*loxP*の間に位置する*ip3-h5*遺伝子発現カセットを含む領域がLP配列から除去されます。

残りの2つのプラスミドから産生されるWUS2タンパク質及びODP2タンパク質は形質転換における植物体の再生率を向上させるために導入しております。

なお、LP配列に挿入したPHP46438由来のDNAは全て3回目の形質転換においてLP配列から除去されるため、DP51291には残存しないとのこととさせていただきます。

得られた形質転換体のうち、LP配列が意図したとおり改変され、かつ用いたプラスミド由来の意図しないDNA断片が含まれていない1個体を選抜し、中間系統2といたしました。

3回目の形質転換ですが、こちらも申請要旨の差し替えがございましたので、机上配布資料1の35ページを御覧ください。3回目の形質転換は、中間系統2の細胞にPHP74638を有するアグロバクテリウムを感染させて行っております。3回目の形質転換においても一過的に産生されるタンパク質がございまして、FLPタンパク質に加えまして、WUS2タンパク質、ODP2タンパク質、DsRed2タンパク質の機能を追記いただいております。

要旨にお戻りいただきまして、36ページの図8を御覧ください。図Aの上段が導入用プラ

スミドPHP74638のT-DNA領域、2段目が中間系統2のゲノムに挿入されているLP配列の構成の概要、図Bが最終的にトウモロコシDP51291に挿入されたDNAの構成の概要でございます。

まず、図Aを御覧ください。PHP74638のT-DNA領域はFLP遺伝子発現カセットを含んでいるため、細胞への導入に伴い、FLPタンパク質が産生されます。FLPタンパク質により部位特異的組換えが誘導され、PHP74638のT-DNAにおいてFRT1及びFRT87に挟まれた挿入DNA領域と中間系統2のLP配列においてFRT1及びFRT87に挟まれた領域が置換されてございます。

その後の交配過程は37ページの図9に示された育種図に示したとおりであり、安全性評価の対象はT₁世代以降であるとのことでございます。

こちらの育種図に関しまして、○○○より、●●●が正しくないように見えると御連絡いただいております、申請者に確認いたしました。机上配布資料1の37ページを御覧ください。修正いただいたものがこちらになるのですけれども、こちらの●●●を作出する工程についての場所が○○○から事前に伺っていた箇所と違ってございまして、さらにお電話で確認しましたところ、●●●と口頭で確認が取れておりますので、●●●いただけるよう、調査会後に修正を依頼予定でございます。

申請要旨にお戻りいただきまして、38ページをお願いいたします。第6の1の(1)導入された遺伝子のコピー数及び近傍配列についてでございます。①ですが、挿入DNAのコピー数及び外骨格領域の有無を確認するため、SbS分析を行った結果、組換え体にLP配列の5'末端及び3'末端と宿主ゲノムDNAとの接合領域がそれぞれ1か所特定されたことから、組換え体中に挿入標的配列が1コピー含まれていることが確認されたとしております。

さらに、いずれの組換え体についても、3回目の形質転換で用いたプラスミド、PHP74638由来の配列とゲノムDNAとの意図しない接合部位は認められなかったことから、PHP74638の外側骨格領域がゲノムDNAに挿入されていないことを確認してございます。

また、39ページの2パラ目に記載がございしますが、中間系統1及び中間系統2の作出において用いられた全てのプラスミドについても分析を行い、これらのプラスミドに由来する意図しないDNAがDP51291中に残存していないことを確認しているとのことでございます。

次に、40ページの②挿入DNAの塩基配列及びその近傍配列の由来でございますが、組換え体の挿入DNA領域においてSanger法で塩基配列を確認した結果、意図した配列と一致しており、各遺伝子発現カセットの各構成要素に欠損は認められなかったとのことでございます。また、挿入されたDNAの5'側及び3'側近傍配列について、トウモロコシのゲノムDNA配列データベースとBLASTNを用いて照合した結果、5'側近傍配列と相同性を示す配列は同定されませんでした。3'側近傍配列については1,158塩基中829塩基の領域が2番染色体配列と99%一致していたとのことでございます。しかし、当該配列につきましては、2番染色体上のほかの場所、5番染色体及び9番染色体との配列とも同等との相同性を示し

たことから、挿入部位の特定には至りませんでした。その原因として、公的データベースに登録されているトウモロコシのゲノムDNAがB73系統であり、DP51291の宿主であるPHR03系統とは異なる品種であることが考えられたため、コルテバの社内で保有していますPHR03系統のゲノムDNA配列と改めて照合した結果、いずれもPHR03系統の1番染色体の配列と完全に一致したことから、挿入部位の近傍配列は宿主であるトウモロコシの1番染色体由来であると考えられたとのことでございます。

続いて③でございますが、LP配列の挿入による遺伝子破壊の有無を評価するため、5'側及び3'側近傍配列について、NCBIヌクレオチドデータベース及びNCBI ESTデータベースを用いてBLASTN並びにBLASTXによる検索を行った結果、DNA挿入による宿主の遺伝子配列の変化はないと考えられたとしてございます。

続きまして、41ページの(2) ORFの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項です。6つの読み枠で終止コドンから終止コドンまで8アミノ酸以上のペプチドをコードするORFを検索した結果、目的タンパク質をコードするORFを3個含む771個のORFが確認されております。これらのORFについて毒性タンパク質データベースを用いて、*E-value*が 1×10^{-4} 未満を指標として検索を行った結果、既知毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。さらに、NCBI非重複データベースを用いて比較を行った結果、12個のORFがコードするアミノ酸配列について、データベースに含まれるタンパク質との相同性が認められましたが、いずれについても毒性は認められませんでした。

既知アレルゲンとの比較はCOMPAREデータベースを用いて連続する80アミノ酸残基当たり35%以上及び連続する8アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索した結果、80アミノ酸残基当たり35%以上で一致するORFが5つ見つかりました。また、3個のORFがコードするアミノ酸配列が既知アレルゲンと連続する8アミノ酸以上で一致したとのことでございます。

それぞれのORFが転写及び翻訳される可能性について、少々修正がございましたので、机上配布資料1の42ページ及び43ページを御覧ください。DP51291_341、723、409の本文でORFの誤字が3か所ございました。記載内容については大きく変更ございません。

DP51291_235は、ウシ由来I型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖前駆体、アニサキス由来のAni s 11様タンパク質2前駆体、ニジマス由来のコラーゲン $\alpha 2$ 鎖と35%を超える相同性を示しました。DP51291_235がコードするアミノ酸配列においてメチオニンはC末端から19番目のアミノ酸であり、既知アレルゲンとの相同性が認められた領域よりも下流であるため、仮にDP51291_235が転写及び翻訳されたとしても、産生されるアミノ酸配列はC末端の19アミノ酸であり、既知アレルゲンとの相同性を有していないと考えられたとのことでございます。

DP51291_341は、コムギ由来の高分子グルテニンと36.2%の相同性を示しました。DP51291_341がコードするアミノ酸配列においてメチオニンはC末端に位置していることから、仮にDP51291_341が転写されたとしても、翻訳される可能性は低いと考えられた

とのことをごさいます。

DP51291_562は、既知アレルゲンと80アミノ酸残基当たり35%を超える一致と、既知アレルゲンと連続する8アミノ酸以上で一致の両方の検索でヒットしております。ブタクサ由来の推定Art v 1ホモログと36.2%の相同性を示し、また、トウモロコシ由来のエンドキチナーゼAと連続する8アミノ酸及び12アミノ酸の一致を示しました。DP51291_562の上流にはプロモーターがなく、コードするアミノ酸配列にはメチオニンが含まれていないことから、DP51291_562が転写または翻訳される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

DP51291_563は、ブルールピナス由来のコンドグルチンB5、ニジマス由来のコラーゲン α 2鎖と35%を超える相同性を示しました。DP51291_563の上流にはプロモーターがなく、コードするアミノ酸配列にはメチオニンが含まれていないことから、DP51291_563が転写または翻訳される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

DP51291_723は、ニジマス由来のコラーゲン α 2鎖と35%を超える相同性を示しました。DP51291_723の上流にはプロモーターがなく、転写される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

DP51291_220は、チリダニ由来のペリトロフィン様タンパク質と連続する8アミノ酸の一致を示しました。DP51291_220がコードするアミノ酸配列にはメチオニンが含まれておらず、真核生物でメチオニンをコードするATGの代わりに翻訳開始コドンとして機能するCTG、GTG及びTTGも含まれていないことから、DP51291_220が翻訳される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

DP51291_409は、アーモンド由来の推定プルニン1前駆体と連続する8アミノ酸の一致を示しました。DP51291_409の上流にはプロモーターがなく、コードするアミノ酸配列にはメチオニンが含まれていないことから、DP51291_409が転写または翻訳される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

43ページ一番下のパラグラフに記載のとおり、DP51291に挿入されているDNAの全体及びその両末端近傍配列との接合部位に生じるORFを検討した結果、意図しないORFから毒性タンパク質またはアレルゲンが産生される可能性は低いと考えられたとのことをごさいます。

次に、要旨の44ページにお戻りください。遺伝子組換え産物の発現部位、発現時期及び発現量をごさいます。こちらにつきましては、IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質、PMIタンパク質についてそれぞれ次の45ページの表7に記載のとおり産生していることが確認されてごさいますが、46ページの3、遺伝子産物が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるか否かでは、いずれも有意な量の産生ではないと考察されてごさいます。

続いて、4の遺伝子産物のアレルギー誘発性につきましては、申請者のほうでアレルギー誘発性は知られていないと考察しているところをごさいます。

続いて、47ページに参りまして、「(3) 遺伝子産物の物理化学的処理の感受性に関する

事項」でございます。今年の6月に当専門調査会で決定しております植物の技術的文書の6の「(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に対する事項」の「オ その他」で、「遺伝子産物の物理化学的処理が省略可能であると判断する場合、その判断の根拠について合理的な理由が示されていることが重要である。例えば、既に食品健康影響評価を終了し、安全性が確認された遺伝子配列とアミノ酸配列が同一であることが確認でき、かつ、糖鎖修飾等に変化が生じていないことが考えられる場合が該当する」と記載してございます。

DP51291で産生されるIPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質それぞれをコードする導入遺伝子の塩基配列は、冒頭でお伝えしましたとおり、いずれも既に安全性審査が終了しているトウモロコシDP23211に導入された遺伝子と同一であるため、DP51291及びDP23211において、これらの遺伝子から産生されるそれぞれのタンパク質のアミノ酸配列も同一であると考えられるとのことでございます。

そのため、DP23211におけるこれらのタンパク質の物理化学的処理に対する感受性の評価結果をDP51291にも適用できると考えられたとし、物理化学的処理に対する感受性の試験を省略しており、概要を47ページ及び48ページに記載してございます。

続きまして、48ページの中頃から「(4) 遺伝子産物と既知アレルゲンとの構造相同性に関する事項」でございます。こちらについても修正がございますので、机上配布資料1の下のページ数で48ページを御覧ください。COMPAREデータベースを用いて既知アレルゲンとの相同性を検索したところ、IPD072Aaタンパク質及びPATタンパク質と既知アレルゲンとの相同性は認められませんでした。PMIタンパク質については、既知アレルゲンと80アミノ酸残基当たり35%を超える一致は認められなかったが、カエル由来の α -パルブアルブミンとの間に8アミノ酸の一致が認められました。こちらの*pmi*遺伝子については、当専門調査会において今年の7月に御審議いただき、評価済みである品目、トウモロコシDP915635でも使用されており、その際に〇〇〇から御意見を賜り、修文を依頼した箇所でございます。当品目でも同様の記載に修文いただき、記載のようにPMIタンパク質がアレルギー誘発性を示す可能性は低いと考察してございます。

要旨にお戻りいただきまして、少し飛びまして52ページをお願いいたします。事前に〇〇より、サザンプロットの分析結果について、各世代がヘミかホモか系統の導入遺伝子座が分かるようであれば示していただきたいと御連絡いただいていたございました。そちらに対する回答でございますが、サザンプロットにおけるT₁、T₂、T₃、T₄及びT₅世代の各レーンには、各世代の組換え体1個体から抽出されたDNAが試供されています。これらの供試個体については事前に定性PCRが行われ、組換え体であることが確認されています。各世代における導入DNAの接合型を確認したところ、T₁世代はヘミ、T₄、T₅世代はホモでしたが、T₂及びT₃世代は分離世代であり、ヘミ及びホモ接合体の組換え体が含まれることが分かりました。しかしながら、供試個体の確認は定性PCRを用いて行われており、ヘミ接合型とホモ接合型は区別されておられません。これらのことから、T₂及びT₃世代の供試個体の

接合型がヘミであるかホモであるかを特定することができないため、接合型の記載につきましては控えさせていただきたく存じますとの回答でございました。

続いて、55ページ、「6 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項」でございます。IPD072Aaタンパク質はトウモロコシ由来のタンパク質とは類似しておらず、アミノ酸配列についても酵素タンパク質を含めた既知のタンパク質のモチーフあるいはドメイン等との相同性は認められなかったことから、宿主の代謝系に影響を及ぼす可能性も低いとしてございます。PATタンパク質は基質特異性を有しているため、ほかのアミノ酸等を基質とはせず、PMIタンパク質も基質特異性を有しており、ほかの天然基質は知られていないため、これらのタンパク質が宿主の代謝経路に意図しない影響を及ぼす可能性は低いと考察してございます。

続きまして、55ページの下段から67ページまでは、従来のトウモロコシとの差異でございます。分析項目は子実中の主要構成成分、脂肪酸組成、アミノ酸組成、ミネラル類、ビタミン類、栄養阻害物質等でございます。組換え体と宿主品種を2021年に米国の8ほ場で栽培し、完熟期の子実を用いて比較した結果、いずれも組換え品種と従来品種との間で統計学的な有意差は認められなかった、もしくは自社の商業品種変動の範囲内であったとし、67ページに分析結果の結論の記載がございしますが、宿主であるトウモロコシの範囲内であったとのことでございます。

68ページの8、諸外国における認可等でございます。米国においては、2024年7月にFDAにより食品及び飼料としての安全性の確認が終了しております。カナダにおいては、2024年7月にカナダ保健省により食品としての利用が、カナダ食品検査庁により飼料としての利用が承認されてございます。オーストラリア・ニュージーランドにおいては、2024年2月にFSANZにより食品としての利用が承認されてございます。欧州においては、EFSAに対して食品及び飼料としての安全性審査の申請中でございます。

最後に、69ページの第7ですが、以上のことから、DP51291の食品としての安全性の知見が得られるとしてございます。

全体を通してでございますが、〇〇〇から御連絡をいただいております、DP23211系統から*Dvssj1*を抜いたコンストラクトになっているようだが、●●●という御質問をいただいておりますが、そちらに対する回答は、●●●ことが目的という回答が来ております。

申請要旨の説明は以上になります。よろしくお願いたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請資料についての審議に入りたいと思います。

説明にもありましたけれども、承認済みのDP23211系統から*Dvssj1*のRNAのコンストラクトの部分を抜いたような形になっております。これは多分、回答にもありましたけれども、●●●のものもつくったということと認識しております。

それでは、第1から第3、申請書の6ページから11ページについて御意見、コメントがあ

りましたら、よろしくお願ひいたします。

よろしいですね。

それでは、申請書の12ページから16ページ、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について御意見、コメントがありましたら、お願ひいたします。

〇〇〇、よろしくお願ひします。

〇〇〇 前回承認された申請書の内容が分からないのですが、今回の申請書の14ページや27ページの遺伝子の由来や機能の項目のところ細菌由来という表現が多用されている点に、やや違和感を覚えました。他の箇所では、遺伝子の具体的な由来が詳しく記載されているのに対し、細菌由来という表現はやや曖昧に感じられます。また、細菌由来とアグロバクテリウム由来という表現はカテゴリーとして異なる扱いに見えます。一般的に、遺伝子組換えに関する申請書では、遺伝子の由来をより具体的に記述することが一般的ではないでしょうか。この点についていかがでしょうか。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

これは多分前回も似た感じになっているのですよね。

今この細菌由来になっているところですが、これは多分、外骨格領域ですので、挿入されたところはきちんと書いてもらいますけれども、外骨格領域については簡素化された記載でもよろしいのではないかと考えております。今ちょっと事務局で確認しておりますので、後ほどまたその点に戻って議論したいと思ひます。

ほかはございますでしょうか。

それでは、申請書の17ページから最後までというところで、御意見、コメントがありましたら、よろしくお願ひいたします。

一応、先ほどありましたサザンハイブリダイゼーション、52ページのところですが、薄いレーンと濃いレーンが結構はっきり出ているので、へみかホモかだろうねと思ひて聞いたのですが、薄いところはへみという形で回答が来ております。一部、へみかホモか検定しないで使ったところがあるようですけれども、安全性上は問題ないかと思ひます。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 1点よろしいでしょうか。43ページから44ページにかけてなのですが、ORFでアレルギー性の検索をしているところなのですが、8残基一致したものが3つあるのですが、それに関しましては562と220と409ですか。8残基アミノ酸がエピトープと合致するという報告はないというふうな記載もしていただきたいと思ひました。

以上です。

〇〇〇 その点は事務局のほうから修文をお願ひする形でよろしいでしょうか。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 では、その点については、修文が終わりましたら、〇〇〇、御確認をお願ひいた

します。

そのほかはございますでしょうか。

〇〇〇、よろしく申し上げます。

〇〇〇 47ページなのですがすけれども、どちらかというところ確認になってしまうので恐縮ですが、IPD072Aaタンパク質の物理化学的性質のところ加熱処理では121℃、30分間でほぼ5%まで低下するというのですが、添付資料を見てみると、95℃ではほぼ残っているという結果だったと思います。これは前回、DP23211のときはどのように問題ないと処理されたのか、御説明いただけるとありがたいと思うのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 私の記憶では、その部分について議論は特になかったと思います。加熱処理については、やや耐性があるみたいですがすけれども、たしか人工胃腸液できれいに消化されているのでよいでしょうという感じの理解だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。

事務局、先ほどの点は。

〇〇〇 ありがとうございます。

トウモロコシDP23211の申請資料を確認いたしました。〇〇〇が言われたところですがすけれども、前回も同じように細菌由来という形で記載されています。例えばスペクチノマイシン耐性マーカー遺伝子とか、テトラサイクリンとかも細菌由来のという形で前回も記載をさせていただきます。

〇〇〇 一応整理するということで、御提案ですがすけれども、特にこの開発者は非常に多いのですがすけれども、染色体に入れられない形のプラスミドを多用するケースとか、あとベクターバックボーンに関するところの記載については、あまり推奨はしませんけれども、細菌由来という形の記載でも、経路については書いてもらいますけれども、由来については少し省略した形でも認めましょうというか、暗黙に。暗黙というわけではないな。まあいいでしょうという形にしたいと思いますが、〇〇〇、それでよろしいでしょうか。染色体に入った場合はきちんと書いてもらいますけれども。

〇〇〇 了解しました。基本的には、ほとんどが細菌由来であると思いますが、たまにファージ由来の遺伝子が含まれる場合もあるかと思いますが、記載内容に誤りがないか確認できれば特に問題ないと考えます。この点を踏まえて進めていただければと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

最後までですがすけれども、全体を通して何かございますでしょうか。よろしいですかね。

それでは、特段安全性上の問題があるようなところはないということで、1か所、〇〇〇の確認する場所が残っておりますけれども、それについては後日、修正が上がってききましたら〇〇〇に御確認いただくということで、安全性上の問題はないということです、その点について皆様の御同意をいただけますでしょうか。ジェスチャーとか同意等でお願

いします。

(専門委員同意)

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、本件については、安全性上問題がないという判断になりましたので、引き続き、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局から説明をお願いします。

〇〇〇 それでは、評価書案について御説明をさせていただきます。

右上に資料と書かれた評価書を束ねた冊子がございますので、お手元に御準備ください。

1ページ目からが本品の評価書案になります。まず6ページ目を御覧ください。「Ⅰ. 評価対象食品の概要」でございます。コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP51291) は、*Pseudomonas chlororaphis*に由来する *ipd072Aa* 遺伝子、*Streptomyces viridochromogenes*に由来する *pat* 遺伝子及び *Escherichia coli* (K-12株) に由来する *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、IPD072Aaタンパク質を発現することでコウチュウ目害虫抵抗性が、PATタンパク質を発現することで除草剤グルホシネート耐性が、PMIタンパク質を発現することで形質転換体の選抜マーカーが付与されます。

続きまして、48行目から「Ⅱ. 食品健康影響評価」でございます。

第1の1、既存品種はイネ科トウモロコシ属に属するトウモロコシのデント種PHR03系統でございます。

第1の2～8については記載のとおりでございます。

8ページの116行目から、以上1～8より、DP51291の安全性評価においては、既存のトウモロコシが比較対象であると判断しております。

119行目から第2の「1 新たに付加される形質又は改変される形質」は、DP51291では、IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質が産生されることとございます。

「2 利用目的」は、DP51291は、ウェスタンコーンルートワーム等のコウチュウ目害虫に殺虫活性を有することにより抵抗性を示し、除草剤グルホシネートの影響を受けずに生育することができるということです。

「3 利用方法」は、従来のトウモロコシと変わりません。

142行目からの「4 安全性において検討が必要とされる相違点」でございますが、DP51291は、*ipd072Aa* 遺伝子、*pat* 遺伝子及び *pmi* 遺伝子を導入して作出されており、IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質を産生する点でございます。

9ページの5に記載しておりますが、既存品種以外のもは比較対象としてございません。

150行目からの「第3 挿入DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築に関する事項」は記載のとおりでございます。

175行目から「3. 挿入DNAの供与体に関する事項」です。

(1) の名称、由来及び分類に関する事項は記載のとおりです。

180行目から (2) 安全性に関する事項ですが、3つの遺伝子の供与体である *P.*

chlororaphis, *S. viridochromogenes*, *E. coli* (K-12株) は、それぞれヒトへの病原性、アレルギー誘発性、毒素産生性は知られていないとしております。

続きまして、10ページに行っていただきまして、190行目から「4 導入遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項」でございます。

(1) の遺伝子産物の機能に関する事項の①遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能です。まずaとして、*ipd072Aa*遺伝子の記載をしてございます。*ipd072Aa*遺伝子はIPD072Aaタンパク質をコードする選択的殺虫タンパク質であり、ウエスタンコーンルートワーム等のコウチュウ目昆虫の中腸上皮細胞に存在する受容体に特異的に結合し、中腸上皮細胞を破壊することにより殺虫活性を示すと考えられております。

本タンパク質を摂食したウエスタンコーンルートワームにおいては、本タンパク質が中腸上皮細胞の内腔側に局在し、その後中腸上皮細胞が破壊されることが確認され、中腸上皮刷子縁膜小胞を用いた結合試験の結果、本タンパク質がウエスタンコーンルートワームの中腸上皮刷子縁膜小胞に結合することが確認されてございます。一方、本タンパク質が殺虫活性を示さないチョウ目昆虫であるヨーロッパアワノメイガの中腸上皮刷子縁膜小胞を用いた場合には、本タンパク質の結合性は認められませんでした。

IPD072Aaタンパク質の殺虫活性について、コウチュウ目10種、チョウ目4種の生物種に対して評価した結果、標的昆虫であるウエスタンコーンルートワームに特異的であると考えられました。ウエスタンコーンルートワーム以外のコウチュウ目昆虫については100ppmにおいては生存率への影響は認められず、100ppmを超えた場合には種によって生存率への影響が認められました。チョウ目昆虫については試験に用いた本タンパク質の最大濃度である1,000ppmにおいても生存率への影響は認められませんでした。

bの*pat*遺伝子、cの*pmi*遺伝子は、記載のとおりでございます。

11ページの228行目からdとしてIPD072Aaタンパク質のヒトへの影響の考察を記載してございます。IPD072Aaタンパク質のヒトへの影響を考察するため、ヒト腸管上皮細胞であるT84及びCaco-2を用いて、IPD072Aaタンパク質ばく露による細胞の生存率への影響を分析してございます。5µg/mlのIPD072Aaタンパク質溶液に両細胞腫を48時間ばく露した結果、いずれの細胞についても生存率への影響は認められませんでした。

こちらの記載内容について、先生方に御議論をいただきたいと考えているのですが、IPD072Aaタンパク質は既に安全性評価が完了している品目で用いられたタンパク質でございまして、この後の評価書の21ページにも記載している人工胃腸液試験や加熱処理試験などの物理化学的処理も省略可能なタンパク質でございます。こういったタンパク質について、ヒト腸管上皮細胞の結果まで記載する必要があるかどうか、御議論いただければと考えております。

続きまして、235行目から②発現タンパク質と既知毒性タンパク質との構造相同性でございまして、IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質と既知毒性タンパク質の相同性の有無を確認するため、毒性タンパク質データベースを用いてE-valueが1×

10⁻⁴を指標として検索を行った結果、既知の毒性タンパク質との間に相同性は認められませんでした。

(2) の遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子のうち、抗生物質耐性マーカー遺伝子に関する事項でございます。導入用プラスミドPHP74638のベクターバックボーンにはテトラサイクリン耐性遺伝子及びスペクチノマイシン耐性遺伝子が含まれていますが、ベクターバックボーンはトウモロコシDP51291中に導入されません。

(3) の導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に関する事項については、記載のとおりとなっております。

続いて、12ページに行っていただきまして、272行目から「5 そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項」でございます。こちらの記載内容についてですが、要旨の説明の際に少し触れました既存品種の細胞に導入してもゲノムに挿入されない遺伝子を用いておりまして、その遺伝子から産生されるタンパク質がある場合は、その由来及び機能並びに安全性が明らかであることということを記載する項目となっております。

中間系統作出のために既存品種の細胞に挿入されたプラスミドの各遺伝子の由来、また各遺伝子が発現するタンパク質の機能、安全性をこちらの項目に記載いたしました。274行目からはどのプラスミドがどの遺伝子を発現するか、また、その遺伝子の由来を記載しており、また、一過的な産生である旨を記載してございます。

283行目からは、各遺伝子が発現するタンパク質の機能について記載しております。

さらに、これらの遺伝子はいずれもトウモロコシDP51291のゲノムに挿入されていないことを確認してございます。こちらについて現行の記載で十分とするか、もしくは、例えば1回目の形質転換で導入される *ip3-h5* 遺伝子が発現する *cry3Aa* タンパク質や抗生物質耐性遺伝子なども記載する必要があるかどうか御議論いただきたく存じます。

続きまして、299行目から「6 ベクターへの挿入DNAの組込方法等に関する事項」と、13ページ、315行目から「7 構築されたコンストラクトに関する事項」は記載のとおりでございます。

続きまして、14ページ、「第4. 遺伝子組換え体の作出及び遺伝子組換え栽培系統に関する事項」でございます。

1の(1) 遺伝子の既存品種への導入方法に関する事項でございます。トウモロコシDP51291の作出は、3回の形質転換を経て行われています。1回目の形質転換は非組み換えトウモロコシPHR03系統にプラスミドPHP50742のT-DNA領域であるLP配列をアグロバクテリウム法により導入しております。LP配列中には *pmi* 遺伝子発現カセット及び *pat* 遺伝子発現カセット並びに *Bacillus thuringiensis* 由来の改変遺伝子を導入した形質転換体のうちゲノムDNAにLP配列が1コピー挿入されており、かつ、PHP50742由来の意図しないDNA断片が含まれていない1個体を選抜し、CTVA2023-1系統、以下「中間系統1」としてしております。

2回目の形質転換は、中間系統1の細胞に、パーティクルガン法により5種類のプラスミドを導入しております。

PHP5096から産生されるFLPタンパク質により、PHP46438中のFRT1及びFRT87と中間系統1のゲノムDNAに挿入されたLP配列中のFRT1及びFRT87の間で部位特異的組換えが誘導され、LP配列中の*pmi*遺伝子発現カセット及び*pat*遺伝子発現カセットを含む領域がPHP46438由来の*npt II*遺伝子発現カセットを含む領域に置換されました。

さらに、PHP16072から産生されるCreタンパク質により、中間系統1のゲノムDNAに挿入されているLP配列中に2か所存在する標的配列*loxP*の間で部位特異的組換えが誘導され、2か所の*loxP*の間に位置する*ip3-h5*遺伝子発現カセットを含む領域がLP配列から除去されました。

得られた形質転換体のうち、LP配列が意図したとおりに改変され、かつ、用いたプラスミド由来の意図しないDNA断片が含まれていない1個体を選抜し、CTVA2023-2系統、以下「中間系統2」と申しますが、そういった命名をいたしております。

なお、ほかの4種類のプラスミドは中間系統1の細胞への一過的な導入を目的としており、ゲノムDNAの挿入を意図したものではありません。導入した5つのプラスミド由来の意図しないDNA断片がゲノムDNA中に挿入されていないことは、DP51291のT1世代においても改めて確認しております。

15ページの363行目から3回目の形質転換では、中間系統2の細胞に導入用プラスミドPHP74638をアグロバクテリウム法にて導入しております。PHP74638のT-DNA領域は*Flp*遺伝子発現カセットを含んでおり、FLPタンパク質が産生されます。その結果、PHP74638のT-DNA領域中のFRT1及びFRT87と既に中間系統2のゲノムDNAに挿入されているLP配列中のFRT1及びFRT87との間で部位特異的組換えが誘導され、PHP74638のうち挿入DNA領域だけがゲノムDNA上のLP配列に挿入されました。

377行目から(3)コピー数及び挿入近傍配列に関する事項でございます。トウモロコシDP51291のゲノムに挿入された挿入DNAのコピー数及びベクターバックボーンの有無を確認するために、Southern by Sequencing分析を行った結果、平均リード深度が92~136の範囲であったことから、信頼性に問題はなかったとしております。PHP74638由来の配列として完全長の挿入DNA領域の配列のみが検出され、その5'末端及び3'末端は、それぞれLP配列と意図したとおりに接合していることが確認されました。LP配列の5'末端及び3'末端と既存品種ゲノムとの接合領域がそれぞれ1か所特定されております。このことから、DP51291のゲノムDNAには、PHP74638由来の挿入DNA領域が意図したとおりに1コピー挿入されており、完全長の*ipd072Aa*遺伝子発現カセット、*pat*遺伝子発現カセット及び*pmi*遺伝子発現カセットがそれぞれ1コピー挿入されることが確認されました。

さらに、中間系統1及び中間系統2の作出において用いられた全てのプラスミドに由来する意図しないDNAがDP51291に残存していないことを確認しております。

16ページに続きます。トウモロコシDP51291の挿入DNAの近傍配列の由来を確認する

ために、サンガー法による塩基配列解析を行い、トウモロコシDP51291のLP配列挿入部位の5'側近傍配列及び3'側近傍配列の塩基配列を決定し、これらの近傍配列をトウモロコシのゲノムDNA配列データベースとblastnを用いて照合しております。その結果、5'側近傍配列と相同性を示す配列は同定されず、3'側近傍配列については、最も相同性の高い配列として1,158塩基中829塩基の領域が2番染色体の配列と99%一致しておりました。しかしながら、当該領域については、2番染色体上のほかの場所、5番染色体及び9番染色体の配列とも同程度の相同性を示したことから、挿入部位の特定には至りませんでした。

原因として、公的データベースに登録されているトウモロコシのゲノムDNAがB73系統由来であり、DP51291の既存品種であるPHR03系統とは異なる品種であることが考えられましたので、5'側近傍配列及び3'側近傍配列を社内で保有するPHR03系統のゲノムDNA配列と改めて照合した結果、いずれもPHR03系統の1番染色体の配列と完全に一致しました。このことから、挿入部位の近傍配列は既存品種であるトウモロコシの1番染色体由来であると考えられ、さらに、LP配列を挿入することにより既存品種の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'側近傍配列及び3'側近傍配列について、NCBIヌクレオチドデータベース及びNCBI ESTデータベースを用いたblastnによる検索とNCBI非重複タンパク質データベースを用いたblastxによる検索を行ったところ、いずれの検索においてもE-valueは10未満とし、得られた配列について5'側近傍配列及び3'側近傍配列との一致度及び一致した配列の長さ等を評価した結果、DNAの挿入によって既知の内在性遺伝子は損なわれていないと考えられました。

17ページの425行目、(4) 遺伝子組換え栽培系統における導入遺伝子の安定性に関する事項については、記載のとおりでございます。

431行目から(5) ORFの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項でございます。トウモロコシDP51291に導入されたDNAの全体及びその5'側近傍配列及び3'側近傍配列との接合部位において目的遺伝子をコードするORFを除く意図しないORFが生じていないことを確認するために、6つの読み枠においてORF検索を行っております。その結果、終止コドンから終止コドンまでの連続する8アミノ酸以上のORFが目的タンパク質をコードするORFを除いて771個検出されました。

これらのORF産物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、毒性タンパク質データベースを用いてE-valueが 1×10^{-4} を指標としてblastp検索を行った結果、既知毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。

また、既知アレルゲンとの相同性については、アレルゲンデータベースを用いてE-valueが100未満であることを指標として、連続する80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を有する配列及び連続する8アミノ酸以上の配列が一致する配列を検索しております。その結果、既知アレルゲンと80アミノ酸残基当たり35%を超えるORFが5個検出されました。また、既知アレルゲンと連続する8アミノ酸以上の一致を有するORFが3個検出されました。これらのORFが転写及び翻訳される可能性について検討しております。

451行目から記載のDP51291_235がコードするORF産物が、「仮に転写及び翻訳される場合、翻訳開始コドンであるメチオニンはC末端から19番目のアミノ酸となるため」という修正案を〇〇〇よりいただきました。

460行目から記載のDP51291_341がコードするORF産物についても、「翻訳開始コドンとなるメチオニンが」と〇〇〇から修正案をいただいております。

そのほかのORFについては、記載のとおりでございます。

19ページの499行目にまとめの記載がございますが、以上、DP51291に挿入されているDNAの全体及びその両末端近傍配列との接合部位に生じるORFを検討した結果、意図しないORFから毒性タンパク質またはアレルゲンが産生される可能性は低いと考えられました。

19ページの504行目から「2. 遺伝子産物の遺伝子組換え栽培系統における発現部位、発現時期、発現量に関する事項」についてと、20ページの514行目から「3. 遺伝子産物のタンパク質摂取量が有意な量を占めるか否かに関する事項」、524行目から「4. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項」の(1)、(2)につきましては、記載のとおりでございます。

21ページの544行目から(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性に関する事項でございます。DP51291で産生されるIPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質のそれぞれをコードする導入遺伝子の塩基配列は、いずれも既に我が国における食品としての安全性審査を経ているDP23211に導入された遺伝子と同一でございます。したがって、DP51291及びDP23211において、これらの遺伝子から産生されるそれぞれのタンパク質のアミノ酸配列も同一であると考えられます。

以上のことから、DP51291で産生されるIPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質については、DP23211における評価結果を適用することが可能であり、その物理化学的処理に対する感受性に起因してアレルギーが誘発される可能性は低いと考えられます。それらの要約は①からの記載のとおりでございます。

22ページの580行目、(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記載でございます。

要旨の御説明の際にPMIタンパク質とカエルの α -パルブアルブミンの記載について評価済みの品目であるトウモロコシDP915635と同様の記載に修正いただいた箇所に該当する箇所でございます。評価書の記載も評価済み品目であるトウモロコシDP915635と同様の文面に修正してございます。記載は御覧のとおりでございます。

続きまして、23ページの612行目から遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項のまとめとして、上記(1)から(4)まで及び前項3から総合的に判断し、IPD072Aaタンパク質、PATタンパク質及びPMIタンパク質については、アレルギー誘発性の可能性は低いことを確認したとしております。

続きまして、617行目、「5. 遺伝子組換え栽培系統の代謝経路への影響に関する事項」

と635行目からの「6. 既存品種との差異に関する事項及び遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項」の(1)は記載のとおりでございます。

24ページの677行目、(2) 遺伝子組換え栽培系統に付与される形質の分類に関する事項でございますが、トウモロコシDP51291は、導入された遺伝子によって、既存品種の代謝系には影響なく、害虫抵抗性及び除草剤耐性の形質が付与されるものであるとしてございます。

続きまして、681行目から「7. 諸外国における認可、食用等に関する事項」でございます。米国においては、2024年7月にFDAにより食品及び飼料としての安全性の確認が終了しております。カナダにおいては、2024年7月にカナダ保健省により食品としての利用が、カナダ食品検査庁により飼料としての利用が承認されております。オーストラリア・ニュージーランドにおいては、2024年2月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関により食品としての利用が承認されております。欧州においては、EFSAに対して食品及び飼料としての安全性審査を申請中でございます。

25ページの695行目から第5といたしまして、第1から第4までにより、安全性の知見が得られているという結論にしております。

評価書の説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

評価書案の審議に入りたいと思います。2か所議論しておきたいところがありますので、1つ目は、評価書案の12ページの272行目、「そのほか導入遺伝子の機能並びに発現タンパク質の性質及び機能に関する事項」のところでございますけれども、こちらは組換え体作出において途中経過で用いたプラスミド等がある場合に、そのプラスミドに載っている遺伝子等について記載するようなことを意図した項目で新規につくった項目となります。念頭に置いたのは、実はこのコルテバさんのこういった系統のことを念頭に置いてつくった項目になるのですけれども、非常に数が多いのと、それから、かなりいろいろな遺伝子が実は載ってしまっているということで、事務局からどこまで載せますかということの御相談でございます。

私の御提案としましては、一般の方がパブリックコメントで見た場合に、このプラスミドは一体何に使っているのですかということが分かるのが大事かと思っておりますので、各プラスミドの使用目的に沿った遺伝子やタンパク質についてはここに記載してはどうかというのが御提案です。全部載せると結構な量で、多分、コンストラクトをつくるときに適当に入ってきたような遺伝子、流用してきている遺伝子が結構あるようなので、その目的に沿ったものをここに掲載してはどうかと思っております。

その形に添って、事務局のほうで今回修正を少し入れていただいております。この点についてコメントがありましたら、皆様のお考えをいただきたいと思っております。どうでしょうか。

〇〇〇、どうでしょうか。

〇〇〇 それぞれのプラスミド等の使用目的がはっきりするように書くということで、それ以外があると多分逆に分かりにくくなるのかなと思いますので、それでいいのかなと思います。

以上です。

〇〇〇 主に植物系の先生方に聞こうと思うのですが、〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 全部書くと大変だということはよく分かりますので、目的に沿った書き方でよろしいと思います。ありがとうございます。

〇〇〇 〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 これは既に分かっているものを持ってきているわけですね。分かっているというのは、前に使ったことがあるもの。全部書くと大変というのは、分かっているものが入っていたらいけないので、聞きました。

〇〇〇 申請書では全部確認するのですが、評価書に何を載せるかというところ。

〇〇〇 評価書はそれでいいと思います。

〇〇〇 申請書には表の形式で全部書いてもらうようになっていますので、それは我々が確認するのですが、

そのほか御参加いただいている先生方、いかがでしょうか。よろしいですかね。一応議事録に残しておきたいということで、ここに載せる項目としては、登場してきたプラスミドとベクター、コンストラクトについて、何の目的で使ったかが分かるようなものについて、ここに記載するという形で整理させていただきたいと思います。

それから、もう一か所ございまして、評価書の11ページの228行目のdの腸管上皮細胞を用いた試験のことをここに記載するかどうかというところでございます。こちらについては、あってもいいかなという気持ちもある反面、通常の審査項目ではないので、ないほうがいいのかという気持ちもございまして。私はちょっと考えてみたのですが、21ページに評価済みのものとアミノ酸配列も同一であると考えられるという文章が出てくると思うのですが、10ページのこの項目の最初のところに、今回使ったタンパク質は評価済みのものと一緒ですということを書いておいてもらえば、この最後のdのところは抜いてもいいかなという気はしているのですが、事務局、どうでしょうかね。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、一応確認ですが、10ページの4の(1)の①のa、*ipd072Aa*遺伝子のところの説明で3パラ目にタンパク質の殺虫活性の説明がありますが、そのさらに下の最後のところに書くイメージでしょうか。

〇〇〇 4の(1)の①の下に文章を差し込んで、今回使ったのはみんな同一ですとして、a、b、cという形ではどうかなと思ったのですが、

〇〇〇 了解しました。では、PATタンパクとかPMIタンパクも含めて同一であることを①の下に書いてしまうということですね。

〇〇〇 そうです。そうしたらdを抜いてもいいかなと思うのですが。

〇〇〇 評価書案の修正に関しては、対応は可能ですが、評価書自体はこの専門調査会の中で作るものですので、専門委員の先生方が、そこに書けば〇〇〇がおっしゃるとおりこのdは不要ということで御判断いただければ、事務局で修正案を作成する対応をします。

〇〇〇 というのが私の御提案なのですけれども、皆様の御意見をいただきたいと思いません。この点については、〇〇〇、〇〇〇辺りの御意見をいただきたいと思えます。

〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 ここはヒトへの影響の考察ということですので、生物的影響が項目としてあってもいいような気はするのですけれどもと思えます。

〇〇〇 〇〇〇です。

1つ質問があるのですが、前回、この細胞を使った解析を依頼した場合というのがどういった状況だったのか、そういったことがあったようなことを記憶しているのですけれども、その際にはどういったことを依頼されたのかということをや一度教えていただけないでしょうか。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、事務局から経緯を御説明させていただいてよろしいでしょうか。

〇〇〇 お願いします。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、ありがとうございます。前回、DP23211のトウモロコシを審議した際、今回のIPD072Aaタンパク質というのは新規タンパク質でした。これまで審議したことがない初めてのタンパク質だったということでございます。例えばCryタンパク質のように世の中でいっぱい使われているというものでもありませんでしたので、この新規のタンパク質が本当にヒトに対して影響を及ぼさないのかという考察をするための情報として、やはりヒトの腸管上皮細胞による試験の結果を確認する必要があるのではないかという専門調査会の中での決定がありまして、指摘事項として、具体的にこういう試験をしてくださいということを申請者に求めたものでございます。それを受けて申請者が試験をしてきたという経緯がございまして、そういったものについては評価書の中に書き込んでいったというところでございます。

先ほど事務局からも説明したとおり、今回は前回の1例があるので、全くの新規のタンパク質ではないという位置づけになっているのかなと考えております。ヒトへの影響ということでここに残していくことになった場合、それを今後、IPD072Aaタンパク質が使われる場合、いつまで残すのか。IPD072Aaタンパク質についてはずっとこれを求めていくことになるのか。そういったことにもなりますので、今回の評価書に書くかどうかというところで皆様の御意見をいただきたいと考えているところでございます。

〇〇〇 ということです。〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 御説明ありがとうございます。そういう経緯があったということはよく分かりました。その上で、既製品のほうにも以前、承認されたものについては今後、承認事例が

あるとそのまま承認することが可能であるというふうになっていると私の中では認識しているのですけれども、それであれば特に今回は必要ないのではないかと考えております。

以上です。

〇〇〇 毎回書くと、もう一つ問題があって、ほかのタンパク質についてこういうことをやらないのですかという、パブリックコメントをかけたときの要らぬ質問を呼び起こす。要らぬというわけではないのですが、安全性が確認されているものについて、また新しい質問を呼び起こすような形にもなりかねないかなと思いますので、〇〇〇、どうでしょうか。そういうことなのですが。

〇〇〇 もう既にこういう報告があるということで、この評価書としては新しいことだけを書くということでありますと、既存の報告ということになりますので、抜いてしまっても確かなよろしいかと思えます。

〇〇〇 ほかの先生、コメントがありましたらよろしくお願ひします。よろしいですかね。

では、今回a、b、cは全部使い回しですので、そのことを分かるようにしていただいて、dのところは抜くということにしたいと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。そのように修正させていただきます。

〇〇〇 それでは、評価書案全体について何かコメント等がありましたら、お願いいたします。なお、細かい字句等の修正については、後ほど事務局にお寄せください。

よろしいですかね。〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 全体について、今の*ipd072Aa*遺伝子に限らず、既に安全性を確認したものだということを言うときに、これと同じものができていることを認めたのでというのを評価書に一言入れておくことが重要かと思えます。

〇〇〇 アミノ酸配列等は同じであるということが分かるようにということですね。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 了解しました。

〇〇〇 それでは、評価書案についてはおおむねこれで、少し修文はありますけれども、その点については後ほど私と事務局のほうで確認いたしますということで、一任していただきたいと思うのですが、よろしいでしょうか。

(専門委員同意)

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、修正については、後ほど私のほうで確認いたしまして、その後、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思えます。

トウモロコシDP51291の食品のほうについては、これで終了とさせていただきます。

続きまして、飼料のほうに入りたいと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。

お手元に「遺伝子組換え飼料コウチュウ目害虫抵抗性及び除草剤グルホシネート耐性トウモロコシ (DP51291) の安全性評価について」という資料を御準備ください。登庁いた

だいている先生方につきましては、緑の紙ファイルの緑色のタブが挟んであるページ以降となっております。

ページをめくっていただきまして、1ページ目を御覧ください。品目名、本系統の特徴は食品と同様でございます。

2ページ目の③使用方法は、従来のトウモロコシと変わりません。

その下の「2. 遺伝子組換え飼料としての安全性」でございます。「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」の3により、①から③に当たるかどうかを考慮して判断してございます。

2ページ目の下から2つ目のパラグラフの記載になりますが、一般的に、挿入された遺伝子もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行するという事は報告されておらず、本系統に付与された形質は害虫抵抗性及び除草剤耐性であることから、①、②、③の可能性も考えにくく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物には、通常、安全性上の新たな問題は生じないと考えられるということで、これらの飼料を摂取した家畜に由来する畜産物を摂取することが、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられるとしてございます。

申請要旨の説明は以上となります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請書について、先生方からの御意見をいただきたいと思えます。

既に一回審査したような内容という形になっておるかと思えますが、よろしいですかね。

それでは、同意のジェスチャー等をいただきたいと思えます。

(専門委員同意)

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、本件については、特に安全性上問題がないということですので、評価書案の審議に入りたいと思えます。

事務局からお願いいたします。

〇〇〇 評価書案の説明をさせていただきます。

右肩に資料と記載のあります評価書案を束ねました資料の29ページを御覧ください。29ページ目からが本資料の評価書案になります。

めくっていただきまして、31ページ目を御覧ください。「Ⅰ. 評価対象飼料の概要」につきましては、記載のとおりでございます。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」につきまして、1及び2につきましては記載のとおりでございます。

1及び2を考慮したところ、トウモロコシDP51291に新たな有害物質が生成されることはないため、肉、乳、卵等の畜産物中に新たな有害物質が移行することは考えられません。また、遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や、家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられません。

以上のことから、改めて遺伝子組換え食品の安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物については、人の健康を損なうおそれはないとしたいと考えてございます。

説明は以上でございます。

〇〇〇 それでは、ただいまの評価書案について、御意見、コメントを賜りたいと思います。

よろしいですかね。

それでは、この評価書案でよろしいかどうか、皆様の御同意をいただけるかどうか、ジェスチャーをお願いいたします。

(専門委員同意)

〇〇〇 それでは、この評価書について、食品安全委員会のほうに報告したいと思います。

以上で、トウモロコシDP51291の飼料のほうの審議は終了となります。

ここで〇〇〇のほうは御退室されますね。どうもありがとうございました。

では、数分間お休みです。

(休憩)

〇〇〇 それでは、「LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ」の審議を行いたいと思います。

事務局で説明をお願いしたいと思います。

〇〇〇 それでは、申請書の内容について御説明をさせていただきたいと思います。

今回、今お配りしております申請書、申請要旨につきまして、多数事前の修正が入っております。そこで、これからの御説明につきましては、机上配布資料2-2としてお配りしております修正後の申請要旨をお開きいただきまして、こちらを基に御説明をさせていただければと存じます。

また、本申請品目につきましては、これから概要を御説明いたしますけれども、過去、安全性評価が終了している品目と共通する項目が多くございますので、そのことについて一覧として分かるように机上配付資料2-1として表にまとめたものも配付させていただいております。こちらも御参考までに御覧いただきながら御審議いただければと思います。

それでは、机上配付資料2-2の中身について御説明を始めさせていただきます。

6ページからお願いいたします。「第1 安全性評価において比較対象として用いる添加物の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」でございます。

まず、従来の添加物でございます。今回の申請において比較対象として設定されている従来の品目ですけれども。

すみません。資料に不備がありました。ちょっとお待ちください。

〇〇〇 申し訳ございません。会議室に準備していた資料に不備がございました。事前に

送らせていただいている資料については正しいものが送られているということですので、ウェブで参加の先生は大丈夫でございます。会場に来ていただいている先生の資料に不備がございますので、ちょっとだけお時間をいただいてもよろしいでしょうか。すみません。お待ちください。

〇〇〇 申し訳ありません。ページ数のずれ等、もろもろあるかもしれませんが、この緑色のつづりのほうで説明を始めさせていただきます。不備がありまして大変申し訳ございませんでした。

それでは、こちらで説明をさせていただきます。

改めまして、比較対象として設定されている従来の添加物でございますけれども、本品目、2019年に食品安全委員会において評価が終わっております「BML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ」という品目が比較対象となる従来の添加物として設定されているものでございます。

そして、6ページ下のほうから7ページにかけて製造方法について記載されてございます。製造方法については、7ページの図1に記載のとおりでございます。

また、7ページ下のほう、用途及び使用形態でございますけれども、このプルラナーゼという酵素自体につきましては、アミロペクチン、グリコーゲン、デキストリン、プルランなどの α -1,6グルコシド結合の加水分解反応を触媒する、デンプンの枝切り酵素ということでございます。

本プルラナーゼにつきましては、ビール及びデンプン糖のシロップ製造の用途を想定しているということでございます。

続きまして、8ページをお願いいたします。摂取量についてでございます。摂取量ですが、ここの数字自体に修正が入ってございます。緑色の冊子では、ビールの平均摂取量が64.2と記載されてございますけれども、これが76.4の誤りでございました。

この摂取量の推計につきましては、ビールとシロップの消費量から推計されてございまして、それぞれの製造工程において、それぞれ100%残存するというふうに仮定をして計算されましたところ、9ページの下に最後の合計値が出ておりますけれども、こちらの数字が先ほどのパーセンテージに変わりましたので、正しくは、0.028mg TOS/kg 体重/日という数字になってございます。

続きまして、宿主及び導入DNAについて10ページでございます。

宿主の種名、株名等及び由来でございます。本組換え体の宿主でございますが、*Bacillus licheniformis* BRA7株というものになってございます。

続いて、DNA供与体の種名、株名または系統名及び由来でございますけれども、本申請のプルラナーゼ487 TPUを生産するLDN487株の染色体に組み込んだDNA断片なのですけれども、このプルラナーゼをコードする遺伝子につきましては、*PULm104*株となっております。これの供与体につきましては、*Bacillus deramificans*の野生株でございますT89.117D株というものになってございます。

この *B. deramificans* T89.117D株につきましては、比較対象となっております
「BML780PULm104株を利用して生産されたプルラナーゼ」のDNA供与体として用いら
れているものでございます。

ちょっとページが飛びまして、17ページをお願いいたします。遺伝子組換え添加物の性
質及び用途等に関する事項でございます。この遺伝子組換え添加物、有効成分がプルラナ
ーゼとなっております、こちらは従来のプルラナーゼと同様となっております。そし
て、製造方法につきましても、従来のプルラナーゼの製造方法と同様であるというふうに
説明されてございます。

次のページをお願いいたします。用途及び使用形態でございます。こちらも従来の添加
物プルラナーゼと同様であるとの説明がされてございます。

続いて、19ページをお願いいたします。有効成分の性質及び従来の添加物との比較でご
ざいます。こちらの有効成分、従来の添加物との比較も、同じプルラナーゼとなってい
ます。

そして、このプルラナーゼにつきましても、アミロペクチン、デキストリン、グリコー
ゲン、プルランなどの α -1,6-グルコシド結合の加水分解反応を触媒するためのものとい
うことでございます。

その下、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点でございます。こちらにつきまし
ては、ここも多数修正が入っているのですけれども、遺伝子組換え添加物と従来の添加物
はいずれも同じアミノ酸配列を持つ、同じ遺伝子からコードされるプルラナーゼとい
うことございまして、全く違いはないものということで説明がされてございます。

続きまして、20ページをお願いいたします。組換え体と宿主の違いでございます。組換
え体と宿主の差異でございますけれども、今回、遺伝子組換え操作を行った際、宿主のゲ
ノムの遺伝子の複数の遺伝子に欠失操作を行っております。その行われた欠失操作が5つ
記載されているところがございますけれども、そのうちの上から4つ、アミラーゼの生産能
に関する遺伝子、胞子の形成能に関する遺伝子、アルカリ性プロテアーゼの生産能に関
する遺伝子、そしてグルタミン酸特異的プロテアーゼ生産能に関する遺伝子、この4つの遺
伝子の欠失につきましては、比較対象となっているBML780株を用いて生産されたプロテ
アーゼにおいても同様の変異が導入されてございます。

本品目におきましては、5番目にございますクロラムフェニコールアセチルトランスフ
ェラーゼ生産能、こちらの遺伝子が欠失したものが差となっております。このクロラム
フェニコール耐性遺伝子につきましては、前の2019年の比較対象の株においても一度欠失
しておりますけれども、当時の株では、欠失後に選択マーカーとして再導入されてござ
いました。本株におきましては、このクロラムフェニコール耐性遺伝子につきましては、欠
失したまま生産株としたということでございます。

次のページからの「第2 宿主に関する事項」につきましては、記載のとおりでございま
す。

23ページをお願いいたします。

少々お待ちください。

大変お待たせいたしました。ただいま机上配付資料2-2の正しいものが皆様のお手元に届きましたので、これからの御説明につきましては、先ほどページのずれ等がございましたので、机上配付資料2-2で改めてこれから先を御説明させていただければと思います。

机上配付資料2-2を改めてお手元に御用意いただければと存じます。

よろしいでしょうか。そうしましたら、机上配付資料2-2、23ページから説明に戻らせていただきます。「第3 ベクターに関する事項」から御説明をさせていただきます。

今回の遺伝子組換え添加物の生産菌株でございますLDN487株につきましては、宿主のBRA7株の染色体遺伝子に欠失変異を導入して改変した株に、さらに*lysA*遺伝子座、*serA*遺伝子座、この2つへの欠失変異を導入し、これら2つの欠失した遺伝子座に*PULm104*遺伝子発現カセットを組み込んで構築しているということでございます。

この遺伝子の欠失工程において使用されたベクターにつきましては、24ページから27ページまでの4ページの間において図示、説明等させていただきます。

このベクターにつきましては、記載のとおりでございますが、24ページをお開きください。LDN487株を構築する際の構築操作についてでございますけれども、24ページ下のほうの3行に記載がございますけれども、最終的な生産株を構築する際、*PULm104*遺伝子発現カセットを導入する際は、ベクターを用いずに直鎖・精製したDNA断片として直接細胞へ導入したという説明がさせていただきます。

それでは、ページ飛びまして、30ページをお願いいたします。それぞれの欠失導入ベクター等に用いたプラスミドの薬剤耐性遺伝子に関する事項でございます。これら欠失導入ベクターに用いたプラスミドにつきましては、もともと原料となったプラスミドが持っておりますアンピシリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、カナマイシン耐性領域等を持っておりますけれども、これらの耐性遺伝子の有害性は報告されていないということでございます。

その次、3-2-(5)でございますけれども、伝達性に関する事項といたしまして、これら用いられたベクターにつきましては、伝達性はないと考えられるというふうに記載させていただきます。

続きまして、30ページ下、欠失型遺伝子の供与体についてでございます。今回欠失操作に用いられた各ベクターの構築に用いられました各遺伝子座の遺伝子につきましては、宿主のそれぞれの欠失させたい遺伝子を用いて作成したということでございます。

また、次でございますけれども、31ページ、*PULm104*遺伝子の供与体につきましては、*B. deramificans T89.117D*株ということでございます。

続いて、31ページの下のほう、安全性に関する事項でございます。欠失型遺伝子については、こちらに記載のとおりでございます。

32ページをお願いいたします。*PULm104*遺伝子の供与体についてでございます。この

*PULm104*遺伝子の供与体である *B. deramificans* T89.117D株につきましては、まず比較対象のBML487*PULm104*株において同タンパク質をコードする遺伝子の供与体として用いられているということでございます。

また、この *deramificans* につきましては、第10版食品添加物公定書におきましてプルラナーゼの生産菌として記載されているものであるということでございます。

また、同菌につきましては、国立感染症研究所及び日本細菌学会による分類において、バイオセーフティレベル2、3には分類されておらず、バイオセーフティレベル1の微生物として判断されるということでございます。

続きまして、35ページをお願いいたします。*PULm104*遺伝子発現カセットの作製過程についてでございます。*PULm104*遺伝子発現カセットにつきましては、宿主の *lysA* 遺伝子及び *serA* 遺伝子を一度欠失させまして、それぞれ●●●ように作製されているということでございます。

まず、*lysA* 遺伝子のほうから説明させていただきます。*PULm104* 遺伝子につきましては、比較対象の *PULm104* をコードしている遺伝子と同一であるということございまして、ダニスコ社の菌株ライブラリーで保管されている全長型プルラナーゼの生産菌株、これは製品名 *Optimax* となっているのですけれども、これが2001年3月に官報に掲載された品目ということでございますが、この生産菌株の染色体上のプルラナーゼ遺伝子をPCRで増幅し、転写翻訳後に、N末端側の●●●を欠失させるという変異を導入して作製されたものを使用されたということでございます。●●● そうしてつくられた断片に改良型のP3プロモーターを結合いたしまして、*B. subtilis* のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子の5'末端領域に隣接する非翻訳領域ですとか、シグナルペプチドコード配列などを連結し、*PULm104* 遺伝子の発現カセットということにしてございます。この *PULm104* 遺伝子発現カセットに加え、*lysA* 遺伝子の発現カセット領域、そして、この●●●の上流領域及び下流領域を結合いたしまして、●●●の *PULm104* 遺伝子発現カセット断片というものが作製されてございます。●●● 続いて、*serA* 遺伝子座に向けたものでございますが、37ページから記載がございまして、こちらの *serA* 遺伝子座用につきましても、●●●と同様でございまして、*PULm104* 遺伝子発現カセット、そして●●●の上流領域、下流領域及び *serA* 遺伝子発現カセット、それぞれを使用されてございます。

シグナルペプチドコード配列までの配列がプライマーを用いて *amyL* 遺伝子ターミネーターから *serA* 遺伝子発現カセットを含めて、*serA* 遺伝子座の下流領域をプライマーを用いてそれぞれ増幅したということございまして、これらの手順の後、38ページの上のほうでございますけれども、この図のとおり、それぞれ2つの領域を *PULm104* 遺伝子の両端に接続した●●●の *PULm104* 遺伝子発現カセットを含むDNA断片について、プライマーを用いて fusion PCR で組み合わせて作製したということでございます。

続きまして、40ページをお願いいたします。4-2-(3)挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。*PULm104* 遺伝子につきましては、比較対象である *PULm104* をコードする遺伝

子と同一でありまして、この *PULm104* 遺伝子のカセットの組み込みには *lysA* 遺伝子発現カセットと *serA* 遺伝子発現カセットそれぞれを選択マーカーとして用いられてございます。

この比較対象でコードするプルナーゼと 487 TPU、本申請品目については、アミノ酸配列の一致が 100% で確認がされてございます。

その結果のアライメントについては、42 ページの図 7 として表示されてございます。

次のページ、43 ページをお願いいたします。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性についてでございます。挿入遺伝子の供与体であります *B. deramificans* につきましては、これまでの我が国における食品産業での使用経験もございまして、その経験においてアレルギー誘発性に特段の懸念はないと考えられるとさせていただきます。

また、同菌につきましては、WHO/IUIS Allergen Nomenclature のデータベースにおきまして、*Bacillus* 及び *deramificans* をキーワードとして用いて検索が行われましたところ、既知のアレルゲンに関するヒットはなかったということでございます。

続いて、この遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性についてでございます。先ほど御説明さしあげたとおり、こちらの比較対象となっている BML780PULm104 株が生産するプルナーゼと本申請品目はアミノ酸配列が同一であるということでございますので、人工胃液及び人工腸液等の物理化学的処理に対する感受性の試験がスキップされてございます。一方、比較対象である品目における試験結果が引用されておりますので、御報告いたします。

この試験の結果ですけれども、ペプシン含有人工胃液において 1 分以内で分解されるということ。そして、パンクレアチン含有人工腸液の処理において 0.5 分で分解されるということが引用、報告されてございます。

なお、本申請の LDN487 が生産する 487-TPU と比較対象のプルナーゼにつきましては、分子量が同じであるということを確認がされてございます。

飛びまして、46 ページをお願いいたします。この比較対象におきまして、加熱後の残存活性についても実験がされてございます。その結果でございますけれども、72℃、30 秒間の加熱において、この活性が残存しないことが実験で示されているということも記載がされてございます。

続いて、47 ページ、4-3 につきましては、こちらに記載のとおりでございます。

49 ページをお願いいたします。「4-4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項」でございますけれども、こちらに記載のとおりでございます。

50 ページも記載のとおりでございます。51 ページをお願いいたします。「4-6 DNA の宿主への導入方法に関する事項」でございます。*PULm104* 遺伝子の導入用ベクターにつきましては、宿主である BRA7 株に欠失変異を導入し、改変して得た株、中間株をコンピテント細胞化ベクターによってコンピテント細胞化し、目的である *PULm104* 遺伝子の発現カセットを欠失しております *lysA* 遺伝子座、*serA* 遺伝子座へ相同組換えで導入したという

ふうになってございまして、それぞれの組換え操作につきましては、51ページから53ページにかけてステップ1からステップ9の9段階で説明がされてございます。このうちステップ1から5につきましては、比較対象となっているBML780PULm104株を利用して生産されたプルナーゼに用いられた方法と同一であるということでございますので、説明を省略させていただきます。

そして、ステップ6から説明をさせていただきます。比較対象と同一の欠失操作が行われた株、BML780株につきまして、これをコンピテント細胞化いたしまして、*lysA*遺伝子の欠失用導入用ベクターを細胞に導入してございます。その結果、*lysA*遺伝子が欠失されてございます。

続いて、ステップ7でございます。こちらはステップ6と同様に、この株をコンピテント細胞化いたしまして、ゲノム編集技術を用いまして、今度は*serA*遺伝子を欠失してございます。

そして、ステップ8、それぞれの遺伝子が欠失した菌株につきまして、コンピテント細胞化いたしまして、遺伝子発現カセットのうち、*lysA*遺伝子発現カセットを含むもの、こちらをDNA断片として細胞に導入してございます。その結果、標的遺伝子座である●●●に相同組換えで組み込まれております。

そして、ステップ9でございます。同じくその後の株をコンピテント細胞化いたしまして、*PULm104*遺伝子発現カセット、こちらは*serA*遺伝子を含むものでございますけれども、これを精製した直鎖のDNA断片として導入しております。その後、欠失後の●●●に相同組換えで組み込んだということでございます。

続きまして、54ページをお願いいたします。LDN487株において標的となった標的遺伝子座に*PULm104*遺伝子発現カセットがそれぞれの選択マーカーとともに組み込まれていることにつきましては、PCR法で確認されたということでございます。

そして、55ページをお願いいたします。このことにつきましては、次世代シーケンサーによる染色体の解析でも確認できたというような説明も同ページに記載がございまして。

続いて、58ページをお願いいたします。抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項でございまして、抗生物質耐性マーカーに関する遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項につきましては、こちらに記載のとおりでございます。

また、摂取に関する事項も記載のとおりでございます。

そして、「第5 組換え体に関する事項」のうち、5-1につきましては、こちらへ記載のとおりでございます。

「5-2 遺伝子導入に関する事項」のうち、「5-2-(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」でございまして、*PULm104*遺伝子発現カセットとその隣接領域のオープンリーディングフレームについてでございますが、遺伝子挿入領域とそれを含むそれぞれ長さ1kbの隣接する配列に対して、終止コドンから終止コドンで終結する6つの読み枠におけるオープンリーディングフレームを検出しておりま

す。

その結果ですけれども、60ページをお願いいたします。この遺伝子導入操作によって新たに生じたORFは25個検出されたということでございます。その検出されたORFについて、アレルゲンとの相同性検索が行われております。これはAllergenOnlineデータベースを用いまして、これらのORFについて連続する80アミノ酸以上の配列で35%以上の相同性、そして、連続する8アミノ酸配列との一致、それぞれの条件で検索が行われてございます。その結果、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は検出されず、連続する8アミノ酸配列と完全に一致する既知のアレルゲンも検出されなかったというふうな結果が記載されてございます。

続いて、これらの25個のORFの毒性タンパク質との相同性についてでございます。これらの25個のORFにつきまして、UniProtKBデータベースにおきましてBLASTPアルゴリズムを用いて毒性タンパク質との相同性が検索されてございます。E-valueの閾値を0.1に設定して検索がされましたところ、83番のORF、そして112番のORFが転写・翻訳された場合に生じるアミノ酸配列が206アミノ酸長のムカデの毒性タンパク質と相同性52.6%、カバレッジ54.29%を示したということでございます。

この考察が61ページにも記載ございまして、これらのORFの生成位置に関して確認したところ、PULm104遺伝子のプロモータ領域が起点となって相補的に存在し、その上流にはプロモータ領域が存在しなかったことから、これらのORFが転写される可能性は低く、両ORFが毒性の懸念につながるものではないと考えられるというふうな考察がされてございます。

第6につきましましては、記載のとおりでございます。

続いて、62ページをお願いいたします。「第7-1 諸外国における認可、食用等に関する事項」でございます。本品目の諸外国における認可等の状況でございますけれども、63ページ、表6にまとめて記載がされてございます。下段の黄色マーカーになっている部分が本申請品目に該当するものでございますけれども、フランス及びデンマークにおいては、●●●されております。そして、欧州におきましては、EFSAで安全性の評価が●●●でございます。オーストラリア及びニュージーランドにつきましましては、●●●●●●●というところでございます。

そして63ページの下、「7-2 組換え体の残存に関する事項」でございますが、本品目の酵素製剤における組換え体の残存について評価等がされてございます。

64ページをお願いいたします。生産菌が残存していないことにつきましましては、最終製品3バッチについて確認試験が行われておりまして、生産菌が検出されないことを確認したというふうなことが記載されてございます。

また、生産菌に由来する組換えDNA断片が残存していないことに関してですけれども、最終製品中の組換えDNAの残存を、PCR法とアガロースゲル電気泳動法により評価がされてございます。その結果につきましましては、64ページ下でございまして、この製品中

からは、検出限界10ng/mLにおいて組換えDNAは非検出であると考えられると結果が記載されてございます。

以降につきまして、記載のとおりでございます。

トラブルがあって大変申し訳ありませんでした。本品目については以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

非常に読み応えのある申請書だったのですけれども、皆様の御意見を賜りたいと思います。

申請資料の6ページから30ページ、第1から第3、ベクターに関する事項までのところで御意見、コメントがありましたら、よろしくお願ひいたします。

それでは、後から戻っても構いませんので、申請書の30ページから58ページ、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のところで、コメントがありましたらよろしくお願ひいたします。

ちょっと私、そう言いながら戻るのですけれども、23ページのところですが、●●●のプラスミドを入れてほしいというのは私が事前に出したコメントで入れてもらっているのですけれども、図2を見ると、ここはゲノム編集の技術を用いているところなのですが、●●●になっていまして、●●●という形になっているのですけれども、これは多分●●●ですよ。なので、ここは記載を修正しなければいけないのではないかと思うのですけれども、後で申請者に確認してみようかなと思います。

事務局から何かありますか。ないですね。

〇〇〇 ここは申請者に後ほど確認が必要かと存じます。

〇〇〇 そのほか先生方からコメントがありましたらお願ひいたします。

どうぞ、よろしくお願ひします。

〇〇〇 先ほどの〇〇〇がおっしゃっていた部分なのですけれども、この●●●のベクターの●●●書いてあるような気がするのですが。

〇〇〇 かなり薄くて見えないので。

〇〇〇 その横の四角に●●●と書いてありますよね。

〇〇〇 ここね。

〇〇〇 はい。●●●がどこにあるかよく分からないのはたしかなので、やはり事業者に聞いたほうがいいかなとは思っているのですけれども、この●●●中にあるのかなとちょっと思いました。

〇〇〇 もしかすると、●●●を使って●●●をつくったということなのですかね。どちらにしても、ちょっと確認したいと思います。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 それでは、申請書の58ページから最後まで、遺伝子組換え添加物に関する事項までについて、全体にわたってコメントがありましたら、よろしくお願ひします。かなりコンピテントセル化とか、ちょっとなかなかお目にかからないような技術を使っているの

すけれども、この点について、〇〇〇、〇〇〇、何かコメントがありましたらお願いします。

〇〇〇 すみません。もう一回言ってもらっていいですか。

〇〇〇 コンピテントセル化とか、ちょっとなかなかお目にかからないような言葉があるので。

〇〇〇 *Bacillus*系は大腸菌とは異なり、自然状態でコンピテントセルとして外来DNAを取り込む能力を持っているため、環状のDNAをそのまま取り込ませると、クロスオーバーによって意図しない組み込みが発生する可能性があります。そのため、*Bacillus*系の形質転換は、通常、一度制限酵素などでDNAをリニア化してから導入し、そのリニアDNAの状態ですぐにダブルクロスオーバーを起こさせて、目的の組み込みを選択する方法が一般的です。おそらく、この方法を使用していると考えますが、〇〇〇、この認識で間違いはないでしょうか。

〇〇〇 方法はそれでよくて、*Bacillus*属は一般に大腸菌みたいなやり方ではなくて、栄養リッチな培地で飼っておいて、それでいきなり窒素源を欠失した培地にしてやるとかなりの頻度でDNAが入るようになりますので、*licheniformis*の場合も似たようなものかなと思うのですけれども、同じような方法でコンピテント化していると思います。要するに大腸菌みたいにカルシウムを入れて零度にするのとばたっと入るようになるのかそういうのではなくて、もともと*Bacillus*属が持っているDNA取り込み能力を上げる手段を取っているということだと思いますので、あまり細かいことは言わなくてもよろしいかなと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 それと、〇〇〇CDの中に入っている資料の16にゲノム編集の記載があります。この資料は全3ページから構成されていますが、その2ページ目の冒頭部分、1ページ目の最後からの続きに、ベクター●●●は●●●をコードする遺伝子発現カセットと●●●を含んでいるということが書かれていますね。

〇〇〇 今日の机上配付資料2・3に今事務局からいただきまして、比較的読める図が載っています。そこに書かれているのですね。

〇〇〇 1ページ目から2ページ目にかけて、このプラスミドに●●●を含んでいるとは書かれています。

以上です。

〇〇〇 分かりました。では、含んでいるということで、ありがとうございます。

〇〇〇 少しだけよろしいですか。〇〇〇です。

〇〇〇 〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 植物の場合は組換え体作製実験と使用実験とわざわざ文科省の規程でも分かれています。つくるところと使うところが違って、また、そのシステム等々は重要なのですけれども、微生物の場合は出来上がったものについて、1匹だけ取ってきてそこから増やすという手段を使えますので、極端な話、途中のステップについてはあまり細かいことを

追求しなくても、最終的に出来上がったものだけちゃんと見ておけば安全性は確保できるのではないかなと常々思っております。

また、この申請書も実は細かいところを言いますと、*cat*のクロラムフェニコール耐性遺伝子を欠失させるところがありますが、これが*cat*になっているか*catH*になっているか、この申請書の中でところによってばらばらだったりもしますけれども、では、それを指摘して直させるべきかというところ、そこまではいいのではないかなと考えております。それよりも最終的に出来上がったもので、今回は宿主も同じ、アミノ酸配列も同じ、だけれども、組み込み方法が違って、染色体上に今度は2か所入っている、その分だけ生産量が高いからこの株をこの申請に出してきたのだなと思われま。

これはオーストラリアとかニュージーランドのシステムだったら、これを申請する必要はないということなのだけれども、ここは日本です、2個入れたらこれで周辺の遺伝子に影響が及ぶ可能性等々も考慮しないといけませんので、この場合は既存の遺伝子のところで入替えの形で入っていますので、そういう心配はないかとも思います。なので、そのところだけきっちりチェックすれば、私は安全性は担保できるのではないかなと思って、この申請書を見させていただきました。この際ですので私見を述べさせていただきました。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

今の●●●のところは。

〇〇〇 そのことについてお伺いしたいのですけれども、よろしいでしょうか。

枯草菌の場合、先生方がおっしゃっているようにコンピテントのところで勝手に自然界のDNAを取り込むという枯草菌独特の機能があると思うのですけれども、この間まであったような図は、たしかプロトプラスト化している枯草菌に遺伝子を組み込んでいたので、それは遺伝子組換えになるのかなと思っていたのですが、今回のようにコンピテントの状態でも遺伝子を取り込ませるということについては、これは自然界で起こるようなこととして、遺伝子組換えに当たるのかなというようなことを私自身は思っていたところがあります。今、〇〇〇のお話を聞いていると、諸外国ではそういうところはあまり検討されていないというお話かなと思ったのですけれども、日本の場合でもこれは、今後もそうなので、遺伝子組換えとしてなるというふうに考えていてよろしいのでしょうか。

〇〇〇 いわゆるセルフクロニング、ナチュラルオカレンスに該当するものとして出せばそれになるのですけれども、今回はその判断を求めてきていないので、遺伝子組換え体としてこの委員会としては評価するという立場になろうかと思っております。そういう理解で。

〇〇〇。

〇〇〇 今回は宿主である *Bacillus licheniformis* と DNA 供与体の *Bacillus deramificans*、これが自然界で DNA をやり取りしていて、それで組換え体が普通に生じているという論文が既に出ていて、それを根拠にこれはナチュラルオカレンスであるという主張で申請が上がってきたら、その時点で初めて考えます。だけれども、*Bacillus* の場合は放線菌ほど自

由自在に遺伝子が出たり入ったりするわけではなくて、比較的特殊な条件下でDNAをたまにやり取りするという事なので、自然にただ単に菌を混ぜておいただけでこの2つの菌がそこそこの頻度で、つまり今回出来上がったようなものが自然界で出来得るような頻度でそのような遺伝子交換が起こるとはちょっと考えづらいので、それでも起こり得るといふ査読付きの論文が出てきたら考慮しますけれども、今回はそのようなことは考えなくていいと思います。

以上です。

〇〇〇 〇〇〇、よろしいでしょうか。

〇〇〇 ありがとうございます。よく分かりました。

もう一点だけ、違うところなのですけれども、アレルゲン性のところの解析をAllergen Nomenclatureでやっていたと思うのですけれども、前回こちらの調査会の中で、何年前までの資料だったらよいかというような議論があったと思うのですが、あれは何年前というようなお話になったのでしょうか。2021年の時点で*Bacillus*で検索をかけてもヒットしないということなのですけれども、最新の情報ですと、ナットウキナーゼがAllergen Nomenclatureの中で登録されているということですので、ちょっとその辺り。

ただ、こちらは高度精製品になるので、特にその辺りが問題になってくることはないかと思うのですけれども、この際、聞いておこうかなと思いました。

以上です。

〇〇〇 目安としては2年なのですけれども、ただいま審査がやや渋滞してしまして、恐らくそのことを考慮すると、あと、既に評価済みのものの再生産品といいますか、生産能力を上げた株という形であることも考慮しますと、今回はこのAllergenデータベースの検索日時で受け付けてもいいかなと私は思うのですけれども、この点について何か先生方で、いや、新しく求めたほうがいいということがありましたら御意見いただきたいと思います。

〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 この間の議論の中では2年ほどはということになってしまして、確かに既存の配列と同じということもありますので、今回この2年前のデータでよろしいかとは思いますが、ただ、でき得れば最新のバージョンでということはあるのですけれども、ケース・バイ・ケースでよろしいかと思えます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ほかにございますでしょうか。

〇〇〇 1点、60ページのところでORFとアレルゲンとの相同性の評価のところでも少しコメントさせていただきたいと思うのですけれども、こちらの8行目から10行目、参照18で「連続する80アミノ酸以上の配列で35%以上の相同性」でやっているということなのですが、まず1つは、このデータベース、欄外には2020年2月に行ったとあるのですけれども、参照18の中では、それを行った後でさらに2021年のバージョンでやっていますということが書かれていますので、欄外の記述は2021年のバージョンに書き換えたほうがよろしいか

と思いました。

それから、もう一つ、80アミノ酸の35%以上の相同性を調べているのが添付資料18の40ページ目にあるのですけれども、その中には、新しく見つかった25個のORFのうち、1つのデータしか出されていないので、他のデータについても言及されるべきかと思いました。

以上です。

〇〇〇 その点、事務局のほうでコメントがありましたら。

〇〇〇 御質問につきまして、メールでいただいた際にすぐさま申請者に状況を確認いたしました。御指摘の別添資料18の40ページのアペンディクス3とある場所において、input queryがORFで11、フレーム2と称する非常に長い配列のみが書いてあるということなので、すけれども、申請者に説明を求めたところ、これは25個のORFを全て一つの文字列としてつなげて検索にかけたということで説明がされてございます。

事業者からあった説明は以上でございます。

〇〇〇 〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇長 そうしましたら、全体にわたってコメントありませんでしょうか。

では、申請者に聞くことはないですね。

それでは、非常に読み応えがあって、皆さんと事務局も非常に苦勞してつくり上げた申請書ですけれども、全体を通して安全性上は問題がないということでよろしいでしょうか。皆様の意思表示をお願いいたします。

(専門委員同意)

〇〇〇 非常に大変な申請書で、皆様御苦勞されたかと思えますけれども、ありがとうございます。

それでは、本件については、特に安全性上問題がないということですので、引き続き、評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局から説明をお願いします。

〇〇〇 それでは、評価書案につきまして御説明をさせていただきます。

評価書案のつづり、38ページをお願いいたします。本品目、LDN487株を利用して生産されたプルラナーゼ、ビール及び異性化糖製造時の糖化効率の向上に用いられるものということでございまして、申請者がダニスコジャパン株式会社、開発者がDANISCO US, INC. (米国) でございます。

それでは、内容に入らせていただきます。

「第1 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項」でございます。

「1. 従来の添加物の性質、用途等に関する事項」のうち、名称、基原及び有効成分でございます。名称、プルラナーゼ (PULm104製品) となっております。

生産菌株は、*Bacillus licheniformis* BML780PULm104株となっております。

製造方法につきましては、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。そして、生産菌は、除菌ろ過により除去されるということでございます。

用途及び使用形態でございます。この従来のPULm104製品につきましては、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素でありまして、ビール、異性化糖の製造工程で添加され、ほかの酵素と併用することで高い効率で単糖及び二糖類を生成することができるものとしてございます。当該酵素を用いた食品の製造工程では、通常、酵素タンパク質は不活化、除去されるため、最終食品には活性を有する状態で残存しないということでございます。

摂取量につきましては、本プルラナーゼが全てのビール製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の平均一日摂取量が1.14mg TOS/人/日であるとしてございます。また、本プルラナーゼが全ての異性化糖製造に使用され、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、0.408mg TOS/人/日ということでございます。これらから推定されるプルラナーゼの最大一日摂取量の合計値につきましては、0.028mg TOS/kg 体重/日という数字になってございます。

「2. 宿主に関する事項」につきましては、39ページ、40ページに記載がございますけれども、記載のとおりでございます。

「3. 挿入DNAに関する事項」でございます。挿入DNAの供与体の種名、株名または系統名等及び由来でございます。*PULm104*遺伝子の供与体につきましては*Bacillus deramificans* T89.117D株でございます。

挿入DNAの性質及び導入方法でございますけれども、*PULm104*遺伝子につきましては*Bacillus deramificans* T89.117D株由来の全長型プルラナーゼのN末端側の104アミノ酸領域を欠失したプルラナーゼをコードするものでございます。このアミノ酸領域の欠失はプルラナーゼの触媒サイトに影響を及ぼさず、プルラナーゼの活性を示すことが確認されております。

宿主の α -アミラーゼ遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、孢子形成遺伝子、アルカリプロテアーゼ遺伝子及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ遺伝子、リジン生合成遺伝子及びセリン生合成遺伝子をそれぞれ欠失させておりまして、これが中間株となっております。この中間株におきまして、菌株コンピテント細胞化ベクターを一時的に導入し、*PULm104*遺伝子発現カセット、リジン生合成遺伝子発現カセット及びセリン生合成酵素遺伝子発現カセットを直鎖化・精製したDNA断片として導入することによりまして、*PULm104*遺伝子発現カセットを相同組換えにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に導入してございます。

41ページをお願いいたします。遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項でございます。遺伝子組換え添加物、本添加物の製品名及び有効成分につきましてはでございます。製品名、OptimaxL-2500 R、もしくはDIAZYME等の名前がついてございます。以下「487-

TPU製品」と称します。また、有効成分につきましてはプルラナーゼですけれども、「487-TPU」と言うとしてございます。

製造方法につきましては、従来のプルラナーゼと同様に、培養工程、ろ過等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過及び限外ろ過等により分離・除去されるということでございます。

用途及び使用形態につきましてはでございます。487-TPU製品につきましては、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であるということから、従来の添加物と同様、ビール及び異性化糖の製造工程において、ほかの酵素とともに用いる用途が想定されているものでございます。

推定摂取量につきましても、従来の添加物と同様に記載してございます。

42ページをお願いいたします。有効成分の性質及び従来の添加物との比較でございます。487-TPUは、従来のプルラナーゼと同様にアミロペクチン等の α -1,6-グルコシド結合の加水分解を触媒する酵素であるとしてございます。

「5. 食品健康影響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遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項」でございます。

まず、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点でございますが、487-TPUと従来のプルラナーゼの相違点は、生産菌が異なることであるとしてございます。

また、遺伝子組換え体と宿主の相違点でございますが、*PULm104*遺伝子が複数コピー導入されておりまして487-TPUの生産能を獲得している点。そして、 α -アミラーゼ生産能、クロラムフェニコール耐性、孢子形成能、アルカリプロテアーゼ生産能及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ生産能が欠失している点、これが相違点となっております。

続きまして、「第2. 遺伝子導入に用いる塩基配列に関する事項」でございます。

ベクターの名称及び由来に関する事項でございますが、本品目におきましては、宿主に対し、*PULm104*遺伝子発現カセットを直鎖化・精製したDNA断片として導入しておりますので、遺伝子導入用ベクターにつきましては用いられなかったとしてございます。

「2. ベクターの性質に関する事項」につきましても同様の記載をしてございます。

そして、43ページ、「3. 挿入DNAの供与体に関する事項」でございます。*PULm104*遺伝子の供与体は、*B. deramificans* T89.117D株でございます。遺伝子組換え添加物として安全性審査を終了しているOptimaxプルラナーゼ及びBML780*PULm104*株を利用して生産されたプルラナーゼの導入遺伝子供与体として用いられてございます。*B. deramificans* T89.117D株につきましては*Bacillus*属の一種でございます。国立感染症研究所及び日本細菌学会における分類において、病原性の強いBSL2または3には分類されておらず、取扱い保存に関して最小限の安全処置で十分なBSL1の微生物と判断されるとしてございます。

続いて、「4. 導入遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項」でございます。*PULm104*遺伝子は*B. deramificans* T89.117D株の全長型プルラナーゼ遺伝子のN末端の

104アミノ酸領域に相当する塩基配列を欠失させた遺伝子であるということをごさいます。

この*PULm104*遺伝子につきましては、これがコードする487-TPUは、アミロペクチン等の α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であるということをごさいます。

5につきましては記載のとおりでございまして、44ページをお願いいたします。

「6. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」でございまして、挿入DNAのクローニングまたは合成方法に関する事項でございまして、*PULm104*遺伝子につきましては、全長型プルラナーゼ（Optimaxプルラナーゼ）生産菌株の染色体上のプルラナーゼ遺伝子をPCR増幅し、転写翻訳するとN末端側の104アミノ酸が欠失することとなる変異を導入して作製されたものでございまして。

そして（2）ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項でございまして、宿主へ導入したコンストラクトは、直鎖化されたリジン合成酵素発現型*PULm104*遺伝子発現カセット及びセリン合成酵素発現型*PULm104*遺伝子発現カセットでございまして、それぞれ5'末端側からP3プロモーター、*B. subtilis*のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子の5'末端側に存在する非翻訳領域、そして野生型*B. licheniformis*の α -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナルペプチドコード配列、*PULm104*遺伝子、野生型*B. licheniformis* α -アミラーゼ遺伝子のターミネーターの順に連結した遺伝子発現カセットを、*lysA*遺伝子発現カセットまたは*serA*遺伝子発現カセットと結合したDNA断片として作製されたものでございまして。このDNA断片の5'末端及び3'末端に相同組換え用の標的遺伝子隣接領域と相同性のある配列を結合し、挿入DNAとしてございまして。

続いて、46ページをお願いいたします。構築されたコンストラクトに関する事項でございまして。

塩基数及び塩基配列並びに制限酵素による切断地図に関する事項でございまして。リジン合成酵素発現型-*PULm104*遺伝子発現カセット及びセリン合成酵素発現型*PULm104*遺伝子発現カセットの塩基数及び塩基配列は明らかになってございまして。制限酵素による切断地図については作成されておきませんが、次世代シーケンシングにより、コンストラクトの全塩基配列は明らかになってございまして。

（2）、（3）は記載のとおりでございまして。

「第3. 遺伝子組換え体に関する事項」でございまして。

宿主との差異に関する事項でございまして、宿主との差異、生産菌の差異は、*PULm104*遺伝子発現カセットが導入され、複数遺伝子を欠失している点が宿主と異なります。

遺伝子導入に関する事項でございまして、そのうちコピー数及び挿入遺伝子近傍配列に関する事項でございまして。LDN487株の標的遺伝子座に*PULm104*発現カセットが選択マーカーとともに組み込まれていることにつきましては、PCR法及び次世代シーケンシングによる導入遺伝子領域の解析により確認されてございまして。

続きまして、ORFの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項でございまして。本生産菌株LDN487株の染色体上の*PULm104*遺伝子発現カセットと、その接合領域を含む

隣接する配列に関し、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30アミノ酸以上のオープンリーディングフレームを検出し、アレルゲン性とタンパク質の毒性について評価がされてございます。

ここで新たにPULm104遺伝子組み込み時に生じた25個のORFにつきまして、転写・翻訳された場合のアミノ酸配列と既知のアレルゲンのアミノ酸配列につきまして、相同性検索が行われております。その結果、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は検出されませんでした。また、連続する8アミノ酸配列が既知アレルゲンと一致する配列をアレルゲンデータベースで相同性検索したところ、ヒットはなかったとしてございます。

これらの結果から、LDN487株が生産する487-TPUにつきまして、食物アレルゲンの新たな懸念が生じるものではないと考えられるとしてございます。

さらに、25個の当該ORFに関しまして、既知の毒性タンパク質との相同性について、タンパク質データベースにおいてblastpアルゴリズムを用いた検索が行われております。

E-valueの閾値を0.1に設定して検索した結果、2つのORFがムカデの毒性タンパク質と相同性を示しておりましたが、これらのORFはプロモーター領域を起点とした相補鎖に存在し、上流にはプロモーター配列もないことから、転写される可能性は低いと考えられてございます。

したがって、487-TPU製品中に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ました。

3につきましては、記載のとおりでございます。

48ページをお願いいたします。「4. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項」でございます。

導入遺伝子の供与体についてでございますけれども、供与体である*B. deramificans*につきましては、第10版食品添加物公定書でプルラナーゼの生産菌として収載されてございます。また、比較対象となっているプルラナーゼ、そして、既に官報掲載済みのプルラナーゼのプルラナーゼ遺伝子の供与体となってもございます。

*B. deramificans*に関しまして、このように食品産業での使用経験も含め、アレルギー誘発性に特段の懸念はないと考えられるとした上で、アレルゲンデータベースで、*Bacillus* 及び*deramificans*をキーワードとして検索したところ、既知のアレルゲンに関するヒットはなかったとの結果も記載してございます。

続いて、(2) タンパク質についてのアレルギー誘発性に関する知見でございます。487-TPUにつきましては、従来の添加物と同一のアミノ酸配列を有します。PULm104につきましては、2016年以降欧米をはじめとして複数国で異性化糖の生産などに用いられておりますけれども、アレルギー性の懸念につながる事象は報告されていないとしてございます。

(4) でございますけれども、49ページに内容の記載がございますが、PULm104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を用いて相

同性検索が行われておりまして、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のアレルゲンは検出されませんでした。

以上のことから、487-TPUにつきましては、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられています。

第4につきましては、記載のとおりでございます。

第5の「1. 諸外国における認可、食用等に関する事項」でございますが、487-TPU製品は、フランス、デンマーク及びオーストラリア・ニュージーランドにおいて承認等をされているというふうに記載してございます。

以降の内容につきましては、記載のとおりでございます。

評価書につきましては、以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案について意見、コメントを賜りたいと思います。

ちょっと修文が多いので、取りあえず皆さんからコメントを賜りますけれども、後ほどきれいにしたものを一度皆さんにお配りして、新しい評価指針に基づいて皆さんにもう一度確認をしていただきたいと思います。

それでも現時点でお気づきになった点がありましたら、コメントをお願いいたします。

こちらのデータベースとの照合日は2022年になっているようですけれども、それでいいのですよね。

〇〇〇 添付資料18からは間違いございません。

〇〇〇 それでは、大きなミスは多分ないものと思いますので、皆様のほうにきれいにしたものを流していただいて、それをもう一回確認した上で、その確認事項がもしあれば私と事務局のほうで最終的に確認をしたいと思います。その点については御一任いただけるということでよろしいでしょうか。

(専門委員同意)

〇〇〇 ありがとうございます。

では、ちょっと事後のステップがありますけれども、そのステップを踏んだ上で、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

以上でLDN487株プルナーゼの審議については終了したいと思います。

議題1についてはこれで終わりたいと思います。

ちょっと時間をオーバーしておりますけれども、議題2のその他ですけれども、事務局から何かありますでしょうか。

〇〇〇 特にございませぬ。

〇〇〇 ありがとうございます。

では、本日の議題についてはこれで終了しました。

時間をちょっとオーバーいたしましたけれども、皆様、御協力ありがとうございました。

以上をもちまして、第257回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。
適宜御退室ください。ありがとうございました。