

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第221回) 議事録

1. 日時 令和4年1月28日(金) 14:00~15:43

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

- ・ DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ
- ・ JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、小野道之専門委員、
小野竜一専門委員、近藤専門委員、樋口専門委員、藤原専門委員、山川専門委員

(専門参考人)

児玉専門参考人

(食品安全委員会)

川西委員

(事務局)

鋤柄事務局長、中事務局次長、石岡評価第二課長、井上評価情報分析官、
松原課長補佐、山口係長、松井技術参与、松田技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ① DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ
- ② JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼ

6. 議事内容

○中島座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第221回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催いたします。

先生方、カメラはオンでお願いいたします。

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」に基づき、非公開で行います。

本日、専門参考人といたしまして、千葉大学大学院園芸学研究院の児玉浩明教授に御出席いただいております。

また、「テレビ会議又はWeb会議システムを利用した食品安全委員会等への出席について」に基づきまして、Web会議システムを利用して行います。

本日の議題ですが、2件とも新規品目の酵素でございまして、「DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ」、「JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼ」の安全性についての審議でございます。

それでは、お手元の資料を確認いたします。事務局からお願いいたします。

○松原課長補佐 それでは、議事次第に基づき、配付資料の確認をさせていただきます。

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、その他机上配布資料1、2となっております。

また、本日は、「DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ」の申請者であるダニスコジャパン株式会社の方、「JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼ」の申請者であるノボザイムズ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、質疑応答等に対応していただくことを予定しております。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

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」に基づきまして、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。

○松原課長補佐 本日の議事に関す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、御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方から頂いた確認書を確認したところ、平成15年10月2日委員会決定の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。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

確認書の提出以降、何か変わったことがあった先生方はいらっしゃいますでしょうか。

よろしいですね。ありがとうございます。

審議に入ります前に、例によって事務局からWeb会議における注意事項がございます。御説明をお願いいたします。

○松原課長補佐 本日はWeb会議形式で行いますので、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させていただくよう

お願いいたします。

2点目、発言の際は赤い挙手カードを提示ください。またはWeb会議画面の挙手ボタンを押してください。座長より呼びいたしますので、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、通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにすることや再入室することにより改善する場合がございます。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、全く入室ができなくなった場合は、事務局までお電話をお願いいたします。

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、事前にお送りさせていただきました青い同意カードを挙げていただく、もしくは手で丸をつくるなど、意思が伝わるようお願いいたします。

以上がWeb会議における注意事項となります。どうぞよろしくお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、早速ですが、新規品目であります「DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ」について審議を行いたいと思います。

では、事務局から説明をお願いいたします。

○松原課長補佐 説明させていただきます。

DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼの安全性評価資料の御準備をお願いいたします。

また、本資料を先生方にお送りした際、確認事項を幾つかいただきましたので、そちらにつきましては要旨の説明の後に説明させていただきたいと思います。

それでは、説明いたします。

まずは5ページ目をお願いします。

第1の1、従来の添加物に関する事項でございます。名称はホスホリパーゼでございます、その中でも、今回の申請品はホスホリパーゼA1に分類されるものでございます。

6ページ目に参りまして、(3)用途でございます。本品目はリン脂質の1位のアシルエステル部分を加水分解して、脂肪酸とアシルリゾリン脂質を生産するアシルヒドロラーゼでございます。製パン・製菓などに使用されるものでございます。

7ページ目に参りまして、2の(1)宿主は *Ogatae polymorpha* RB11株でございます。

(2) DNA供与体と(3)挿入DNAの性質につきましては、9ページの表1にまとめております。表1の下から2番目、ホスホリパーゼをコードする *KLM1* 遺伝子の供与体は *Fusarium heterosporum* でございます。一番上の選択マーカーとして用いる *URA3* 遺伝子の供与体は *Saccharomyces cerevisiae* でございます。その他にも、プロモーター配列、ターミネーター配列、遺伝子導入用ベクターの複製に必要な配列につきましては宿主由来と

なっております。

(3) 導入方法でございます。9ページの図3の下から3つ目でございますが、*KLM1*遺伝子発現カセット、*URA3*遺伝子、自己複製配列を含む導入用ベクター全体を電気穿孔法によって宿主に導入しております。

11ページに参りまして、5、遺伝子組換えの添加物の性質についてでございます。(1) 有効成分はホスホリパーゼA1、(2) 製造方法は従来のホスホリパーゼと同様、(3) 用途は特にスポンジケーキに使用することで容積が増加し、柔らかさが向上してふっくらとしたケーキができるということでございます。

13ページに参りまして、(4) 有効成分の性質でございます。有効成分であるホスホリパーゼは、従来の添加物と同様の性質となっております。

6の(1) 従来の添加物との相違点は、申請者に確認したところ、基原、アミノ酸配列、至適pH、至適温度であること、また、従来の添加物とのアミノ酸配列の相同性は●●●と返答をいただいております、修正されるという連絡をいただいております。

(2) 組換え体と宿主の相違点につきましては、組換え体はホスホリパーゼA1生産能を獲得している点とウラシル栄養を要求しなくなったといった点でございます。

20ページに参りまして、第4の2(1) 挿入遺伝子のクローニング合成方法に関する事項でございます。*KLM1*遺伝子は*F.heterosporum*の培養物からホスホリパーゼ活性を持つタンパク質を分離し、消化酵素でペプチドに分解した後、個々のペプチドのアミノ酸配列を解析して、その情報に基づきDNA配列を合成しております。

また、ここに*URA3*遺伝子について記載がありませんでしたので、申請者に確認し追記してくださいとお願いをしております。内容としては、*S.cerevisiae*のゲノムからPCRにより獲得されているということが記載されると聞いております。

22ページに参りまして、(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。まず*KLM1*遺伝子ですが、この遺伝子がコードするKLM1はリン脂質の一位のアシルエステル部分を加水分解する酵素でございます。また、*URA3*遺伝子により*S.cerevisiae*由来のオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼが生産され、ウラシル栄養要求性ではない生産菌の選択が可能となっております。

23ページ6行目、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。*URA3*遺伝子供与体である*S.cerevisiae*は、食品産業での使用経験も含め、アレルギー誘発性に特段懸念はないと考えられているということでございます。

また、*KLM1*遺伝子の供与体である*F.heterosporum*につきましては、データベース検索を行った結果、アレルギー誘発性を示す文献は確認できませんでした。

続きまして、24ページ目に参ります。ここから遺伝子産物の物理化学的処理に関する感受性についてでございます。

25ページ目の図5を御覧いただければと思います。

上段が人工胃液処理試験のSDS-PAGEの分析結果でございます。レーン3が反応開始0分、

レーン4が反応開始0.5分でございます。KLM1のバンドはレーン4で消えており、反応開始0.5分以内に分解されることを確認しています。

また、下の段は人工腸液処理試験の結果でございます。こちらはレーン3は反応開始0分ですが、レーン4は反応開始1分のバンドとなっております。反応開始1分でバンドが消えているということが示されております。

続きまして、26ページに参ります。8行目、KLM1の加熱処理の残存活性についての考察でございます。通常のケーキ類は175℃で13分の焼成が想定されるところですが、本酵素は80℃10分の加熱で活性が残存しないことが確認されております。

続きまして、30ページに参ります。第4の6、DNAの宿主への導入方法に関する事項でございます。DNAの宿主への導入方法につきましては、電気穿孔法を用いて、遺伝子導入用ベクターを宿主に導入しております。

33ページに参りまして、第5の2の(1)でございます。制限酵素による切断地図でございますが、こちらは、戻りまして29ページの図7のとおりとなっております。DIDK-0176株の染色体に組み込まれるベクター上の主な制限酵素認識サイトと塩基配列状の位置を確認しております。

また、DIDK-0176株の染色体について次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を解析しており、構築したDIDK-0176株のゲノム配列中でKLM1遺伝子発現カセット及びURA3遺伝子発現カセットが●●●挿入されることを確認しております。

続きまして、34ページに参りまして、(2) ORFの有無についてでございます。KLM1遺伝子及びURA3遺伝子発現カセットの導入により新たに生じるORFを検索するため、近傍配列及び挿入DNA配列同士がつながった配列と、そのジャンクション領域で解析を行っております。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連続する30アミノ酸以上のORFが104個検出されました。

これらのORFと既存のアレルゲンとの相同性を認識するため、データベースを用いて検索を行った結果、連続する80アミノ酸で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンについては検出されませんでした。

また、連続する8アミノ酸配列以上が一致する既知のアレルゲンにつきましては3つ検出されました。

この3つにつきましては、食品アレルゲンのエピトープとは一致しないと考えられると考察されております。

また、これらORFと既知の毒性タンパクとの相同性の有無を確認するため、データベースを用いて、*E-value*が0.1未満を指標として検索を行った結果、4つのORFが相同性を示しました。ただし、いずれもその相同性が低かったことから、仮に発現しても有害なタンパク質として機能する可能性は低いと想定しており、有害タンパク質の生物化学的に有意な相同性を持つものはなかったと考察されております。

38ページに参りまして、第7の1でございます。諸外国における認可、食用等に関する事

項でございます。次の39ページの表6のとおり、米国で2007年にGRASで認証され、オーストラリア、ニュージーランド、デンマーク、フランス、EUで承認等を受けているといったところでございます。

40ページに参りまして、第7の2でございます。酵素原体汚染につきまして、酵素原体に生産菌が含まれていないことをPCR法によってDNAが残存しないことを確認しているといったところでございます。

43ページに参りまして、第7の3、非有効成分の安全性に関する事項でございます。我が国の食品添加物等の規格基準、JECFAの食品用酵素の一般規格、FCCの酵素製剤の一般規格をそれぞれ満たしているといったところを確認しております。

46ページに参りまして、第7の4、精製方法及びその効果に関する事項でございます。KLM1は除菌ろ過等によって生成されており、KLM1の製造工程に設定されている精製工程によって、製品として必要な酵素活性を保持できているとともに、生産菌を除去でき、食品加工に使用する酵素に十分な品質を確保できると確認しております。

次の47ページでございますが、そのときのSDS-PAGEのものでございます。ここで●●●としておりますが、こちらは●●●を使っているといったところでございます。

以上、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と申請者は考察しているといったところでございます。

要旨については以上でございますが、次に、事前に先生方からいただきました確認事項について、申請者からの回答を説明をさせていただきます。

机上配布資料1の御準備をお願いいたします。

まず確認事項1ということで、アミノ酸配列の相同性が●●●ということですが、●●●を比較した図の提出をお願いいたしますということで別添1で配列図をつけていただいております。こちらは要旨のほうに含めていただくという回答をいただいております。

次に、確認事項2でございます。メタノール資化酵母でございますので、培養時にメタノールを添加しているかどうかを培養方法に明記してくださいということを問い合わせしております。それに対して、申請者は、●●●として使用しており、メタノールは添加していませんということで、その旨を記載すると回答いただいております。

続きまして、確認事項3でございます。HARS1配列につきましては、8ページで遺伝子導入用ベクターの複製に必要と記載されています。これは菌体内でプラスミドの形で複製できることを意味しているように思われますが、17ページではHARS1配列も含めてベクターDNA配列全体が染色体に導入されているため、同プラスミドが独自に増殖される可能性はないと考えられるとされております。これでは説明が一致しないと思われるので、整合性がとれる説明に修正してくださいということでございます。

こちらについて回答は、本申請品の宿主と同じ●●●由来の菌株を利用した異種タンパク質の発現系が紹介されております。ここには●●●こと、●●●ことが報告されております。そして、HARS配列であってもゲノム染色体に組み込まれることが書かれています。

この文献を用いて、プラスミド複製に関する記載の削除を考えていると回答しております。

続きまして、確認事項4でございます。今回、コピー数は●●●ことについて、本当にゲノムに組み込まれており、プラスミドの形で入っていないかどうか疑問が残るといったところと、この点については、32ページの図3のサザンブロット法の検索の結果において、●●●のバンドが濃く検出されていることが、プラスミドが●●●で切れた断片長とも合うように思われますが、プラスミドがきれいに全てタンデムで並んでも●●●になるので、どちらとも言えないので、サザンブロット分析のバンドの長さ、●●●と●●●のメジャーなバンドの構造の推定について説明してくださいということ聞いています。回答では、上記の文献に基づいてプラスミドがタンデムに組み込まれていると考えているということ、●●●のバンドについての情報はR&Dから届けられておりませんので、特定はできませんが、宿主由来の配列ではないかと推測しております。この配列は、第8章で補足しました毒性試験の結果からも、安全性の影響があるタンパク質をコードするものではないと考えているということでございます。

確認事項5番目、シーケンス結果の添付資料を読むと、●●●と記載されているので、ゲノムに本当に組み込まれているのであれば追加で記載して必要があるといったことについては、追加記載を考えている。この単元の導入部分に、次世代シーケンサーでの配列解析により●●●DNAが混入していることが判明したこと、しかし、ORFの評価でこの断片も網羅して安全性の懸念につながる結果は得られていないといったことを追記したいと考えていると回答をいただいております。

以上でございます。御審議のほど、お願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、専門の先生方から御意見いただきたいと思っております。この全般について、どこからでも。そんなに大部なものではございませんし、また、ポイントが限られておりますので、どこからでもよろしいので、疑問の点等があれば。あとは、後ほど申請者をお呼びすることを考えておりますので、よろしくお願いいたします。

例えば16ページ、17ページで大腸菌由来のプラスミドで*tet*と書いてあって、16ページの上から3行目、テトラマイシン耐性と書いてあるけれども、テトラマイシンという抗生物質はなくて、これはテトラサイクリンの間違いだと思うのです。そういう感じで学名のスペルがおかしいかなと思うようなところも散見されまして、その辺、正確性に欠けると思うので意見しようと思っております。

この辺、先生方、何かお気づきの点等はございますでしょうか。

24ページ、25ページ、人工胃液、人工腸液の試験がございまして、SDS-PAGEで十分分かるかと思いますが、これについてはウェスタンのデータはついておりませんが、私はこれだけSDS-PAGEの結果が明確であればいいかなという気もするのですけれども、この辺、専門の先生方、これで安全性は確認できたと言えるかどうか、御意見をいただければと思うのですけれども、安達先生、この辺はいかがでしょうか。

○安達専門委員 安達でございます。

人工胃液、人工腸液ともKLM1のバンドが明確に見えておりまして、それが短時間で切断されているということが分かると思いますので、私はこれでよいのではないかと思います。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

樋口先生、いかがですか。

○樋口専門委員 元の酵素のバンドが明瞭に見えていて、それが同じゲル状で全く見えなくなっているの、十分に減少している、ほとんど検出限界以下ということで問題ないと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

川西先生、どうぞ。

○川西委員 人工腸液のKLM1の3番目の時点0のレーンは判りますか。蒸留水のほうとの比較は判るのだけれども、これはなかなか難しいと思います。比較が時点0になるわけで4、5、6と行く経過するわけでしょう。KLM1のバンドは明瞭かしら。私にはこの違いがよく判らないのですが。

○中島座長 この辺、いかがでしょうか。

1分で消失と言って、これは人工胃液と人工腸液はタイムスケールが違っておりまして、人工胃液のほうは30秒、1分となっていて、人工腸液のほうは1分、2分なので、最初のレーン4が1分後になりましょうか。レーン3にあるバンドが4で消えていると申請者は主張しておって、そう見えないこともないかなと思うので、だから御意見をお伺いしたのですけれども、川西先生は、それはどうなのだろうということみたいですので。

○川西委員 これは、胃液のほうははっきりしているのだけれども、人工腸液のこの条件というのが、確かに1番と比べれば4、5、6と分かるのだけれども、今回見なくてはならないのは3番との比較ですよ。今、2人の先生方はなくなっているように見えますとおっしゃっているの、僕の目のせいなのかなと思うのだけれども、これはどうなのだろうという気はしないでもない。ただ、2人の先生がこれで大丈夫、判断できるとおっしゃるようですから、そうなのかなと思いますが。

○中島座長 そういうことのようなのですが、私もいいと言えればいいのかなという気もするし、微妙と言えれば微妙かなと思うので、この分野の専門の先生、どなたか御意見を願いますでしょうか。

つまり、ポイントはこれでいいかなとするか、それともウェスタンのデータを持っているのだったら出してくださいと要求するかということになるかと思うのですけれども、微妙と言えれば微妙なので、ウェスタンのデータを持っているのだったら出してくださいようお願いしようと思は思うのですが、先生方、いかがでしょうか。皆さんそう言ってくださっているようですし、要求しましょう。

○川西委員 要求というか、努力したか。それで、目いっぱい条件を詰めてこれが最善ということであればいいかなという気はするのですけれども、実はこれ、社内資料の25番目で検討していて、条件の検討のSDS-PAGEが17ページ目にあります。これは本品目の安全性とは関係ないかもしれませんが、●●●は一体どれのこと言っているのと。この矢印は明瞭ではないので、条件検討がちゃんとされているのか聞きたいと思います。

○中島座長 申請者をお呼びすることになろうかと思しますので、その辺は先生のほうから直接言っていただけますでしょうか。

ほかに。

これは、最初の申請書があまり親切ではなくて、従来品と今回の本申請品との比較も要求したら分かりやすく作っていただけているとか、そんなことがございます。それから、●●●とかその辺も説明をしていただくようお願いしたところ、出てきておりますのでというところがあるので、もうちょっと気合いを入れて申請書を書いていただければと思うのですが。

あと、少し疑問が残るのが、机上配布資料という形で添付されております確認事項の1、2、3、4、5のところで、確認事項1はアミノ酸配列の相同性についてのデータを出していただいております、最初から提出してほしいと思うのですが、これは児玉先生ですよね。このくらいでよろしいでしょうか。

○児玉専門参考人 確認事項1はこれで十分かと思えます。

○中島座長 確認事項2、メタノール資化酵母について、バイオロジーにまさかメタノールは使っていないよねという御指摘、これも児玉先生だと思えますが、使っていないということのようなので、これはよろしいでしょうか。

○児玉専門参考人 ●●●があるのですけれども、今回は使っていないということですので、これでよろしいかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

確認事項3、これは書き方の問題もあるのかもしれないのですが、複製に必要な溶液が入っているとプラスミドのところで書いてあったので、新核生物でそういうプラスミドは安定性には問題があっても、例えばパン酵母などですとこういうものはプラスミドの形で存在するものがございます。パン酵母のいわゆるYRp型と言われるものなのですが、申請書には●●●入っていると書いてありまして、本当かということで回答をいただいております。

確認事項3の回答ですが、これですと、まず複製するには不完全であって、これでもゲノムに組み込まれることがある。●●●ということもあるというさらに本当かという感じの回答が来ていますが、私はこの辺についてもう少し、彼らの言っているのは、複製開始起点みたいなものがあって、これは染色体が組み込まれることがあると言っているだけで、プラスミドとして存在しないことを保証しているのかという点をお答えいただけていないので、私としては少々納得してなくて、そこは申請者に聞いてみようと思うのですが、

この辺につきまして、どなたか御意見、コメント等ございますでしょうか。

この辺、山川先生あたり、いかが思いますか。

○山川専門委員 説明が詳しくないので分かりにくいのですが、安全性に影響があるタンパク質ではないと考えております。このところですよ。

○中島座長 そういうことです。

○山川専門委員 だから、これはどうしてそうなるのかが分かりにくいのです。

○中島座長 申請者を呼びますので、そこでいろいろ議論をしてみたいと思います。私が議論を吹かけますので、先生方、もしお気づきの点等あれば、途中で口など挟んでいただければありがたいと思います。

確認事項4、コピー数が多くて、ゲノムに入っているプラスミド、これはサザンプロットのデータがございまして、32ページには●●●の断片、これはプラスミドの大きさにちょうど相当します。プラスミドがこのまま●●●入っているのであれば、このバンドが出るのは納得がいくのですが、●●●のバンドがぼぼんと出ておりまして、彼らの説明によると宿主由来の配列ではないかと推測していますと言っているけれども、宿主に対して●●●出るものかなと私は余計に疑問になっているのですが、これは最初に御指摘いただけたのは児玉先生だったと思いますが、児玉先生、この回答でいかが思いますか。

○児玉専門参考人 まさに今、座長がおっしゃったように、●●●ある遺伝子と●●●出てくるというのほうでしょうかという話になるかと思えます。

それと、プラスミドで入っているのではないのと何となく思った理由は、例えばレーン5とレーン6のところのサザンを見てもらうと分かると思うのですが、●●●、プラスミドは抜けたり増えたりしているのかなみたくも見えなくもないなと思った次第で、本当にゲノムにきれいに安定して保持されているのであれば、こんなに薄くならないのではないのと思ったところもあります。

ここは、確認事項5の●●●の断片が入った図みたいなものを事務局で作って、これがこう入っていると●●●に出たのではないですかみたいな図も作ってらっしゃるようなのですが、そこは何とも言えないので、申請者に確認して、繰り返しで入っていると思うので、なかなか構造をきれいに全部出すのは難しいとは思いますが、何らかの説明はいただかないといけないかなと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

食品安全、我々の審査基準としても、外来遺伝子がどのような形で組み込まれているかを明らかにするというのは譲れないラインでございますので、その辺は我々がきっちり全員納得いく説明を申請者に求めたいと思います。

先生方、この点につきましてどなたかございますでしょうか。

確認事項5にまた続いて行きますけれども、これも児玉先生ですね。●●●の予期せぬ断片が組み込まれている。でも、予期せぬであっても、●●●の遺伝子と分かっていたらいいかという問題ではなくて、予期せぬものが入っていたら入っていたで、それがどこに入っていて、どういう形になっていて、それで危ないものができるかどうか、毒性なりORF検索をやって、その辺の一通りの手続を踏んでいただかないといけないと思うのですけれども、児玉先生、そういうことでよろしいでしょうか。

○児玉専門参考人 回答を見ると入っていますよと書きますとなっていて、ただ、実際にはどういうふうを書くのかは未提出なので分からないということと、ORFの検索をこの断片を入れた形でやっているのかもよく分からないので、そこはちゃんとお聞きしないといけないかなと思っております。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

どうぞ。

○小野竜一専門委員 マッピングの件なのですけれども、プラスミドが入っているか、入っていないかのことなのですが、社外資料、CDのほうのデータを見ると、●●●というデータが文章で示されているので、そういう意味では、全部ではないにしても幾つかは入っているということは分かるのかなと思います。

あと、●●●由来のものというのは、やはりきちんと調べないといけないなと思いました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。やはりそう思いますよね。

先生方、ほかに。

挿入されたタンパク質の性質とか組換え体の性質等については、基本的には型どおりであまり問題になるところはないのかなと思いますが、22ページ、表2で α 因子プレプロタンパク質分泌シグナルペプチド等と書いてあって、下線部、分泌シグナルと言ったら普通は大体20アミノ酸から長くて30くらいだと思うのだけれども、これだと●●●アミノ酸もあって、それだけの長さが全部分泌シグナル配列なのかなというのは少々疑問に思うのですが、 α ファクターなので、実はプレプロ配列と言ったら●●●のところまでがいわゆる分泌シグナルのプレ配列で、そこから●●●くらいは小胞体を無事に通過させるためのいわゆるリーダー配列ではないかと思うのですが、それでよく使われるパターンなので、それそのものは問題ないのだけれども、この説明の仕方だとそういうふうには全然読めないなので、この辺は問いただして、もしそういうことであれば、きちんとした記述を求めたいなと思っております。

ほかに先生方、どこかございますでしょうか。

小野先生、

○小野竜一専門委員 またいつものことなのですけれども、23ページのアレルギーのデー

データベースの検索が2019年ということで、更新が必要なのではないのかなということが一点です。

○中島座長 最新は何年度ですか。

安達先生、御存じですか。

○安達専門委員 1年に1回は更新されていると思いますので、恐らくこれより新しいバージョンではないかと思うのですが、今、サイトを見ているのですけれども、具体的な記述がないので、今すぐにはきちんとしたお答えができない状況です。申し訳ございません。

○中島座長 いえ、僕もたしか年に一度くらい更新されていたように記憶しておりますので、これは本当に最新かとだけ問いただせばよかろうかなと思いますので、ありがとうございます。

ほかに何かございますでしょうか。

この酵素そのものは既にヨーロッパで販売実績等もあるようなので、その問題はないのではないかと思うのですが、挿入位置とかその辺のところできいろいろと聞きたいことがありますので、だから、もし今日これで指摘事項ありで承認にならない場合は、今日のうちに全部指摘すべき点は指摘しておくのが親切だと思いますので、ほかにございますでしょうか。

申請者をお呼びしてよろしいでしょうか。

では、申請者を呼んでください。

(申請者入室)

○笠井氏 お世話になります。ダニスコジャパンの笠井と申します。

○中島座長 皆さん入室されましたでしょうか。

本日は、お忙しいところ、長らく待機いただきましてありがとうございます。

先に自己紹介いただきました。ダニスコの笠井さんですね。よろしくお願いたします。

まずは、申請書は後からの追加の指摘があって、いろいろと修正の回答をいただいております。物によっては、例えば新しい今回の酵素と比較対象との対照表とか、アミノ酸配列対照表のようなものは最初から書いていただければ、お互い手間が省けるのになと思うわけなのですが、16ページ、プラスミドpB14の絵が描いてある。これは上から3行目で *tet* 遺伝子がテトラマイシン耐性遺伝子になっておりまして、17ページにもあるのですけれども、テトラマイシンという抗生物質はなくて、これはテトラサイクリンの間違いだと思うのですが、全般を見てみると、スペルが違うのではないかと思うところがございまして、もう一回精査していただけますでしょうか。細かいところ、少々ミスがあるように思います。

○笠井氏 了解いたしました。失礼いたしました。

○中島座長 それでは、25ページ、人工胃液、人工腸液のデータでございます。これは SDS-PAGE だけでウェスタンのデータはないのですが、人工胃液のほうはこれで非常に明確に30秒で全部分解することが分かりますが、人工腸液のほうは少々微妙でございます。

このデータだけで1分で完全に分解していると確認できるかどうか、我々の間でもこれくらいで何とか分からないでもないよという先生もいらっしゃる、これはちょっと難しいのではないかと少々意見が分かれるくらい微妙でございます。ウェスタンでもやってあるとそこははっきりすると思うのですが、そのようなデータはお持ちでしょうか。

○笠井氏 抗体を使ったデータはやっていないので、今、持ち合わせておりません。

○中島座長 ありがとうございます。

では、川西先生、どうぞ。

○川西委員 これは比較的分子単位で壊れているという傾向と思えばそう思えないわけでもないというぐらいには見えるのですけれども、一方で、明瞭にそう言えるかと客観的に見ると、どうもこれではなと思うのです。それで、御社としては、この結果は、いろいろ条件等を検討してみたのだけれどもこれがベストでしたということなのか、それともこれを取りあえず判断しましたということなのか等を含めて、今の話だとどうもウェスタンプロットのほうは試みてもいないようなので、その辺り、もう少し追加的に努力をした結果なのか、そうではないのかというのを教えていただければと思うところです。

○笠井氏 ありがとうございます。

これは、トーマス文献という文献がございまして、条件はそこにのっってやったものだと思いますので、確立されたやり方にのっってした結果だと理解しております。

○川西委員 社内資料で25番目の資料を出していただいて、これがオリジナルのデータなのでしょうけれども、それに合わせて条件検討の電気泳動もあるのですが、これを見ていると、この資料の17ページ目にその検討のものがあるのですけれども、これでそれぞれ見ると、●●●などは矢印が一体どれを指しているというのがよく分からないような矢印になっていたりして、私は正確に理解できているか分からないのですけれども、この辺り、この条件できちんと判断できると御社は判断したのですか。

○中島座長 笠井さん、お願いいたします。

○笠井氏 これは先ほど申した文献の方法でやっているもので、そういったスタンダードな方法で評価した結果、これで評価ができていると会社では思っております。

以上です。

○川西委員 取りあえず御社の今の時点での回答は分かりました。それで納得したかどうかは、また後でディスカッションさせていただければと思います。

○中島座長 それでは、22ページ、アミノ酸の配列が出ておりまして、 α 因子プレプロタンパク質分泌シグナルペプチドで1アミノ酸だから上ラインが引いてあります。分泌シグナル配列というと、普通はこの20から30アミノ酸くらいで、こんなに長い領域が全部いわゆる分泌シグナル配列なのではないでしょうか。

○笠井氏 そこまでちゃんと同定していないので、もう一度確認させてください。すみません。

○中島座長 何が言いたいかということ、 α ファクターのプレプロということは、プレ配列

が分泌シグナルで、大体頭の20アミノ酸くらいで、それから、●●●くらいは小胞体を無事に通過させるためのいわゆるリーダー配列として α ファクターが使われるケースがよくあります。そう考えるとこのデータは納得がいくのですが、その記述がそういうふうになっていないということなのです。なので、この辺を確認して、正しい用語を使って分かりやすく正確に記述していただきたいと思うのですが、よろしいでしょうか。

○笠井氏 承知しました。

○中島座長 この染色体上のどこに入っているか、次世代シーケンサーの結果によると、●●●入っているということで、恐らく●●●染色体にある程度入っているのは間違いのないかとも思うのですが、このプラスミドに複製開始起点があるとすると、円形のプラスミドの形として存在することも考えられます。

そう考えても、32ページのサザンで出てくる●●●の大きいバンドは説明もできるわけで、何が言いたいかという、このような配列があっても組み込まれることがあるということはそれでよろしいのですが、全て染色体に組み込まれて円形のプラスミドの形では存在していないという保証にはこれではならないなということでございます。細かいことのように、我が食品安全委員会の方針としては、外来の遺伝子がどのような形で挿入されているのか疑問の余地なく説明する必要がございますので、この点を。

もう一つ、●●●のところにもやはり明確なシグナルができて出ておまして、これは宿主由来の配列ではないかと推測とありますが、宿主由来であれば宿主の上では1コピーで、●●●というのは何か説明をいただかないと納得し難いのですが、この辺についてはいかがでしょうか。

○笠井氏 シグナルの強さについては考察が見つかっておりませんので、確認をさせていただきます。

これと違うサザンの菌株の構築途中のレポートがございまして、そちらはブランクとして外来遺伝子を挿入する前の菌株です。30ページの菌株の名前で言いますと、RB11という菌株から取ったゲノムと一緒に分析しているものが別のレポートでございまして、そこからこの●●●のものは入っていなかったもので、それはきちんと入ったものと入っていないものとの選り分けができていますと考えております。

しかし、●●●のほうに関してはそこでも出ているので、それで宿主由来だと確認されているようなのですが、先生がおっしゃったバンドの強さについては一度確認をさせていただきます。

○中島座長 ありがとうございます。よろしく願いいたします。この辺、疑問の用地なく明らかにしていただくというルールになってございますので、御理解いただければと思います。

それから、シーケンス結果で、添付資料の中にありました●●●の予期せぬ断片がこの混入しているということなので、これがどこにあるのか。もしゲノムに組み込まれているのであれば、●●●の遺伝子であればどれも全て安全というわけではなくて、その組

み込みの形と、どこにどのような形で組み込まれていて、それでORF検索等を行って、その組み込みによって妙な配列ができていないかどうかといった一連の手続が必要になります。この辺についても明確にさせていただきますでしょうか。

○笠井氏 承知しました。ありがとうございます。

○中島座長 先生方、せっかく申請者に直接来ていただいておりますので、ほかに指摘すべき事項等がございますでしょうか。

アレルゲンデータベースの話はまだでしたか。失礼しました。

23ページ、供与体のアレルギー誘発性について、これはアレルゲンのデータベースが2019年のものを書いてあって、一応最新のものであるというルールでありますので、これが最新ならいいのですけれども、もしもっと新しいバージョンが出ていましたら、それを用いて検索をやっていただけるとありがたいと思います。

○笠井氏 承知しました。

○中島座長 先生方、ほかにございますでしょうか。よろしいでしょうか。

では、笠井さん、お疲れさまでした。ありがとうございました。

○笠井氏 ありがとうございます。失礼いたします。

(申請者退室)

○中島座長 それでは、審議を再開したいと思います。

結構重要なポイントである遺伝子の挿入位置等に関して疑問が残ってしまいましたので、これに対しては明確な答えをすると約束いただきましたので、この答えをいただけてから再審議ということにしたいと思いますが、先生方、これでよろしいでしょうか。

ほかに、この際ぜひ指摘しておくべきことなどはございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門参考人 先ほどの人工腸液の切れているのか、切れていないのかというところですが、頂いた紙ベースのものだとよく分からないのですが、電子ファイルのほうの25番の同じ図を見ると、そちらのほうは色調がちょっと明るくなっていて、該当する部分にバンドが見えるので、分解していると言ってもよろしいのではないかなという印象は抱きました。紙ベースのものは本当によく分からなくて、目を凝らさないと見えないのですけれども、電子ファイルのほうだと比較的に見やすいのではないかなと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

それについては、電子ファイルも微妙と言えは微妙だけれども、紙よりは遥かにちゃんと見えますねという感じなので、これについては、申請者側からの遺伝子に関する回答をいただいたときにまた改めて審議しようと思います。

○川西委員 よろしいですか。

今、少なくともこの紙ベースのもので分からなかったのは私の目のせいではないということが分かりました。

それで、私、これは傾向としては、1分、2分、3分と時間経過を経て壊れているなどというのは判断していいのではないかと思います。1分で壊れたと言われると、実験条件の検討をやってくださいと言いたいところなのですけれども、時間経過からいったら、だんだん壊れていっているし、これは物すごくクリティカルな話かといえばそうでもない。先ほどの挿入の話はとても重要ですが、こちらはそこまで追究することでもない。胃液で完全に分解されているし、熱でも分解されています。今回は人工腸液でも分解しているということはこれで分かるので、私自身はいいだろうと思います。

○中島座長 どうもありがとうございました。

私も、人工胃液ではちゃんと分解されているので、たとえ人工腸液で分解されていなくても安全性は確認できるのかなと感触としては思っておりまして、次回、それは改めて議論したいと思います。

ただ、あえて言うならば、このデータをもって1分で分解したという記述を許していいのかどうかというのはまた別問題で、そこはもうちょっと厳密に正直に記載していただければ。それでも我々は安全性は確認できるのではないかなとは思っておりますが、次の機会のときに専門の先生方の御意見をいただいて議論したいと思います。

それでよろしいですか。

○川西委員 今の座長のお話は感服しました。

○中島座長 ほかにございますでしょうか。

では、この件は宿題をもって持ち越しということにさせていただきます。

早速ですが、2件目に行きたいと思います。新規品目であります「JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼ」について審議を行いたいと思います。

では、事務局のほうからお願いいたします。

○山口係長 それでは、御説明させていただきます。

灰色のファイル、JPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼというものをお手元に御準備ください。

まず、2ページをお願いいたします。

第1-1でございますが、名称は α -アミラーゼ（SP961）です。その上に記載されておりますが、SP961は既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた α -アミラーゼ（2002年2月21日官報掲載）というものでございます。

反応特異性は、アミロース、アミロペクチン等の α -1,4-Dグルコシド結合をエンド型で加水分解するものです。

(2) 製造方法ですが、生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製等の工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、SP961は、デンプンからデンプン等を製造する際に加工助剤として用いられます。

次のページをお願いいたします。

(4) 摂取量です。こちらでは、砂糖・甘味料の摂取量、 α -アミラーゼの添加量等の値を基に算出しました結果、我が国における人体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行っております。その結果ですが、amyBE2330の1日最大摂取量は4.3 μ g TOS/kg 体重/日となっております。

続いて、第1-2、宿主でございますが、(1) 宿主の種名等は、*B.licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNAの供与体の種名ですが、こちらはその次のページの表1を御覧ください。

amyBE2330遺伝子は、*G.stearothermophilus* ATCC7953株由来。その下のprsA遺伝子は、*B.licheniformis* Ca63株由来でございます。そのほかに、プロモーター、ターミネーター、転写調節配列等についても併せて表に記載されております。

次のページをお願いいたします。

(3) 挿入DNAの性質でございますが、こちらは図1に示しているとおりでございます。

●●●遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入し、そのうち、●●●遺伝子座に対しましては、残存したマーカー遺伝子を欠失導入用ベクターを用いて除去してありまして、●●●遺伝子座にamyBE2330遺伝子発現カセット、また、別の遺伝子座に対しましてprsA遺伝子発現カセットを挿入しております。

少し飛びまして11ページ、第1-5をお願いいたします。こちらが組換え添加物の性質等です。

(1) 有効成分は α -アミラーゼ、反応特異性についてはこちらに記載のとおりです。

続いて、(2) の製造方法から(4) までは記載のとおりでございます。

続いて13ページ、1-6ですが、表4においてamyBE2330とSP961の比較をしております。アミノ酸残基数や分子量、至適pH、温度を記載しております。

これについてなのですが、机上配布資料2を御覧ください。

事前にコメントをいただきまして、表4の下のところにはSP961とamyBE2330の違いが分かるように申請者に追記してもらいました。SP961のほうは組換えのものでございまして、既に安全性審査の手続を経た旨のものであることが分かるような内容を記載しております。また、amyBE2330とSP961を比べたときに●●●されまして、●●●ことも追記してもらっております。

それでは、紙ファイルのほうにお戻りください。

1-6の(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、JPBL007株においてはamyBE2330遺伝子が●●●、prsA遺伝子は●●●となっております。

続いて、少し飛びまして18ページをお願いいたします。

第4-2の(1) 挿入遺伝子のクローニング及び合成方法に関する事項でございます。

まず1つ目ですが、amyBE2330遺伝子です。*G.stearothermophilus* ATCC7953株由来の α -アミラーゼ遺伝子をPCRで増幅することにより、当該遺伝子の野性型配列を取得し、また、●●●遺伝子がコードするアミノ酸配列で●●●が起こるように、PCRを用いた位

置特異的変異導入法により改変を加えております。さらに、Ca63株の●●●遺伝子のシグナル配列が付加されております。

隣の19ページをお願いいたします。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。*amyBE2330*遺伝子は、 α -アミラーゼ活性を有する*amyBE2330*をコードし、アミロースやアミロペクチン及び同様の結合を持つグルコース重合体の α -1,4結合の分解を触媒し、デキストリンやオリゴ糖を生成させる酵素でございます。

*amyBE2330*の α -アミラーゼ活性ドメインには、酸性条件下での耐熱性向上の目的でアミノ酸置換が加えられております。

続きまして、21ページをお願いいたします。

3) 物理化学的処理に対する感受性に関する知見でございます。

まず、①人工胃液でございますが、こちらはSDS-PAGE及びウェスタンブロットで分析した結果、人工胃液処理開始後30秒以内に完全に消化されることが示されております。

次のページをお願いいたします。

②人工腸液でございますが、6時間の処理ではほとんど消化されないことが示されたということです。

続きまして23ページ、③加熱処理に対する感受性ですが、110℃で完全に失活することが示されております。

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です。こちらでは既知のアレルゲンとの相同性検索を行っております。

まず①の条件ですが、*amyBE2330*と既知のアレルゲンであるAsp o 21及びAsp o 21.0101と相同性を示しました。Asp o 21は*A.oryzae*由来のTAKAアミラーゼでございますが、Asp o 21は食物アレルゲンとしては登録されておらず、吸入をばく露経路とする呼吸器感受性のアレルゲンでございます。

次のページをお願いいたします。

24ページの上ですが、②の条件ではヒットするものはございませんでした。

続きまして、第4-3から第4-5までは記載のとおりでございます。

少し飛びまして、30ページをお願いいたします。

第4-6、DNAの導入方法です。初めに、標的遺伝子座に対しましてマーカー遺伝子発現カセットを挿入し、次に一部の遺伝子座のマーカー遺伝子を除去するために欠失導入用ベクターを用いております。*amyBE2330*の産生量を促進するために、*prsA*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターpJPV035を菌体内に導入することで標的遺伝子座に挿入され、さらに*amyBE2330*を持つ遺伝子導入用ベクターpJPV034を菌体内に導入し、こちらも標的遺伝子座に遺伝子発現カセットが挿入されております。

続いて、33ページをお願いいたします。

第4-7の項目です。遺伝子導入用ベクターpJPV034及び035はエリスロマイシン耐性遺伝

子を持ちますが、ループアウトで脱落するため、宿主の染色体には導入されません。また、●●●遺伝子座に導入されたマーカー遺伝子発現カセットにはネオマイシン耐性遺伝子が存在しますが、欠失導入用ベクターが挿入された後のループアウトによって脱落いたします。したがって、JPBL007株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在いたしません。

次のページをお願いいたします。

第5の項目です。

まず34ページの2-(1)でございますが、シーケンス解析について記載されております。挿入領域の塩基配列はシーケンス解析により確かめられ、その結果、●●●遺伝子座に*amyBE2330*遺伝子発現カセットが●●●挿入されており、●●●遺伝子に*prsA*遺伝子発現カセットが●●●挿入されていることが示されました。

続いて、37ページをお願いいたします。

5-2-(2)といたしまして、遺伝子導入におけるORFの有無について記載されております。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として検査を行いました結果、●●●検出されております。

これらのORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために、相同性検索を行っております。

続いて、38ページをお願いいたします。

まず①の条件での検索ですが、●●●遺伝子座において検出された*amyBE2330*を含むORFが既知のアレルゲンであるAsp o 21及びAsp o 21.0101との相同性を示しました。これについての考察は先ほどと同様のものがございます。

また、●●●遺伝子座においても、検出されたORFの一つがマツの一種 (*Pinus koraiensis*) が有する既知のアレルゲンと相同性を示しましたが、当該ORFは宿主染色体の塩基配列から得られたORFであり、遺伝子導入により新たに生じたものではありませんでした。

②の条件ではヒットするものはございません。

次の39ページをお願いいたします。

既知の毒性タンパク質との相同性検索ですが、*E-value*10⁻⁵を指標にして検査を行いました結果、3ポツ目の●●●遺伝子座において●●●がNCBIデータベースの毒性タンパク質に部分的な相同性を示しましたが、相同性を示した配列は遺伝子導入により新たに生じたものではなく、●●●の配列ということでした。

以上のことから、遺伝子導入により新たに生じたORFが発現したとしても、*amyBE2330*製品中にアレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられるとしております。

続いて40ページ、第6の項目です。製造原料等に関する事項が記載されておりますが、製造原料等は全て長年安全に使用されてきた実績がある旨が記載されております。

続いて、第7の項目です。

まず、7-1でございますが、欧米等で2019年に販売が開始され、従来の α -アミラーゼと同様に、デンプンからデンプン糖を製造する際に加工助剤として用いられている旨の記載がございます。

また、カナダ、米国での状況について記載がされております。

続いて、7-2でございます。こちらですが、42ページ下の結論にありますとおり、amyBE2330製品には生産菌株由来のDNAが残存しないことが確認されたとしております。

続いて、7-3でございますが、試験バッチの分析の結果、我が国の食品添加物等の規格基準に定める規格値を全て満たしている旨の結果が示されております。

続いて、44ページをお願いいたします。

第7-4ですが、5行目、6行目からありますとおり、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色及びウェスタンブロット分析で示されているように、こちらでタンパク質の純度は極めて高いという記載がされております。

7-5は記載のとおりです。

第8ですが、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としております。

申請資料の説明は以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、先生方から御意見をいただきたいと思っております。

本申請はノボザイムズジャパンから何度も出ているようなパターンのものでございまして、挿入遺伝子の*Geobacillus stearothermophilus*は、昔は*Bacillus stearothermophilus*という大島泰郎先生が伊豆の温泉から取ってきたものだと思うのです。非常に有名なものだと思うのですが、これに由来の高温に耐性あるアミラーゼでして、デンプン産業ではお湯にするとアミラーゼは水によく溶けるようになりますので、温度が高いほうで有利ということで、昔から耐熱性のアミラーゼが探索されて実用に供されております。

今回のはもともと使われておりました耐熱性のアミラーゼSP961を、今度は酸性領域で耐熱性にしたいということで、これは●●●しまして、さらに●●●したということではありますが、元は基本的には変わっていない。

*B.licheniformis*も彼らがよく使っておるもので、この株そのものは何度も本調査会で審議されております。これは●●●遺伝子座にマーカーを使って、インテグラーゼを使って導入した後、今度はマーカーを除去して入れ替えているという方法です。これも何度も紹介されておまして、この手法そのものについてはまた使っている遺伝子についても1度や2度や3度や4度は本調査会で審議しております。

今回の*prsA*は分泌量を増やすための*licheniformis*自身の遺伝子です。これは外来ではなくて、●●●座に今回つくった発現カセットを導入したというものでございます。

私も実はそんなに疑問なところはなかったのですが、先生方、それほど大部の申請書ではございませんので、全体を通しまして、どこか疑問のところ、御意見等がございました

ら、ぜひよろしく願いいたします。

必須ではないのですが、最後の44ページで、純度はいつも気にしているのですけれども、極めて高純度とだけ書いてあって、社内文書を見てもないかなという感じなのですが、失礼いたしました。●●●とあって、SDS-PAGEもついていて、何%と数字で報告されていないだけで、純度は十分高そうかなという感じでした。

先生方、ほかにございますでしょうか。

従来品と今回の申請品との海外での販売実績などのつけてくると思ったのだよね。これはもともとあったか。なので、海外でも既に販売実績は1年ちょっとあるということのようです。

私はこれでいいかなと実は思ったのですが、先生方、いかがでしょうか。

小関先生、いかがですか。

○小関専門委員 私もいいというか、これで問題ないというものはさくっといってしまっていていいのではないのでしょうか。そういうふうにしていかないとただ長くなるだけで、あまりよろしくないと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

山川先生、何かお気づきの点等はございますか。

○山川専門委員 さらっと読めて、特に問題はなかったです。

○中島座長 ありがとうございます。

いつも細かいところを見てくださる小野先生、これは何か気がついたところはございますか。

○小野竜一専門委員 私ですか。小野先生は2人いるので。

○中島座長 ごめんなさい。竜一先生のほうでお願いします。道之先生は植物の先生なので、植物のときにお聞きしようかと思えます。

○小野竜一専門委員 アレルギーデータベースとかもバージョン21を使っていて、これは2021年の2月更新ということなので、最新を使っているということなので、そういう点でもよろしいのではないのかと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、先生方、特に安全性について懸念はないと判定してよろしいでしょうか。意思確認をお願いいたします。

(同意の意思表示あり)

○中島座長 ありがとうございます。全員の同意が確認できましたので、安全性については問題ないと判定したいと思います。

では、評価書案の審議に入りたいと思います。お願いいたします。

○山口係長 それでは、評価書案について御説明させていただきます。

評価書案を束ねた冊子の下にページ数を打っておりまして、17ページからが本 α -アミラ

ーゼの評価書になります。

まず、22ページをお願いいたします。

22ページの「I. 評価対象添加物の概要」でございます。本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主としまして、*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953株由来の α -アミラーゼ遺伝子を導入することで作成しましたJPBL007株を利用して生産された α -アミラーゼでございます。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素であり、デンプン糖製造に使用されます。

続いて、「II/食品健康影響評価に関する事項」です。

まず第1の1の(1)でございます。名称は α -アミラーゼ (SP961)。

(2) 製造方法でございますが、SP961は、培養、ろ過等の工程を経て製造されます。生産菌は除菌ろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、デンプン糖製造において、主に液化の工程でSP961を添加することでデンプンがデキストリンまで分解されるため、デンプン糖製造を目的に加工助剤として使用されております。なお、デンプン糖製造工程において、SP961は取り除かれます。

(4) 摂取量です。全ての砂糖・甘味料の製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は4.3 μ g TOS/kg 体重/日でございます。

続いて、2の(1) 宿主ですが、*Bacillus licheniformis* Ca63株です。

(2) DNA供与体の種名ですが、*amyBE2330*遺伝子の供与体は*G.stearothermophilus* ATC7953株、*prsA*遺伝子の供与体は*B.licheniformis* Ca63株です。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*amyBE2330*遺伝子は、*G.stearothermophilus* ATCC7953株由来の*amyBE2330*をコードします。*prsA*遺伝子は、菌体外分泌を促進する細胞膜タンパク質であるPrsAタンパク質をコードいたします。

*amyBE2330*遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主の標的遺伝子座に導入しております。*prsA*遺伝子発現カセットは相同組換えにより標的遺伝子座に導入しております。

続いて、3.食経験等ですが、こちらは記載のとおりです。

4.宿主の構成成分ですが、*Bacillus licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症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に相当します。

続いて、5ですが、(1) 製品名は*amyBE2330*、有効成分は α -アミラーゼでございます。

続きまして、(2) から(4) までは記載のとおりでございます。

続いて、6の(1) ですが、*amyBE2330*と従来の α -アミラーゼ (SP961) との相違点は、アミノ酸残基数、推定分子量、至適温度及びpHが異なる点でございます。

(2) 組換え体と宿主です。JPBL007株と宿主の相違点は、JPBL007株には*amyBE2330*遺伝子が導入され、 α -アミラーゼの高産生性を獲得している点、*prsA*遺伝子を導入して

いる点及び α -アミラーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失している点でございます。

以上のことから、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をし、以下の事項について評価を行っております。

第2.宿主に関する事項、第3.ベクターに関する事項は記載のとおりでございます。

続いて、第4の項目です。

1は記載のとおりでございます。

2の(1)ですが、*amyBE2330*遺伝子は*G.stearothermophilus* ATCC7953株よりPCR法により取得した α -アミラーゼ遺伝子に位置特異的の変異導入法を用いて複数のアミノ酸が置換及び欠失する改変を加えております。*B.licheniformis* Ca63株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列が付加されております。

(2)は記載のとおりです。

(3)挿入遺伝子の機能に関する事項です。*amyBE2330*遺伝子がコードする*amyBE2330*は、デンプンの α -1,4-グルコシド結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素でございます。*amyBE2330*の α -アミラーゼ活性ドメインには酸性条件下での熱安定性の向上を目的としてアミノ酸置換が加えられております。

a.挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発に関する知見及び、b.遺伝子産物について、アレルギー誘発性に関する知見は記載のとおりでございます。

続いて、c.遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見ですが、人工胃液では試験開始後30秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示されております。人工腸液では6時間の処理においても完全に分解されないことが示されております。加熱処理ですが、110℃の処理によって完全に失活することが示されております。

続いて、d.遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見です。*amyBE2330*と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして真菌由来のアレルゲンが認められました。一方、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されませんでした。

こちらの詳細については、5-2-(2)に記載のとおりでございます。

②は記載のとおりです。

続いて、3、4、5の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

少し飛びまして、29ページの333行目をお願いいたします。意図する挿入領域でございますが、遺伝子導入用ベクターpJPV034及び035のそれぞれ*amyBE2330*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットを含む領域でございます。

(4)は記載のとおりです。

続いて、6.導入方法でございます。宿主ゲノムの各標的遺伝子座に対しまして、あらかじめマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えに導入し、各マーカーにより選抜をしてお

ります。

その後、遺伝子導入用ベクターpJPV034を導入し、インテグラーゼの作用によって *amyBE2330* 遺伝子発現カセットを挿入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜しております。各標的遺伝子においては、*cry3A* mRNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、インテグラーゼ遺伝子、インテグラーゼ認識配列及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落しております。

続いて、宿主ゲノムの標的遺伝子座にあらかじめマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、マーカーにより選抜をしております。次に、遺伝子導入用ベクターpJPV035を相同組換えにより導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜しております。その後、*cry3A* mRNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落しております。

7.抗生物質耐性マーカー遺伝子に関してですか、遺伝子導入用ベクターpJPV034及び035は、エリスロマイシン耐性遺伝子を持ち、染色体に挿入されますが、ループアウトで脱落するため、宿主の染色体には導入されません。また、生産菌株に抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在しないことをシーケンス解析により確認しております。

続いて30ページ、第5.組換え体に関する事項です。

1は記載のとおりでございます。

2の(1)ですが、*amyBE2330* 遺伝子発現カセット及び*prsA* 遺伝子発現カセットの標的遺伝子座での導入位置を確認する目的で、シーケンス解析を行いました結果、設計どおり挿入されていることが確認されております。

続いて、(2) ORFの有無でございますが、各標的遺伝子座における挿入DNA並びにこれらの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行いました。また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えについて、異種遺伝子断片の残存する遺伝子でも同様にORF検索を行っております。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アミノ酸以上の配列が合計で270個検出されております。

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を用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンAsp o 21及びAsp o 21.0101並びにPin k 2.0101が検出されております。しかしながら、Asp o 21及びAsp o 21.0101は吸入をばく露経路とする呼吸器誘発性アレルゲンであり、Pin k 2.0101は宿主染色体の塩基配列から得られたORFであることから、食物アレルギー誘発性の懸念は小さいと考えられた。

なお、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められませんでした。

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調べる目的で、*E-value* 10^{-5} を指標として検索を行いました結果、データベース中の既知のタンパク質と

相同性を示したORFが認められましたが、遺伝子導入により新たに生じたものではないことから、毒性を有する可能性は低いと考えられたとしております。

第6は記載のとおりでございます。

第7、まず1.諸外国における認可の状況でございますが、amyBE2330製品は、2019年から欧米を中心に販売され、食品用加工助剤として用いられております。カナダでは食品添加物のポジティブリスト、米国ではGRASのリストにそれぞれ収載されております。

続いて2、amyBE2330製品中に組換えDNAの残存がないことをドットブロット解析により確認しております。

3、4、5及び第8については記載のとおりでございます。

評価書の説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして、御意見、コメント等はございますでしょうか。

細かい字句の修正などお気づきのことがありましたら、事務局のほうまで直接お伝えいただければと思います。

よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、議題1についてはこれで終わりたいと思います。

議題2「その他」ですが、事務局から何かございますでしょうか。

○松原課長補佐 特にございません。

○中島座長 ありがとうございます。

本日の議題についてはこれで終了しました。

以上をもちまして、第221回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。

お疲れさまでした。お忙しいところ、ありがとうございました。