

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第230回) 議事録

1. 日時 令和4年11月28日(月) 13:58~15:36

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
- ・ ROM株を利用して生産された $\alpha$ -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、小野道之専門委員、小野竜一専門委員、  
近藤専門委員、佐々木専門委員、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、脇委員

(事務局)

鋤柄事務局長、中事務局次長、前間評価第二課長、井上評価情報分析官、  
松原課長補佐、奥藤評価専門官、山口係長、今村技術参与、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 ROM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ

### 6. 議事内容

○中島座長 皆さんおそろいなので、始めようかと思えます。ただいまから第230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「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、所用により、樋口専門委員は御欠席です。

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

本日は、「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、どちらも継続品目として「DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ」と「ROM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す。

お手元の資料を確認したいと思います。事務局からお願いいたします。

○松原課長補佐 それでは、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でございます。

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、「ROM株を利用して生産されたα-アミラーゼ」の申請者であるDSM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予定としています。よろしく申し上げます。

○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、報告をお願いします。

○松原課長補佐 事務局におきまして、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。

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、審議に入ります前に、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。

○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してください。

2点目、発言の際は赤い挙手カードを提示いただくか、Web会議画面の挙手ボタンを押してください。

座長よりお呼びいたしますので、マイクをオンにして、お名前を御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

をすることにより改善する場合もございます。

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、全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話をお願いします。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますので、青い同意の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。どうぞよろしくお願いたします。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、早速ですが、継続品目であります「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。

本品目、今年1月の専門調査会において審議を行ったものです。

それでは、事務局から説明をよろしくお願いたします。

○山口係長 それでは、御説明をさせていただきます。

本件については、本年1月の専門調査会におきまして御審議いただいた際に申請者に対して先生方から幾つか御質問、御指摘をいただいたところですが、今般その内容を踏まえて申請資料の修正がなされておりますので、該当部分を御説明させていただきます。

それでは、申請資料について御説明をさせていただきます。こちらの黄色のファイルを御用意ください。まず本品目に関して簡単に御説明をさせていただきます。このファイルの黄色いタブのほうを開いていただきますと修正後の申請要旨がつづられてございますので、こちらの4ページを御覧ください。

本申請の添加物は、メタノール資化酵母 *Ogataea polymorpha* RB11株を宿主として、*Fusarium heterosporum*の野生型ホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製したDIDK-0176株により生産された組換えDNA技術応用ホスホリパーゼであるということでございます。こちらの用途につきましては、製菓用途、特にケーキのボリュームや柔らかさを向上させる品質改善を目的とした加工助剤の用途を想定しているということでございます。また、本申請品目であるKLM1に関しては、ケーキの焼成過程において失活するというところでございます。最終食品であるケーキには活性を保持した状態で残存しないということでございます。

それでは、いただいた指摘事項とそれに対する回答につきまして御説明をさせていただきます。戻りまして、表紙を開いて1ページ目をお願いいたします。指摘事項1でございます。これは製造方法に関する部分に関しての御指摘でございます。メタノール資化酵母を用いていることから、培養時のメタノール添加の有無を明記することという御指摘でございます。こちらに関する申請者からの回答といたしましては、*Ogataea polymorpha*はメタノールではなく、グリセリンを用いると今回の目的遺伝子の発現力が高くなるということが知見としてあるとのことですので、これに関する参照文献、参照資料を追加の上、要旨にこのことについて追記しているということですので回答が来てございます。

続きまして、2ページ目をお願いいたします。指摘事項2、遺伝子組換え添加物と従来の

添加物の項についての指摘でございまして、性質などの違いを記載するとともに、アミノ酸配列の相同性を図示することという御指摘でございました。

これについての回答は、2ページから3ページに記載のとおり図や表について要旨に追記がされてございます。

続きまして、3ページ、指摘事項3でございまして。こちらは要旨17ページと書いてございますが、新しく提出された修正版の要旨では18ページから19ページに該当する箇所がございます。*HARS1*配列について、ベクターDNA全体が染色体に導入されているため、ベクターが独自に増殖する可能性はないと考えられると、こちらの18から19ページにおいては記載されているところがございますが、一方で、別のページ、第1-2-(2)においては、遺伝子導入用ベクターの複製に必要という記述があることから、同一の申請資料内で矛盾しているように思われるため、整合性が取れる内容へ修正することという指摘でございました。

こちらに対しての回答につきましては、*Ogataea polymorpha*では*HARS1*自律複製配列によって*URA3*遺伝子を含むプラスミドが自律複製をし、ゲノム染色体に組み込まれ、ウラシル非栄養要求性の改変株を得ることが知られているという知見について文献を追加して引用をしております。それについて3ページから4ページに記載のとおり記述を要旨に追加するという回答が来てございました。

本箇所につきましては、事務局及び座長、そして兎玉専門参考人からも事前に御質問等をいただいております。こちらの修正については*HARS1*配列がDNA全体に染色体に導入されると独自に増殖しなくなる。加えてプラスミドの状態でも残らないということについてももう少し丁寧な説明を追加することの質問をさせていただいたのですけれども、このことについての回答につきましては、机上配布資料1、指摘事項3の回答として黄色マーカーのとおり記述をもろもろ修正していただいておりますので、御確認いただければと存じます。

続きまして、4ページをお願いいたします。指摘事項4でございまして。挿入遺伝子の機能に関する事項に対する御質問で、アミノ酸配列を記した表において、 $\alpha$ 因子プレプロタンパク質分泌シグナルペプチドが示されてはいたのですけれども、こちらは●●●配列でありまして、シグナルペプチド以外の役割を含めて正確に記載をすることといった御指摘がございました。

これに対する回答といたしましては、次の5ページに記載の●●●のとおり、●●●が*Saccharomyces cerevisiae*の $\alpha$ 因子分泌シグナルペプチドでして、●●●が*Saccharomyces cerevisiae*の $\alpha$ 因子プレプロペプチドであることを確認したということでございます。このとおり要旨を修正したということでございます。

また、以前の要旨において●●●ということでございます。これについては修正をしたということでございます。

続きまして、7ページをお願いいたします。指摘事項5でございまして。挿入遺伝子の供与

体のアレルギー誘発性に関する事項について、こちらはWHO/IUIS Allergen Nomenclature及びPubMedでの検索が、2019年であることから、最新のデータベースに基づく検索を行うことということで御指摘いただいております。回答としては、本年の2022年3月31日に改めて検索を行ったということでございます。その結果、新たなヒットはなかったということで回答が来てございます。

続きまして、8ページをお願いいたします。指摘事項6、KLM1の人工消化液処理結果ということでございまして、以前、人工腸液中で1分以内に消失することが示されたと記載がございましたが、これに関して経時的な変化を踏まえてより正確な記載をすることという指摘をいただいております。

こちらへの回答につきましては、もう一度チャート原本でバンドの状態を再確認したところ、処理時間2分間において分解終了と見ることもできますが、処理時間20分であればバンドが完全に消失しているということございまして、これを踏まえて当該箇所の記述について、KLM1のバンドは人工腸液中で2分以内にほぼ消失し、さらに20分以内に完全に消失するといった形で修正して提出がされてございます。

続きまして、指摘事項7でございます。宿主との差異に関する事項についてでございますが、サザンブロット法によるKLM1遺伝子安定性評価結果において、●●●のバンドがこちらの結果で検出されていることから、検出されたバンドの構成要素について説明を追記することという指摘がございました。

こちらにつきましては、回答といたしまして、ベクター上のKLM1遺伝子には、●●●直列につながって、合計97コピーが組み込まれている状態であるということ、これは11ページ、図1に記載があるとおりのことございまして、

これらの●●●を次世代シーケンサーで決定したDIDK-0176株染色体配列で確認をしたということございまして、これら指摘のございました配列長のものにつきましては、それぞれのバンドに該当するという回答が来てございます。この説明につきまして、当該箇所に追記をするということ、回答されてございます。

続きまして、12ページをお願いいたします。指摘事項8でございます。こちらにつきましては、指摘事項3と関連するのですけれども、KLM1遺伝子発現カセットが、ゲノムの1か所に97コピー挿入されているということございまして、これについてプラスミドとして残って存在する可能性を否定できる根拠を示すことという指摘でございました。

回答につきましては、*Ogatae polymorpha*は、異種のタンパク質の遺伝子発現カセットを染色体へ直列に100や120コピー組み込むことができるものであるという知見があるということ、これについては文献が追加されているということございまして、

また、本申請品目の株の染色体を次世代シーケンサーで配列決定したところ、●●●なかったということございまして。この配列決定に用いたDNAについては、ゲノムDNAだけではなく、仮に本株の株内にプラスミドpB14-CGSsyntが残存している場合には、このプラスミドのDNAも抽出、精製できる条件において調整をしているということござい

す。

この結果から、提出時参照資料29の全ゲノム解析の報告書の最後に記述したように、プラスミドpB14-CBSyntは残っていないと考えられるということで記載がございまして、このことについて要旨へ追記をしているということでございます。

これにつきましても、先ほどの指摘事項3と併せて事前質問をさせていただいております、こちらについても同じような指摘事項を追加させていただいております、加えて、児玉専門参考人より、プラスミドが残らないということを書くべき箇所であるために、プラスミドとしては残存しないというふうな文章を要旨に追加するべきということで指摘させていただいております、これにつきましても机上配布資料1の1番、指摘事項3の黄色マーカー部分のような形で文を修正してございます。

机上配布資料1に併せて、これは参考資料と被っているのですけれども、机上配布資料2と3につきましては、机上配布資料1のマーカーの修正に合わせて、既にお配りしている参考資料にコメントが追加されたものとして改めて提出があった参考資料になりますので、こちら併せて御確認いただければと存じます。

続きまして、戻りまして、指摘事項9、15ページをお願いいたします。先ほど申し上げた全ゲノム解析報告書において、大腸菌由来の断片●●●が混入されていたとの記載がありましたけれども、この当該断片がどこにどのような形で組み込まれているかというのを記載するとともに、当該断片によって新たに生じる可能性のあるORFを同定・検索し、安全性の評価データを提出するとともに、その結果を要旨に記載することという御指摘がございまして、こちらの回答といたしましては、大腸菌由来の●●●のDNA断片については、●●●、前回の提出時の参考資料17、今回で言うと19番にずれるのですけれども、こちらのORF解析報告書のFigure 1に示されているということでございます。

この●●●に関する新たに生じるORFの既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性の評価と安全性の確認については、既に前回提出がされているORFの解析に含まれているということでございまして、このことについて要旨に追記をしているということでございます。

また、第4-5-(4) 発現ベクターの純化に関する事項において、ベクター精製工程において*E.coli*由来の●●●のDNA断片の混入の可能性が否定し切れないということについて脚注を入れて補足をしているということでございます。

そして、この16ページの下半分のように追記されたということでございます。

こちらの追記箇所について、事前に児玉専門参考人より御意見をいただいております、この追記の仕方ですと、当該記述をそのまま読み取ると*KLMI*遺伝子をpB14に組み込む際に大腸菌の断片が生じて、完成したベクターをきちんとクローニングして生成してないというふうにとられてしまいかねない書き方なので、修正したほうがいいのではないかとということで御指摘いただいております。これを踏まえて、机上配布資料1の3ページの下の方、黄色マーカーの部分のとおり記述を修正して資料として提出していただいております。

す。

指摘事項のほうに戻っていただきまして、17ページをお願いいたします。これは修正事項として、前回御指摘をいただいたものでございまして、これは誤記の修正になります。テトラマイシン耐性 (tet) という記載があったのですけれども、これはテトラサイクリンの間違いになりますので、これについて修正がされているところでございます。

また、ほかにも本要旨については誤記が複数ございましたので、これも全体的に見直しをいただいて、まとめて修正がされてございます。

本品目の説明につきまして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、それぞれの修正箇所につきまして御意見いただきたいと思います。まず、指摘事項1、製造方法でメタノール資化酵母を用いていることから、培養時のメタノール添加の有無について明記すること。この株についてはグリセロールで誘導するということ、それから、ギ酸デヒドロゲナーゼのプロモーターなのでグリセロールで強発現するということが説明がございました。質問されたのは児玉先生ということですが、児玉先生、これでよろしいですか。

○児玉専門参考人 この修正でよろしいと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。私もこれでいいかと思えます。

先生方、よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項2です。組換え添加物と従来添加物、性質などの違い、要旨に記載するとともに、アミノ酸配列の相同性について分かりやすく図示してくれと、これは私が要求しまして、5ページにちゃんと図が出てきて分かりやすく記述されておりますので、いいかなと思います。

ほかに先生方、この点につきましてございますでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項3です。宿主依存性に関する事項で、*HARS1*配列について、ベクター-DNA全体が染色体に導入されているため、ベクターが独自に増殖する可能性はないと考えたと記載されている一方で、要旨では遺伝子導入用ベクターの複製に必要とあり、矛盾していることから、整合性が取れる内容に修正すること。

これは内容が指摘事項8とも重なっておりますので、両方一遍に審議したいと思いますが、要旨の33ページには、制限酵素の切断地図に関する事項で*KLMI*遺伝子発現カセットがゲノムの1か所に97コピー挿入されているとしているが、プラスミドとして存在する可能性を否定できる根拠を示すこととありまして、これはいずれもプラスミドとしては存在しない。内容について、直接はデータとしては次世代シーケンサーのデータが矛盾しないということ。それから、この株、*Hansenula polymorpha*の遺伝子組換えに関する論文が2報添付されておりました。

*HARS1*というのは、先生方御存じのとおり、染色体上では数百kbpに1か所ずつ存在す

る複製開始起点でして、S期になるとそこから一斉にDNAの複製が始まります。なので、この領域と、それからマーカー遺伝子を1個のプラスミドの上に載っておきますと、S期にDNAも同時に複製されてプラスミドとして保持されると。この辺の研究、*Saccharomyces cerevisiae*においてかなり進んでおまして、*cerevisiae*ですとこのタイプのHARS系のプラスミドは染色体に組み込まれるということはまずないのです。なので、私も指摘事項8などのような指摘をさせていただいたのですが、これは当然、酵母の株によって事情が違いまして、彼らの提出していただいた文献2つを私も精査してみましたけれども、*Hansenula polymorpha*、今では名前が変わっているみたいですが、これですとHARSを含んだプラスミドは染色体上に、そのうちに多コピーで組み込まれてプラスミドとしては残存しないという論文が2つ添付されておりました。そういうことならと思うのですが、それでもこの株について直接プラスミドとして存在していない証拠はというと、次世代シーケンサーのデータが矛盾しないというだけではございます。

なので、指摘事項3と指摘事項8については、結局同じ回答、申請者の回答が同じですので一遍に審議したいと思ったわけですが、まず指摘事項3は、整合性が取れる内容に修正するというので、これは指摘事項8が解決すれば同時に解決するのですけれども、取りあえず、児玉先生、指摘事項3の記述についてはいかがでしょうか。

○児玉専門参考人 最初に提出された記述だとちょっとまだ何となくしっくりこなかったので、後でまた事務局にお願いして微修正していただいていますので、記述としては一応整合性の取れた形にはなった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。私も、何かちょっと奥歯に物が挟まったような表現に見えなくもないのですが、当初よりは分かりやすく、また、矛盾のない形になったと私も思います。この点については先生方、いかがでしょうか。

それでは、指摘事項8について、この発現カセットがゲノムの1か所に97コピー挿入されているとなっているけれども、プラスミドとして存在する可能性を否定できる根拠を示すこと。申請者らの回答については、先ほど私のほうからも説明したとおりなのですが、*Hansenula*だとか言うということで、それでもプラスミドとして存在する可能性を完全否定できたかということ、むしろここは、ここまでいくと悪魔の証明にもなるので難しいかなという気もするのですが、また、プラスミドとして残っていたとして、それが安全性に問題あるかということ、それは問題ない。ただ、プラスミドが残らないというふうに記録として残るので、それで後から実はやはりプラスミドとして一部残っていましたなどということになると、そこがまずいので、その辺をどう考えるか。私としては、もうちょっとすっきりした回答だとよかったかなと思わないでもないのですが、このくらいやってくれるならいいかなと思ってます。

これについて指摘されたのは、私のほかに山川専門委員、児玉専門参考人です。山川先生、いかがでしょうか。

ゲノムの1か所で97コピー挿入されているというので、プラスミドとして存在する可能性を否定できる根拠を示すことということで、最初に私のほうで意見を述べさせていただきました。これで完全に除けているかというところと多少疑問が残らないわけでもないのだけれども、*Hansenula*に関する論文も示してもらっているし、私は少々不承不承ではあるのだけれども、よいかたと意見を述べさせていただいたところです。先生の御見解をいただければと思います。

○山川専門委員 *Hansenula*は新しくまた何か出てくるかもしれないというのが実は私も不安がありましたが、この時点で分かる限りのことで述べていけばいいのかなという気はいたします。

以上ですが、どうでしょう。

○中島座長 ありがとうございます。

児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門参考人 座長のおっしゃるように、すっきりはしないのですけれども、安全性に係る部分についてはこの回答でも差し支えはないと思いますので、これでよろしいかなと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。三者三様ですが、言いたいことは一緒で、もうちょっとすっきりするといいは思うけれども、このくらいでいいんじゃないかということです。

ほかの先生方、この点につきましてはいかがでしょうか。よろしいですか。

ありがとうございます。

それでは、指摘事項4です。これは私のほうからで、 $\alpha$ 因子プレプロタンパク質分泌シグナルペプチドが示されているけれども、●●●ので、シグナル以外の役目を含めて正確に記載すること。●●●が小胞体に入るためのいわゆるシグナルペプチド、プレプロ配列で、●●●が小胞体を無事に通過するための $\alpha$ ファクターのプロ配列ということでちゃんと記載していただきましたので、私はこれでよろしいかと思います。

ほかの先生方、よろしいでしょうか。

では、よろしいですね。ありがとうございます。

指摘事項5になります。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性についてで、これは2019年なので最新のデータベースに基づいて検索をちゃんとやってくださいねということで、これは最新になっていましたよね。なっていたと思いますが、これを指摘されたのは小野竜一先生ですけれども、よろしいですか。

○小野竜一専門委員 大丈夫です。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

ほかにこの点につきましては、よろしいですか。よろしいですね。

それでは、指摘事項6、KLM1の人工消化液処理結果、人工腸液中で1分以内に消失することが示されたとしているが、経時的な変化を踏まえてより正確な記載をするということで、20分で完全消失する。もうちょっと厳密な書き方になっております。この御指摘は川西先生なのですが、先生、これでよろしいですか。

○川西委員 オーケーです。

○中島座長 オーケーということで、ほかの先生方、よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項7、サザンブロット法による*KLM1*遺伝子安定評価結果において、●●●のバンドが検出されていることから、検出されたバンドの構成要素の説明を追記すること。これは私と児玉先生の指摘です。ちゃんと説明は書いていただいております、ということなのかなと思います。これでもまだプラスミドとして存在する可能性を完全否定はできない気もするのですけれども、安全性については私はいいかなと考えます。

児玉先生、この点、いかがでしょうか。

○児玉専門参考人 サザンブロットのほうですけれども、一応説明されていますので、どうしてこうなったかなという仕組みもちょっと考えたことがあるのですけれども、安全性とは直結しないので、これでいいのかなと思いました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

ほかの先生方、よろしいでしょうか。

指摘事項8は済んでおりますので、指摘事項9、実はここが多分一番問題だったのだよね。参考資料29（全ゲノム解析報告書）で大腸菌由来の断片●●●が混入されたと記載されています。ということは、大腸菌の遺伝子も外来の遺伝子なので、この遺伝子がどこにどういう形で組み込まれていたか、ちゃんと書いてください。それから、これで生じる可能性のあるORFも同定・検索してアレルゲンなどの安全性評価データを提出するとともに、その結果をきちんと要旨に書いてくださいという指摘です。

これは私と小野竜一先生、児玉先生の指摘。これは何か実験がぬるくないかと思うのですけれども、挿入断片については位置情報、それからORFは、通常の注意義務を果たしたデータが提出されていると私は考えます。これでいいかなと思うのですけれども、竜一先生、いかがですか。

○小野竜一専門委員 挿入断片に関しても一応アレルゲン性はないということなので、大丈夫かと思えます。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

児玉先生、この点は。

○児玉専門参考人 リスク評価上はこれで問題はないと思います。ただ、当初の提出され

た回答だと、このプラスミドを作っている最中に混入した形で書かれていたので、そうすると最終的にできたプラスミドをきちんと確認していないというふうになってしまうので、それはちょっとまずいよねということで、書きぶりを少し修正していただきました。後からまたコメントを出しまして、少なくともそう読めないような形に修正していただきました。リスク評価上はこれで問題はないと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。それで修正された文章を私もチェックさせていただきました。確かにこういうふうには書かないと誤解を招くかなと考えました。

先生方、この点につきましてはいかがでしょうか。よろしいでしょうか。

あと修正事項、テトラマイシンなんて、いろいろとこの申請書はぬるいところがあるよなという感じだったのですが、その辺を精査し直して、直していただけたようです。たしか私も気がついたのですけれども、見た限り全部直っておりますので、よろしいかと思えます。

ほかに先生方、ありますでしょうか。

いろいろございましたが、既にヨーロッパ等々で20年近く売られているものでもございまして、安全性については懸念はないと判定したいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。御意思の表示をお願いいたします。

ありがとうございます。それでは、本件につきましては、安全性については懸念はないと判定させていただきます。

それでは、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局のほうからお願いいたします。

○山口係長 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、食品健康影響評価に関する資料をお開きください。6ページをお願いいたします。評価対象添加物の概要でございます。本添加物は、*Ogataea polymorpha* RB11株を宿主として、*Fusarium heterosporum*株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製されたDIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼでございます。本添加物は、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するホスホリパーゼA1でございます。ケーキ製造において品質改善に使用されるものということでございます。

続きまして、1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料でございます。従来の添加物、名称はホスホリパーゼ、有効成分はホスホリパーゼでございます。こちらは事務局のミスで $\alpha$ -アミラーゼという記載がございますけれども、こちらはホスホリパーゼとなっております。

(2) 製造方法ですが、ホスホリパーゼA1は、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造されるということでございまして、生産菌及び菌体成分につきましては、ろ過や精製工程を経て除去されるということでございます。

続いて、用途及び使用形態でございますけれども、ホスホリパーゼA1は、植物油の精製、

製パン・製菓などに使用されるものということでございます。

続いて、摂取量でございますけれども、既存のホスホリパーゼA1製品が全て本添加物を用いた製品に置き換わり、全ての「ケーキ・ペストリー類」の製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は、0.0012 mg TOS/kg 体重/日ということでございます。

続きまして、宿主及び導入DNAでございますが、宿主は*Ogataea polymorpha* RB11株でございます。

DNA供与体の種名、株名または系統名及び由来につきましては、ホスホリパーゼA1 (*KLM1*) 遺伝子の供与体が*Fusarium heterosporum*でございます。*URA3*遺伝子の供与体が*Saccharomyces cerevisiae*、プロモーター配列、ターミネーター配列、及び遺伝子導入用ベクターpB14-CBSyntの複製に必要な*HARS1*配列の供与体が*Ogataea polymorpha* RB11株ということでございます。

続いて、挿入遺伝子の性質及び導入方法でございますけれども、*KLM1*遺伝子は、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するホスホリパーゼA1である*KLM1*をコードするものということでございます。

*URA3*遺伝子は、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選択マーカーとして用いられてございます。*URA3*遺伝子、*HARS1*遺伝子（宿主由来の自律複製配列）及び*KLM1*遺伝子発現カセットを含む導入用ベクター全体を電気穿孔法にて宿主に導入されてございます。

次に8ページをお願いいたします。6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点でございます。

まず、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の違いでございますが、相違点は、基原、アミノ酸配列、至適pH及び至適温度が異なる点であるということでございます。

続いて、組換え体と宿主でございますが、DIDK-0176株は、*KLM1*遺伝子が導入されており、*KLM1*生産能を獲得している点、そして、*URA3*遺伝子の導入によってウラシル栄養非要求性である点が異なるということでございます。

続きまして、10ページをお願いいたします。挿入DNAまたは遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む）及びその遺伝子産物の性質に関する事項でございます。

挿入遺伝子のクローニングまたは合成方法に関する事項については、*KLM1*遺伝子は*Fusarium heterosporum*の培養物よりホスホリパーゼ活性を持つタンパク質を分離してアミノ酸配列を決定し、その情報に基づいてDNA配列を合成してございます。

続いて、*URA3*遺伝子につきましては、*Saccharomyces cerevisiae*のゲノムからPCRにより得られております。

ベクターpB14につきましては、*E.coli*由来のベクターpBR322に、*Saccharomyces cerevisiae*由来の*URA3*遺伝子及び宿主*Ogataea polymorpha*由来のFMDプロモーター配列、MOXターミネーター配列及び*HARS1*配列を挿入して作製がされてございます。

さらに、 $\alpha$ 因子のプレプロペプチドをコードするDNA配列と *KLM1* 遺伝子を連結し、ベクター pB14 に挿入をしてベクター pB14-CBSynth を作製してございます。なお、ベクター pBR322 が持っていたアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子は、ベクター pB14 の作製過程において除去したということでございます。

続いて、11ページをお願いいたします。挿入遺伝子の機能に関する事項でございます。

こちらは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ございます。ここは若干修正をさせていただきました。人工胃液に関する感受性ですけれども、*KLM1* 人工胃液中での消化性を調べる目的で SDS-PAGE、ここは CBB 染色というふうに赤字修正させていただいて、染色に関する情報も追記させていただいているのですけれども、ここにつきまして1個だけ修正をさせていただきます。ただいま CBB 染色としているのですけれども、一般的な名称とすることを目的として、タンパク質染色を行ったというふうに修正させていただければと思っております。そして、その結果につきましては、試験開始30秒後に消化されるということが示されたということでございます。

続いて、人工腸液に関する感受性ですけれども、これにつきましても同様に、SDS-PAGE (タンパク質染色) というふうに修正させていただければと思います。そして、この人工腸液試験の結果、試験開始20分以内に消化されることが示されたということでございます。

続いて、加熱処理に関する感受性ですけれども、*KLM1* の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、各温度帯で10分処理をした後の活性を測定してございます。その結果、80度の処理によって完全に失活することが示されたということでございます。

続きまして、*URA3* 遺伝子についてでございます。*URA3* 遺伝子がコードするオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼにアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はないということございまして、*URA3* 遺伝子の供与体である *Saccharomyces cerevisiae* のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベース検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかったということでございます。

以上のことから総合的に判断をして、*KLM1* 及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼについては、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられたということでございます。

続いて、13ページをお願いいたします。7. 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すが、遺伝子導入用ベクターの pB14-CBSynt には抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていないということでございます。

続きまして、第5. 組換え体に関する事項の中の2. 遺伝子導入に関する事項のうち、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すけれども、*KLM1* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子発現カセットの導入によって新たに生じた ORF について検索を行ってございまして、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上の ORF が104個検出されてございます。

これら ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無について確認をするため、アレルゲン

データベースを用いた相同性検索を行ってございまして、その結果、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は検出されませんでしたけれども、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンについては複数検出されてございます。

これらと食品アレルギーとのエピトープの一致についてデータベース検索を行ったところ、それぞれ一致しないということが確認されてございます。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパクとの相同性についてデータベースを用いて  $E\text{-value}<0.1$  を指標として検索を行いました結果、既知のタンパク質が複数検出されてございます。ですが、こちらは14ページに記載の理由からそれぞれこれらが毒性を有する可能性、毒性タンパク質として機能する可能性は低いと考えられたということでございます。

続いて、同ページ、14ページの下第7. 諸外国における認可、食用等に関する事項でございすけれども、KLM1は、米国において2007年にGRASとして認証されているということでございまして、また、オーストラリア、ニュージーランド、デンマーク、フランス及びEUにおいて承認等を受けているということでございます。

続きまして、組換え体の残存に関する事項でございすますが、KLM1に生産菌の残存がないことについては、培養を用いた手法によって確認がされてございます。また、組換えDNAの残存がないことにつきましては、PCR分析によって確認がされてございます。

評価書案の御説明につきましては以上でございす。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、コメントを賜りたいと思います。

255と259のCBB染色をタンパク染色にするのですか。タンパク染色っていろいろあって、銀染色みたいなもっと感度の高いものをやったら出てきてしまうことがあるので、CBBなら出ないけれどもというのもあるので、そもそもSDS-PAGE分析と言ったらタンパク染色までセットになっているから、余計なことを考えないでSDS-PAGE分析のままにしておいたほうがいいように私には思えてならないのだけれども、先生方、SDS-PAGEでタンパク質染色って違和感あり過ぎませんか。そう思いますので、特に明確な理由がないのであれば、SDS-PAGE分析に戻すことをお勧めいたします。

○今村技術参与 技術参与の今村です。私も皆様の審議で結論が出ればいいと思うのですが、ウェスタンブロットというのはSDS-PAGEを経て行っているもので、この評価書の中ではSDS-PAGEとウェスタンブロットというのはペアでよく表記をすることがありますので、タンパク質を見たということならば、タンパク質の染色で、CBB染色という書き方が単純でいいなと思いました。しかし、最近、蛍光色素ですとか先生がおっしゃった銀染色ですとか、あるいは染色法による定量性の結果の違いとかという問題がいろいろ出てくる可能性があるもので、タンパク質染色ならばCBB染色までは踏み込まないで、タンパク質染色という形で分けたいのではないかと。SDS-PAGEの言葉自体が意味しているのは電気泳動までのステップですので、染色法まで入れたほうがいいかなと私は思いました。ただ、ここの委員会では結論を出していただければいいと思います。

それから、海外の申請書を見ますと、やはりオリジナルの申請書にはSDS-PAGE (CBB)のような表記がほとんどでして、それに沿った形になるのかなと思いました。

以上です。

○中島座長 事務局のほうからは以上の御説明がありました。それならばそのまま括弧でCBB染色にしておくのがいいかなと思いますし、通常、SDS-PAGEといったらウェスタンは含まなくて、抗体を使って検出するならウェスタンなり何なりというのが普通かなと私も何となく思ったのですけれども、1点ここで結論を出しておけば、以後事務局が困らないので、議論していただければと思うのですけれども、私は、SDS-PAGE分析に戻ってしまっていていいように思うのですが、この辺はいかがでしょうか。近藤先生はどう思いますか。

○近藤専門委員 近藤ですけれども、あまりSDS-PAGE分析とは自分自身では言わないかなというのがあって、私はCBB染色のほうがいいかなと思いました。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。原著のほうにCBB分析と書いてあったのならそのまま書くのがいいかなと。少なくともタンパク染色には戻さないほうがいいかなという気はするのですけれども、山川先生、いかがでしょうか。

○山川専門委員 何で検出したかというのはやはりかなり大きいので、CBBでやってどうしても駄目なときに銀染色をやったりしますので、括弧でCBBのほうが良いと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

では、道之先生、どうですか。

○小野道之専門委員 小野道之です。やはりCBBと銀染色ではかなり違いがありますので、もしCBBと示されているのだったら、CBBは残してもいいかなと思いました。なので、SDS-PAGE (CBB) ですかね。

○中島座長 ありがとうございます。何となく方向が見えたほうが気もするのですけれども、もうお一方、安達先生、いかがですか。

○安達専門委員 安達でございます。元の英語バージョンにCBBと書いてあるのであれば、そのままCBB染色というふうに書いていただくのが一番い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。

奥藤さん、どうぞ。

○奥藤評価専門官 事務局からもう一点、同じ記載の箇所を確認をさせていただきたいのですが、次に審議していただきますROM株を使用した $\alpha$ -アミラーゼで人工胃腸液試験の分析をする際のSDS-PAGEでSypro Ruby染色とInstantBlue染色というものを使ってございます。こちらのSypro RubyとかInstantBlueというのは単に商品の商標であるというような御指摘もいただいております、こういった商品の商標であったとしても、同じようにSDS-PAGE (Sypro Ruby染色及びInstantBlue染色) といった形で記載して大丈夫か

どうかを確認しておきたいのですが、いかがでしょうか。そういったこともありまして、今回、「タンパク質染色」という記載案を事務局から提案させていただきました。

○中島座長 そういう事情のようです。これはCBBとは別物で、感度等も違うと思いますので、書くのであればSDS-PAGEで括弧して元の記載のとおりとしておくのが正確でいいかと思います。当然、染色法によって感度が異なってきますので、今回の記述でCBB染色とするのであれば、以後も基本は、特に元の申請書のほうに明記してあるのであればそれを書く。そうでなければ「分析」も入れなくて、単に「SDS-PAGEにより」でいいのではないかと私は思うのですが、先生方、いかがでしょうか。竜一先生はいかがですか。

○小野竜一専門委員 私の使っていた用語的には、SDS-PAGE分析というののもちょっと違和感があって、SDS-PAGE（CBB染色）というのがいいかなというところなのですけれども、それと先ほどおっしゃっていたようにSypro Rubyとかそういうものは全く染色として別物なので感度も一桁とか違ってくると思いますので、そこはその名前を出すことによってどの程度の感度でやったのかというのが分かりやすくなりますので、それもちょうと表記しておくという形がよろしいかと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。大体皆さん同じような感触ではないかと思うのですが、以後、SDS-PAGEで明記してある場合には、その染色法も申請書どおりに記述するといいいかなと思うのですが、先生方、これでよろしいでしょうか。

よろしいようですので、以後、そのようにお願いいたします。

○奥藤評価専門官 ありがとうございます。

○中島座長 ほかに評価書案につきまして何かございますでしょうか。よろしいでしょうか。

どうぞ、川西先生。

○川西委員 重箱の隅をつつくようですけれども、72行目、6ページ、製造方法で「ホスホリパーゼA1は培養工程、ろ過等の製剤化工程」と。ろ過というのは製剤化工程の中で再度ろ過もやる場合もあるので、製剤工程ではなく、その前の原体の製造における重要な工程だと思います。このままですと、培養工程、ろ過等が製剤化工程に含まれると読まれてしまうので、例えば、「培養、ろ過、さらに製剤化工程等を経て製造される」というふうに書いたほうがいいのではないかと思います。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。ただ、限外ろ過などという精製に関係しそうなろ過もあつたりするので、多分こうなっているのかなという気がしています。

○川西委員 それは、製剤化工程ではなく、原体の製造工程です。

○中島座長 ないからいいのね。では、川西先生がおっしゃるのはもっともだと思いますので、そういうふうをお願いいたします。

○山口係長 承知いたしました。

○中島座長 ほかによろしいでしょうか。では、細かい字句等、後ほどお気づきのことがありましたら、事務局まで伝えただければと思います。

それでは、修正につきまして、事務局で修正後、また私のほうで確認させていただいて、食品安全委員会に報告し、パブリックコメントと手続を進めていきたいと思っております。ありがとうございました。

それでは、早速、ROM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼ、これも継続品目でありませんが、審議を行いたいと思っております。本品目は、今年6月の専門調査会で審議を行ったものです。

では、事務局からお願いいたします。

○奥藤評価専門官 ありがとうございます。それでは、お手元に水色の紙ファイルを御用意ください。ROM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼの資料になります。資料は6ページ目までが回答書、その後ろに修正要旨が続くという構成になっております。

本品目につきましては、先ほど座長からもございましたとおり、本年6月の専門調査会で審議をいたしまして指摘事項を出したものでございます。

まず、申請品目について簡単に御説明いたします。後半にある要旨の1ページ目を御覧ください。「はじめに」の上から4行目になります。本品は、生産性向上を目的として、*Geobacillus stearothermophilus*由来の $\alpha$ -アミラーゼを基に合成した*amyM-1*遺伝子を*Bacillus subtilis*に挿入した生産菌株であるROM株を用いて生産される $\alpha$ -アミラーゼです。この $\alpha$ -アミラーゼはパン製造において老化防止等に使用されるということになってございます。

それでは、申請者からの回答について、指摘事項に沿って説明をいたします。

回答書の1ページ目を御覧ください。指摘事項1になります。挿入遺伝子の機能に関する事項について、前回の調査会ではアミノ酸配列の説明の中で*amyM-1*遺伝子がコードする $\alpha$ -アミラーゼのうち、●●●はシグナル配列であり、別の遺伝子のシグナル配列を利用しているという説明がされておりました。これにつきまして、シグナル配列が設計どおりに切れているかどうかを確認するために、実際に生産される $\alpha$ -アミラーゼについて、アミノ酸配列に関する情報の提供を求めていたものでございます。

申請者からの回答では、設計どおりの箇所で切断されているかどうかの確認は行っていない。しかし、このシグナル配列は宿主である*Aspergillus niger*の内在性遺伝子のシグナル配列であることから、仮に設計どおりに切断されなかったとしても、こちらに記載されてございます①得られる酵素が目的の $\alpha$ -アミラーゼ活性を有することを確認できていること。②シグナル配列を含む挿入DNA配列について行った既知のアレルゲンとの相同性検索の結果、本品と既知のアレルゲンとの相同性については、既存の $\alpha$ -アミラーゼと同様に低いと考えられること。この2点から問題はないと考えると考察をしてございます。

この回答を踏まえまして、要旨につきましても、このシグナル配列を含む配列で相同性検索を行ったということが分かりますように追記をしてございます。

続きまして、回答書の2ページ目、指摘事項2を御覧ください。こちらにも挿入遺伝子の機能に関する事項でございまして、アレルゲンとの構造相同性の検索について、最新のデータベースに基づく検索を行うよう指摘をしております。申請者からは、2021年2月更新のデータベースで検索をし直した結果が来ておりまして、新たな相同性が見つからなかったということを確認しております。

続きまして、その一番下、指摘事項3になります。こちらは人工胃腸液試験に関する指摘でございます。前回の審議の際には、人工腸液単独での消化試験については、試験結果の掲載及び説明がなかったことから、アルカリ及び腸液の酵素に対する遺伝子産物の感受性を確認するために人工腸液単独での試験の実施を求めておりました。今回、申請者からは、人工胃液及び人工腸液、それぞれ単独での試験結果が提出されております。

回答書の4ページ目を御覧ください。図5がございまして、こちらの●●●レーンが人工胃液で処理した後にSDS-PAGEを行った結果になります。こちらでは、レーン●●●に見えている $\alpha$ -アミラーゼのバンドが試験開始15分後であるレーン●●●レーン●●●では完全に分解されたということが確認できております。また、レーン●●●が人工腸液で処理した後にSDS-PAGEを行った結果になります。こちらでは時間依存的な分解が観察され、試験開始60分後であるレーン●●●で $\alpha$ -アミラーゼのほとんどが分解されたという考察になってございます。

続きまして、回答書の5ページ目を御覧ください。指摘事項4になります。前回の調査会の説明では、今回のROM株について既に審査が終了しておりますMAM株から改変を行った2か所の*amyM-1*発現カセット挿入部位についてORF検索をしたところ、6つの読み枠において終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが58個見つかると、これらのうち既知のアレルゲンと連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すORFが2個検出されたという説明がございました。

この2個のうち指摘事項4に記載してございますORFの23については、そのアミノ酸全長のうちほとんどが宿主にもともと存在する配列でありまして、宿主側の配列で相同性検索を行った場合でも、同じアレルゲンが検出されたことから、遺伝子導入によって新たに生じたものではないことを要旨に記載するようという指摘をございました。

申請者はこの指摘を踏まえまして、要旨の修正を行っております。

続きまして、6ページ目を御覧ください。指摘事項5になります。こちらは好熱菌の記載が、好熱菌というのが正しい字なのですが、高熱菌と書いてしまっておりまして、そちらを正しく修正したものになります。

回答書の説明は以上になります。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、指摘事項を1つずつ確認していきたいと思っております。まず最初、 $\alpha$ -アミラーゼのN末端側、30アミノ酸残基はシグナル配列であって、ほかの遺伝子のシグナル配列を利用しているのだけれども、ほかの遺伝子のシグナル配列をすげ替えて使っているの、ち

やんと切れているかどうか確認をとという指摘です。

確認はしていないけれども、活性もあるし、また、シグナル配列相同だし、大丈夫ではないかという回答でありました。

*Bacillus*はシグナル配列が長めで、普通は20アミノ酸ぐらいと決まっているのですけれども、*Bacillus subtilis*は30アミノ酸程度ありまして、まあ普通かなと。

本申請は好熱菌 *Geobacillus stearothermophilus* のアミラーゼ、要するに高温耐性のアミラーゼを生産性のいい *Bacillus subtilis* でつくりたいということで、よくあるパターンですね。*Bacillus* の場合はセカンドプロセッシングといってさらにN末端が切れることなどがあるのですが、*stearothermophilus* の遺伝子を *Bacillus* でやった場合、大体元のとおりになるようです。でも、確認は行っていないということです。

私は、よくあるパターンだしいいかなと感じてはいたのですが、質問された小野道之先生、いかがでしょうか。

○小野道之専門委員 回答書も読ませていただきまして、また、今、座長のお話も伺いまして、記述どおりでよろしいのではないかと考えます。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。調べていてくれたらこちらもしっかりするのだけでも、このパターンならいいんじゃないかとおっしゃっていただけましたので、私もこのパターンはよくあるパターンで、今まで問題になったケースもございませんので、まあよろしいかなと考えております。

この件につきまして、ほかに先生方、御意見等ございますでしょうか。よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、挿入遺伝子の機能について、既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見として、これも2019年のものになっているので最新のにしてちょうだいねという指摘で、私と小野竜一先生、児玉先生。これは最新のやり直してデータを載せていただいておりますので、ちゃんとやってくれたかなと思います。竜一先生、いかがですか。

○小野竜一専門委員 確認しました。大丈夫です。

○中島座長 ありがとうございます。

児玉先生もよろしいですよ。ありがとうございます。

それでは、今回のポイントになったのは実は指摘事項3です。人工胃液・腸液に関する感受性について、もともとの申請では人工胃液をやって人工腸液という2段になっていたのですが、アルカリ及び腸液の酵素に関する感受性を確認するために、通常どおり人工腸液単独の試験をやってくださいということです。彼らはそのデータを持っていたようで、この回答書が出てきております。

この辺の基準につきましても、今回ここで種子植物、微生物について審査基準の改定が行われますので、少しすっきりした形にしていければ、それから、技術情報等々でその辺が分かるように整理していければなど。多少きしみも来ているように思いますので、今回

は、これはこれで要求したデータが出てきましたので私はよろしいかなと思います。

安達先生。

○安達専門委員 きちんとデータを出していただいていますので、これで問題ないものと思います。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

竜一先生もこれを要求したよね。

○小野竜一専門委員 大丈夫です。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

樋口先生もたしかこの点を指摘されて、本人今日はいないけれども、データが出てきているのだから、樋口先生もこれで御不満ということはないと思いますので、この点についてはよろしいかと思ひます。

ほかの先生方、この点につきましてはよろしいですね。

それから、23ページ、オープンリーディングフレームの有無で、●●●;amyM-1、そのアミノ酸全長のうちほとんどが宿主にもともと存在する配列であって、当該ORFのうち宿主側の配列で相同性検索を行った場合も同じアレルゲンが検出されたから、遺伝子導入によって新たに生じたものではないということ、この辺をちゃんと書いてくださいという御指摘でした。これはたしか安達先生ですが、この新しい記述、書きぶりでよろしいでしょうか。

○安達専門委員 安達でございます。きちんと明記していただいているので、これでよろしいかと思ひます。

以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。ちゃんと書いてくれているからいいかなと私も思ひました。

それでは、最後の修正事項ですが、好熱菌というのは高い熱を好むで、この菌は37°Cで生育をどうにかできるぐらいで、25°Cとかだとたしか駄目だったように思ひますので、高熱を好むです。*Stearothermophilus*の最後のphilusというのはラテン語で好むという意味ですので、この子は学名からして高い熱を好む菌という名前ですよね。これは正しく修正していただいておりますので、それでよろしいかと思ひます。これを指摘したのはたしか私だったと思ひます。

ほかの先生方、本申請についてはほかに御意見等ございますでしょうか。

それでは、本件についても、安全上、健康上、特に問題はないと判定したいと思ひますが、よろしいでしょうか。先生方、御意思の表示をお願いいたします。

ありがとうございます。

ということで、安全性については懸念がないと判定することにします。

それでは、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局からお願いいたします。

○奥藤評価専門官 ありがとうございます。それでは、右上に資料と記載した評価書案を束ねた冊子をお手元に御準備ください。19ページからが本 $\alpha$ -アミラーゼの評価書案になります。

24ページ目を御覧ください。I. 評価対象添加物の概要です。本添加物は、*Bacillus subtilis* DS18174株を宿主として、*Geobacillus stearothermophilus*由来の改変 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を導入して作製されたROM株を利用して生産された $\alpha$ -アミラーゼです。本添加物は、デンプン等の $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解することにより、低分子化する酵素です。今回のものは、主にパン製造におけるパンの老化防止を目的として使用されます。

続いて、II. 食品健康影響評価です。第1-1- (1) 比較対象として用いる従来の添加物の名称は $\alpha$ -アミラーゼです。

(2) ですが、先ほどの指摘を踏まえまして、製造方法のところで、培養工程、ろ過、製剤化工程等を経て製造されという記載に修正をしたいと思います。そういった工程を経て製造され、生産菌及び菌体成分は、ろ過や精製工程を経て除去されます。

(3) 用途及び使用形態です。デンプン等の $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解することにより低分子化する酵素で、パン製造においてパンの老化防止を目的として生地に添加されるほか、デンプンからデンプン糖を製造するために使用されます。なお、製パン工程では、焼成時の加熱により酵素は失活します。

(4) 摂取量は、パン類、菓子パン類、その他の小麦加工品の製造に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量が0.0032 mg TOS/kg 体重/日です。

続きまして、25ページ目の2の (1) を御覧ください。宿主は*Bacillus subtilis* DS18174株です。

(2) *amyM-1*遺伝子の供与体は、*Geobacillus stearothermophilus*です。

(3) *amyM-1*遺伝子は、*Geobacillus stearothermophilus*由来の $\alpha$ -アミラーゼをコードします。導入方法は、*amyM-1*遺伝子発現カセットを相同組換えにより宿主ゲノムに導入しています。

3. 食経験等は記載のとおりでございます。

4. 宿主の構成成分等に関して、*Bacillus subtilis*が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、ATCCでは、バイオセーフティレベル1に分類されています。

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等です。

(1) 製品名はBakezyme Master、有効成分は $\alpha$ -アミラーゼです。

(2) から (4) までは記載のとおりです。

続いて、26ページ目の6. (1) を御覧ください。本品と従来の $\alpha$ -アミラーゼの相違点は、アミノ酸配列、至適温度及びpHが異なる点です。

(2) ROM株と宿主の相違点は、ROM株には*amyM-1*遺伝子が導入され、 $\alpha$ -アミラーゼであるBakezyme Masterの生産能を獲得している点、プロテアーゼ遺伝子及び孢子形成能

関与遺伝子を欠失している点、loxP配列が残存している点です。

以上のことから、本添加物並びに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。

続きまして、28ページ目を御覧ください。第4の項目でございます。1は記載のとおりでございます。

209行目から2の(1)挿入遺伝子のクローニングまたは合成方法です。*amyM-1*遺伝子は、*Geobacillus stearothermophilus*の*amyM*遺伝子の配列に基づき複数箇所のアミノ酸配列が置換するよう改変を加えて化学合成をしています。

(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。*amyM-1*遺伝子がコードする $\alpha$ -アミラーゼは、デンプンの $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解し、主にマルトースを精製する酵素です。コード領域内に分泌シグナル配列を含みます。

①挿入遺伝子の供与体、②遺伝子産物、それぞれについてのアレルギー誘発に関する知見は記載のとおりでございます。

232行目から③遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見を御覧ください。まず、a、人工胃液に対する感受性です。現行の評価書案では人工胃液中での消化性について、SDS-PAGE (Sypro Ruby染色)を行った結果と記載をしておりますが、要旨の図5と図6では染色方法が異なっているということが分かりました。図6ではInstantBlue染色を使っているということでしたので、こちらはSDS-PAGE (Sypro Ruby染色及びInstantBlue染色)という記載にしたいと思います。

その結果、試験開始15分後に消化されることが示され、より短い処理時間での本酵素の消化性を調べたところ、試験開始30秒以内に消化されることが確認されるとともに、消化によって生じたアミノ酸断片も試験開始15分後には消化されることが示されたと記載を修正したいと思います。

続きまして、bの人工腸液に対する感受性です。こちらの人工腸液中での消化性について、SDS-PAGE (Sypro Ruby染色)を行った結果、最大処理時間である試験開始60分以内にほとんどが分解されましたが、完全には消化されないことが示されました。

続きまして、cの加熱処理に対する感受性ですが、15分間加熱処理をした後、活性を測定した結果、96.6°Cの処理で完全に失活することが確認されました。

続きまして、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。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%以上の相同性を有するものが4個検出されましたが、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見いだされませんでした。

この結果は、従来の添加物やBakezyme MAMで得られた結果と同じであり、いずれの添加物においてもアレルギー誘発性の報告はないことから、申請添加物がアレルギー誘発性

を有する可能性は低いと考えられました。

続きまして、29ページの3と30ページの4、5の(1)(2)は記載のとおりでございます。

295行目から(3)意図する挿入領域ですが、こちらに記載した2つの遺伝子導入用ベクター上の意図する挿入領域は*amyM-1*遺伝子発現カセットです。

(4)は記載のとおりです。

続いて、305行目から6. 導入方法です。安全性審査が終了いたしましたMAM株に変異原処理を行い、 $\alpha$ -アミラーゼ高生産株を選抜後、プラスミドを用いて*amyM*発現カセットを削除し、相同組換えにより遺伝子導入用ベクターを標的遺伝子座に導入しました。

31ページ目を御覧ください。一番上から7. 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。こちらにつきましては、ROM株構築に用いたプラスミドは、こちらに記載いたしました7種類の耐性遺伝子を持ちますが、ROM株には残存しません。

続きまして、317行目から第5. 組換え体に関する事項です。1は記載のとおりです。

2の(1)制限酵素による切断地図に関する事項です。遺伝子挿入領域の塩基配列及び制限酵素切断地図は明らかになっており、シーケンス解析の結果、*amyM-1*遺伝子発現カセットは、標的遺伝子座に挿入されたことが確認されました。

(2) ORFの有無に関する事項です。MAM株から改変を行った2か所の*amyM-1*遺伝子発現カセット挿入部位に生じるORFの有無を確認するため、挿入DNAの5'及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った結果、6つの読み枠で終止コドンから終止コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計58個検出されました。これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸で35%以上の相同性を示すORFが2個検出され、既知のアレルゲンとして第4-2-(3)に記載した4つのアレルゲンのほかに、こちらに記載した3つのアレルゲンが検出されました。しかしながら、これら3つのアレルゲンに対する相同性は遺伝子導入によって生じた新たなものではないこと、いずれも食物アレルゲンではないこと、さらに、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかったことから、アレルギー誘発性を有する可能性は従来の添加物と同様に低いと考えられました。

32ページ目からの記載ですが、さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、 $E$ -value<0.01を指標としてデータベース検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められませんでした。

第6は記載のとおりでございます。

第7の1. 諸外国における認可、食用等の状況ですが、**Bakezyme Master**は、これまでにアルゼンチン、フランス、デンマークで食品への使用が許可されています。また、EFSAにおいて2021年5月に食品酵素としての安全性審査が終了しています。

続いて、2. 組換え体の残存ですが、本酵素原体に、組み換えDNAが検出されないことをPCR法で確認しております。

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、コメントを賜りたいと思います。先生方、ございますでしょうか。

竜一先生、どうぞ。

○小野竜一専門委員 先ほどのタンパクの染色のところなのですが、今少し調べたところInstantBlueというものに関しては、恐らくCBB染色のとある企業の商品名なのではないかと思われるので、そこに関してはそうなのだとしたら、CBBに統一をしたりというのを考えたほうがいいのではないかと思うのですが、いかがでしょうか。

以上です。

○中島座長 ありがとうございます。僕もたしかそうだったような気がしたなと思って、今一生懸命ググろうと思っていたところだったのです。ググればすぐ出てくると思うので、一応確認してください。CBBでよかったと思います。

○奥藤評価専門官 ありがとうございます。では、確認をして、修正させていただきたいと思います。

○中島座長 Sypro Rubyは、あれは別物だよな。

○小野竜一専門委員 そうですね。それは別物なので大丈夫です。

○中島座長 では、そういうことでお願いいたします。ありがとうございます。

ほかに先生方、よろしいでしょうか。

細かい字句等の修正につきましては、お気づきの点がありましたら、後ほどで結構ですので、事務局に伝えていただければと思います。

それでは、食品安全委員会に報告し、パブリックコメントの手続に入りたいと思います。修正時点につきましては、私と、あと竜一先生もチェックに付き合ってくださいね。よろしくをお願いいたします。

では、議題1につきましては、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。

本日の議題につきましてはこれで終了でございます。

それでは、以上をもちまして、第230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。