

食品添加物の指定要請添付資料
プロテイングルタミナーゼ

天野エンザイム株式会社

2006年9月22日
(2008年6月25日改定)

資料概要

目次

1. 名称	2
2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料	2
(1) 起源又は発見の経緯	
(2) 外国における使用状況	
(3) 関連酵素の自然界での存在	
(4) 類似既存食品添加物酵素との比較	
3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料	4
(1) 名称	(8) 純度試験
(2) 性質	(9) 微生物限度
(3) 酵素活性規格	(10) 酵素活性測定法
(4) 組成	(11) 安定性
(5) 製造方法	(12) 食品中での分析方法
(6) 性状	(13) 成分規格案の設定根拠
(7) 確認試験	
4. 有効性に関する資料	9
(1) 食品添加物としての有効性	
(2) 他の蛋白質脱アミド化方法との比較	
(3) 食品中での安定性	
(4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響	
5. 安全性に関する資料	13
(1) 生産菌の安全性に関する検討	
(2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討	
(3) 毒性に関する資料	
(4) アレルギー誘発性に関する資料	
(5) 体内動態に関する資料	
(6) 一日摂取量に関する資料	
6. 使用基準に関する資料	18
〔図表 1~17〕	19
〔参考文献〕	31
〔添付資料 1〕 生産菌の病原性試験（トキシン生産性試験を含む）	
〔添付資料 2〕 プロテイングルタミナーゼ処理による大豆蛋白質の泡沫特性に及ぼす影響	
〔添付資料 3〕 プロテイングルタミナーゼ処理による卵白のゲル化特性に及ぼす影響	
〔添付資料 4〕 人工胃液、人工腸液による消化性試験	
〔添付資料 5〕 90 日間反復投与毒性試験	
〔添付資料 6〕 微生物を用いる復帰変異試験	
〔添付資料 7〕 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験	
〔添付資料 8〕 げっ歯類を用いる小核試験	
〔添付資料 9〕 海外ガイドラインとの比較	
〔添付資料 10〕 プロテイングルタミナーゼと連続 6 アミノ酸の一致が見られたアレルギー蛋白質の E-value 解析	
〔添付資料 11〕 <i>Chryseobacterium</i> 属における本菌株の位置づけ	
〔添付資料 12〕 連続 6 アミノ酸一致部位の分析	

1. 名称

Chryseobacterium proteolyticum 由来のプロテイングルタミナーゼ
(Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*)

2. 起源又は発見の経緯及び外国における使用状況に関する資料

(1) 起源又は発見の経緯

本品は、食品添加物の酵素に分類されるものであり、食品蛋白質中のグルタミン残基をグルタミン酸残基に変換する作用を有する。本品により、食品中の蛋白質や蛋白質素材の溶解性、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性（これらは「蛋白質の機能特性」と呼ばれるが¹⁾、生理的機能特性と区別するため、ここでは「蛋白質の物理的機能特性」と呼ぶ）を向上させることが出来る。

現在、カゼイン、乳清蛋白質、乾燥卵白、ゼラチン、大豆蛋白質、小麦蛋白質などの食品蛋白質素材は、年間約 10 万トン生産若しくは輸入され²⁾、ハム・ソーセージ、パン、ケーキ、水産練り製品など様々な食品に利用されている。これらはそのまま利用される他、一部は、化学的（塩酸）処理や酵素（プロテアーゼ）処理され、ペプチドや調味料として食品加工に利用されている。これらの食品用蛋白質の中で、近年安全で安心な食品素材として大豆、小麦、トウモロコシ、えんどう豆などの植物性蛋白質に注目が集まっている。しかしながら、特に小麦グルテンやトウモロコシ蛋白質などは、その物理的機能特性が低く用途が限られている。

蛋白質の物理的機能特性を向上させる改質方法として、脱アミド化、即ち蛋白質中のグルタミン残基若しくはアスパラギン残基の側鎖のアミド基を加水分解することが、効果的な方法として知られていた^{3,4)}が、工業的に唯一実用化されているのは、コントロールされた条件下での塩酸加水分解のみであった。実際、塩酸加水分解により脱アミド化された小麦グルテンが現在流通している。しかしながら、この化学法では、ペプチド結合の切断や他のアミノ酸残基の修飾等の副反応が生じ、蛋白質本来の栄養価や物理的機能特性が損なわれることが避けられない⁵⁾。また、塩酸による蛋白質の加水分解は、発がん性が疑われている塩素化合物モノクロロプロパンジオール (MCP)、ジクロロプロパノール (DCP) 生成のリスクがある⁶⁾。そこで、安全かつ反応選択性の高い、酵素的手段による蛋白質の脱アミド化が長く待ち望まれていた⁷⁾。

本品は、このような状況のもとに、蛋白質を選択的に脱アミド化する酵素として微生物からスクリーニングにより見出されたものである。本品は、筑波地方の田圃土壌から単離された細菌 *Chryseobacterium proteolyticum* により菌体外に生産される⁸⁾。

(2) 外国における使用状況

本品は、日本で開発され商品化されようとしているものであるが、加工助剤である酵素剤を規制していない欧州や GRAS 制度が導入されている米国においては既にプロモーション活動を開始している。現在では、欧米企業数社によって本品を使用した商品開発が進められており、最近になって欧州の企業へ本品の供給を開始した。また、本品の米国へのプロモーション活動として、米国 FDA への GRAS notification の準備を進めており、その一環として本生産菌の非病原性及び本品の安全性評価に関する論文を *Regulatory Toxicology and Pharmacology* に投稿し、出版された⁹⁾。

(3) 関連酵素の自然界での存在

自然界での蛋白質の脱アミド化反応は、小麦、豆類、植物の発芽種子において知られている。多くの植物種子の貯蔵蛋白質（穀類のプロラミン、豆類のグロブリン）は、グルタミン含量が高く、グルタミンのアミド基の窒素は、発芽時の窒素の供給源と考えられている。これら種子中の貯蔵蛋白質は発芽中にまず脱アミド化されることにより、次に続く蛋白分解酵素による分解を受け易くなることが知られている。¹⁰⁻¹²⁾ 実際、発芽中の小麦、インゲン豆、カボチャの種子から、蛋白質中のグルタミン残基を脱アミドする酵素の存在が報告されている^{13, 14)}。

また、生体内も含め自然界に広くその存在が知られており、近年食品加工用酵素として広く使用されている放線菌由来のトランスグルタミナーゼは、蛋白質中のグルタミン残基とリジン残基間で架橋反応を触媒する酵素であり、反応系にリジンなどの1級アミンが存在しない場合、グルタミン残基を脱アミド化することが知られている^{15, 16)}。

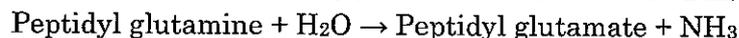
また他の微生物においては、細菌 (*Bacillus circulans*) の菌体内に、低分子のペプチド中のグルタミン残基を脱アミド化する酵素ペプチドグルタミナーゼが報告されている¹⁷⁾。この酵素は、高分子ペプチド（分子量 5000 以上）即ち蛋白質に作用しない点が本品と異なる。

(4) 類似既存食品添加物酵素との比較

現在、酵素は 69 品目が既存添加物名簿に記載されており、類似する酵素としては、「グルタミナーゼ」や「トランスグルタミナーゼ」が挙げられる。International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) の酵素分類によれば、「プロテイングルタミナーゼ」及び「グルタミナーゼ」は加水分解酵素、「トランスグルタミナーゼ」は転移酵素に分類される。「グルタミナーゼ」は遊離の L-グルタミンに作用するのに対し、「プロテイングルタミナーゼ」及び「トランスグルタミナーゼ」は蛋白質及びペプチド中のグルタミン残基に作用する。詳細な反応様式は以下に示す通りである。

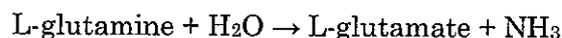
プロテイングルタミナーゼ (EC 3. 5. 1. XX) :

特性：蛋白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン側鎖のアミド基を加水分解し、グルタミン酸残基に変換すると共にアンモニアを生成する。



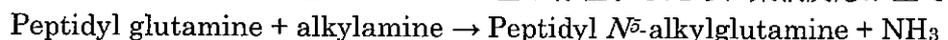
グルタミナーゼ (EC 3. 5. 1. 2) :

特性：L-グルタミンに作用し、L-グルタミンのアミド基を加水分解して、L-グルタミン酸とアンモニアを生成する。



トランスグルタミナーゼ (EC 2. 3. 2. 13) :

特性：蛋白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン残基を他のアミノ基へ転移し、イソペプチド架橋を形成する。アミノ基非存在下では、 H_2O に転移される。この反応は加水分解反応であり、プロテイングルタミナーゼと同じ反応になるが、通常は蛋白質中のリジン残基の ϵ -アミノ基が存在するため、架橋反応が主である。



【3種の酵素の特徴比較】

酵素	反応	作用する基質		
		蛋白質	ペプチド	遊離グルタミン
プロテイン グルタミナーゼ	加水分解反応 脱アミド	+++	++	±
グルタミナーゼ	加水分解反応 脱アミド	-	-	+++
トランス グルタミナーゼ	転移反応(主) 架橋	+++	++	-
	加水分解反応(従) 脱アミド	+++	++	-

3. 物理化学的性質及び成分規格に関する資料

(1) 名称

- 1) 一般名 : プロテイングルタミナーゼ (Protein-glutaminase)
- 2) Enzyme Commission No. : EC 3.5.1.XX¹⁸⁾ (鎖状アミド中のペプチド結合以外の C-N 結合に作用)

(2) 性質^{18, 19)}

- 1) 反応様式 : 蛋白質、ペプチド中のグルタミン残基に作用し、グルタミン側鎖のアミド基を加水分解し、グルタミン酸残基に変換すると共にアンモニアを遊離する。

$$\text{Protein-bound Gln} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Protein-bound Glu} + \text{NH}_3$$
- 2) 構造式 : 185 アミノ酸からなる単体のポリペプチド。アミノ酸配列及びアミノ酸組成を【図表 1、2】に示す。
- 3) 分子量 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では 20 kDa、アミノ酸配列から計算される分子量は 19860 である
- 4) 等電点 : 10.0
- 5) 基質特異性 : 蛋白質や長鎖ペプチドによく作用し、短鎖ペプチド、L-グルタミンにも作用する。それぞれの基質に対する動力学的パラメーターを【図表 3】に示す。また、各種蛋白質に対する特異性を【図表 4】に示す。
- 6) 温度依存性 : 至適温度は 50~60℃。50℃、1 時間処理で安定、70℃、1 時間処理でほぼ完全に失活する。
- 7) pH 依存性 : 至適 pH は 5~6。安定 pH は 5~9。
- 8) 阻害剤 : Ag⁺、Zn²⁺、Cu²⁺、ヨードアセトアミド。

(3) 酵素活性規格

本品は、1g 当たり 500 単位以上の酵素活性(プロテイングルタミナーゼ力)を有する。

(4) 組成

本品の製造にあたっては、粉末化、安定化などを目的として、デキストリンやグリセリン等の食品素材若しくは食品添加物が用いられる。また、実際の食品加工に使用される場合は、一定の単位活性規格（単位/g、単位/ml）を有する酵素剤として調製される。

(5) 製造方法

1) 製造法：本品は、選択・純化された菌株 *Chryseobacterium proteolyticum* を培養し、次いで、ろ過して菌体を除去し、限外ろ過により濃縮後、イオン交換クロマトグラフィー等により精製し、最終的にスプレードライ工程を通じて粉末化されるか、又はそのまま液状品として得られる。粉末品の製造工程フローを【図表5】に示す。本菌株は遺伝子組換え菌株ではなく、製造に使用される原料は食品素材又は食品添加物である。

2) 生産菌：

a) 分類学上の位置付け：本生産菌は、筑波地方の田園土壌から単離された細菌であり、同定の結果 *Chryseobacterium* 属に属する新種であることが判明し、*Chryseobacterium proteolyticum* と命名された⁸⁾。現在（2006年4月末）、*Chryseobacterium* 属において学術的に同定された種は本菌株を含め15種ある^(注1)。本菌株の単離が発表された2000年当時は、6種（*C. meningosepticum*, *C. indologenes*, *C. gluem*, *C. balustinum*, *C. scophthalmum*, *C. indoltheticum*）が報告されており²⁰⁾、その後、本菌株の他に9種（*C. defluvii*, *C. joostei*, *C. daecheongense*, *C. formosense*, *C. taichungense*, *C. shigense*, *C. vrystaatense*, *C. soldanellicola*, *C. taeenense*）が追加報告された。*C. meningosepticum* は、細胞壁脂肪酸組成及び16S rRNA 遺伝子配列から作成される系統樹の上で離れた位置に存在しているため、最近になって別の属（*Elizabethkingia* 属）に改められた²¹⁾。*C. meningosepticum* は、日和見感染菌として知られた菌である。これら15種の分離源は自然界に多岐に渡っており、初期の分離源はクリニカル標本（*C. gluem*、*C. indologenes*）、淡水魚（*C. balustinum*）、海水（*C. scophthalmum*）、海底泥（*C. indoltheticum*）であったが、近年は土壌（*C. proteolyticum*、*C. taichungense*）、活性汚泥（*C. defluvii*）、植物（*C. formosense*、*C. soldanellicola*、*C. taeenense*）の他、食品からも多く分離されている²²⁾。食品からの分離源として牛乳（*C. joostei*）、鶏肉（*C. vrystaatense*）、日本の乳酸菌飲料（*C. shigense*）²³⁾がある。DSMZ のリスク分類（<http://www.dsmz.de/>）では、初期に分離された *C. indologenes*、*C. gluem*、*C. scophthalmum* がリスク・グループ2^(注2)、*C. balustinum*、*C. indoltheticum* がグループ1^(注3)とされている。新しく分離された10種では、*C. defluvii* と *C. joostei* がグループ1とされているが、その他の種は未だリスク分類はされていない。【図表6】に、本菌株と他の種を含む16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹（文献23より）を、それらの分離源と DSMZ リスクグループと共に示す。

2006年4月以降2008年5月までの2年余りの間に、*Chryseobacterium* 属にはさらに21種が新種として報告されている。従って2008年6月23日現在、本属には本菌株を含め計36種が報告されている。これらについて【添付資料II】にまとめた。36種の分離源は、土壌から8種、食品・飲料から6種、排水・汚泥から4種、植物（根・葉）から4種、ビール瓶詰工場から4種、魚類から3種、クリニカル標本から3種、海水・泥から2種、貯水・冷却水から2種である。DSMZ のリスクグループ分類においては、2008年6月現在、2006年4月以降報告された菌株のうち、報告の早いものを中心に7種（*C. taichungense*（土壌）、*C. shigense*（乳酸飲料）、*C.*

formosense (レタス根)、*C. daecheongense* (淡水湖堆積物)、*C. soldanellicola* (ハマヒルガオ根)、*C. taeanense* (ハマニンニク根)、*C. caeni* (バイオリクター沈積物) がリスクグループ 1 に追加されている。比較的最近報告された 21 種は未だリスク分類はされていない。したがって、計 36 種のうち 11 種がリスクグループ 1、3 種がリスクグループ 2 とされ、本菌株を含む 22 種は未だリスク分類はされていない。〔添付資料 11〕の B、C には、本属における本菌株の分類学的位置づけを示すものとして、16S rRNA 遺伝子に基づく系統樹を最新の文献 (2008 年 5 月、文献 61) 及び新たに報告されたクリニカル標本由来の *C. hominis* が報告された文献 (文献 62) から掲載した。本菌株はリスクグループ 2 の 3 種及び *C. hominis* とは離れた位置に存在することが判る。

本菌株は公的保存機関に寄託されていないためリスクグループ評価はされることはないが、分離源が土壌、排水・汚泥、植物根などのものがリスクグループ 1 とされている事例から鑑み、本菌株は、分離源が土壌であることに加え非病原性であることが確認され論文掲載されており⁹⁾、リスクグループ 1 とされる可能性は極めて高いと考えられる。

注 1：本菌株は、特許庁・特許生物寄託センターに FERMP-17664 として寄託されているが、商業目的のため公共の保存機関に寄託されていない。よって 'validity published' されていないとされているが、文献 21)、23)、61)、62) を始め多くの論文で *Chryseobacterium* 属のメンバーとして取り上げられている。

注 2：リスク・グループ 2 (個体に対する中等度危険度、地域社会に対する軽微な危険度)
ヒトあるいは動物に病原性を有するが、実験室職員、地域社会、家畜、環境等に対し重大な災害とならないもの、実験室内で暴露されると重篤な感染を起こす可能性はあるが、有効な治療法、予防法があり、伝播の可能性は低いもの。

注 3：リスク・グループ 1 (個体および地域社会に対する低危険度)
ヒトに疾病を起こし、あるいは動物に獣医学的に重要な疾患を起こす可能性のないもの。

- b) 非病原性であること：5. (1) に記載のように、本菌株が、非病原性であることは生菌体懸濁液のマウス静脈内接種及び経口接種試験により確認されている〔添付資料 1〕。即ち、いずれの接種試験でも死亡例、体重推移の異常、生残菌は認められなかった。対照試験として、同時に行った既知の病原性菌である *Pseudomonas aeruginosa* IF003919 の静脈内接種試験では、10 例中 6 例の死亡、体重減少、用量依存的な生残菌が認められた。
- c) 非トキシン生産性であること：5. (1) に記載のように、本菌株が非トキシン生産性であることは、菌体培養上清液及び破碎上清液のマウス静脈内接種試験により確認されている〔添付資料 1〕。即ち、いずれの接種試験でも死亡例、体重推移の異常、生残菌は認められなかった。また、本菌の培養液中にはエンドトキシン (リポポリサッカライド) 活性は検出されなかった〔添付資料 1〕。エンドトキシンは、グラム陰性菌に属するある種の菌株が産生し、血中投与時に発熱等の症状を引き起こす。従って、通常食品若しくは食品添加物のように経口摂取される場合においては問題にされないが、本菌株がグラム陰性菌であるため試験した。また、文献調査の結果でも、本菌を含む類縁菌においてトキシン生産性に関する報告はなかった。即ち、

Pariza と Johnson の論文²⁴⁾において推奨されている微生物トキシンに関する成書、*Bacterial Protein Toxins* (K. Aktories & I. Just eds, Springer-Verlag, 2000)、*Guidebook to Protein toxins and their use in cell biology* (R. Rappuoli & C. Montecucco, Oxford Univ. press, 1997)、*The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, second edition (J. E. Alouf & J. H. Freer eds, Academic press, 1999) には、本菌株を含む類縁菌においてトキシン生産性に関連する記述は見当たらなかった。また NCBI の PubMed (2006 年 4 月末現在) による文献検索においても、*Chryseobacterium* 属におけるトキシン生産性に関する報告はなかった。以上の様に、マウスを用いたトキシン生産性に関する試験結果及び文献検索の結果、本菌株は非トキシン生産性であると考えられた。

補足: 本属の所属する科は *Flavobacteriaceae* Family であり、本科の属する目は *Flavobacteriales* Order である。本日 *Flavobacteriales* Order に属する科は他に 2 つあるが、これら 3 つの科に属する計 69 属 (2006 年 4 月 26 日現在の NCBI の Taxonomy Browser より) にまで検索範囲を拡大しても、アヒル病原菌として知られる *Riemerella anatipestifer* の産生する溶血因子 CAMP cohemolysin に関するもの一報²⁵⁾および、*Campylobacterium canimorsus* においてその培養液ろ液が murine macrophage cell line J774 の増殖阻害、剥離を引き起こす現象に関するもの一報²⁶⁾の、合計 2 件のみであった。

- d) 天野エンザイムでの使用状況: 本菌株は、1997 年土壌より単離されてから今日 (2005 年 10 月末) まで、天野エンザイム株式会社筑波研究所、中央研究所、岐阜研究所において、研究開発のために継続して培養されてきた。その間、岐阜研究所内での 3 L スケールの Jar 培養を 130 回延べ約 1000 バッチ、西春工場での 800 L スケールのタンク培養を 17 回延べ約 34 バッチ、養老工場 55 kL スケールのタンク培養を 3 回 3 バッチ繰り返してきた。それに携わった従事者は 20 余名に及ぶが、本菌株の取り扱いに起因すると考えられる健康上の異変、異常所見は見られていない。
- e) 類縁菌の食品分野での使用経験: 文献²⁷⁾によれば *Chryseobacterium* 属に属する菌株では、*C. balustinum* 由来のプロテアーゼが、チーズフレーバー増強の目的で使用されてきた。

(6) 性状

本品は、白～淡黄白色の粉末若しくは粒又は無～淡黄白色の液状で、においがいいか又はわずかに特異なおいがある。

(7) 確認試験

3. (10) 記載の酵素活性測定法に準じて試験を行うとき、酵素活性を示す。

(8) 純度試験

鉛 : Pb として 5.0 µg/g 以下 (2.0g、第 1 法)。

(9) 微生物限度

微生物限度試験法により試験を行うとき、本品 1g につき、細菌数は 50,000 以下である。また大腸菌は認めない。

(10) 酵素活性測定法

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリンを基質として酵素を作用させ、生成するアンモニアをインドフェノール法により測定する。

(i) 試料溶液

操作法により試験するとき、アンモニアの増加が、試料濃度に比例する範囲の濃度になるように、本品に適量の 0.002% Triton X-100 を含む 0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5) または水、他の適切な緩衝液、塩類溶液を加えて溶かし、試料溶液とする。その濃度は、通例、0.04~0.15 単位/ml である。

(ii) 基質溶液

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミンリグリン 1.011g を精密に量り、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 6.5) を加えて溶かし、正確に 100 ml とする。用時調製する。

(iii) アンモニア検量線

塩化アンモニウム 0.314 g を正確に量り、水を加えて溶かし、正確に 1,000 ml とし、アンモニア標準液とする。この液 1 ml、0.9 ml、0.8 ml、0.7 ml、0.6 ml、0.5 ml、0.4 ml、0.3 ml、0.2 ml、0.1 ml を正確に量り、それぞれに水を加え、正確に 10 ml とする。それぞれのアンモニア溶液 1 ml は、アンモニア 10 µg、9 µg、8 µg、7 µg、6 µg、5 µg、4 µg、3 µg、2 µg、1 µg を含む。予め別に分注しておいた水 0.24 ml に、各アンモニア溶液を正確に 0.06 ml 加えてよく振り混ぜる。この液に、発色試液 A 0.3 ml を加え直ちに振り混ぜる。次いで、発色試液 B 0.15 ml を加え直ちに振り混ぜる。さらに、発色試液 C 0.3 ml を加え直ちに振り混ぜる。これを 37±0.5℃ で正確に 20 分間放置した後、流水で冷却し、水を対象とし、波長 630 nm における吸光度を測定する。これより縦軸に各アンモニア溶液の吸光度、横軸にそれぞれの液のアンモニア濃度 (µg/ml) をとり、検量線を作成し、直線 (Y=aX) の傾き a を求める。

(iv) 操作法

試験管に試料溶液 0.1 ml を正確に量り、37±0.5℃ で 1 分間加温する。これに、あらかじめ同温度で 10 分間加温した基質溶液を、正確に 1 ml 加えて直ちに振り混ぜて、反応を開始する。これを 37±0.5℃ で正確に 10 分間反応させた後、トリクロロ酢酸溶液 1 ml を加えて直ちによく振り混ぜ、反応を停止させる。予め別に分注しておいた水 0.24 ml に、この溶液を正確に 0.06 ml 加えてよく振り混ぜる。この液に、発色試液 A 0.3 ml を加え直ちに振り混ぜる。次いで、発色試液 B 0.15 ml を加え直ちに振り混ぜる。さらに、発色試液 C 0.3 ml を加え直ちに振り混ぜる。これを 37±0.5℃ で正確に 20 分間放置した後、流水で冷却し、水を対象とし、波長 630 nm における吸光度 (A_S) を測定する。

別に、試料溶液 0.1 ml を正確に量り、トリクロロ酢酸溶液 1 ml を加えて、37±0.5℃ で 10 分間放置した後、基質溶液 1 ml を加えてよく振り混ぜ、以下同様に操作して、吸光度 (A_{SB}) を測定し、次式により酵素活性を求める。その酵素活性の単位は、操作法の条件で試験するとき、1 分間にアンモニア 1 µmol に相当する吸光度の増加を与える酵素量を 1 単位とする。

$$\text{本品中の酵素活性の単位 (単位/g または単位/ml)} \\ = (A_S - A_{SB}) \times \frac{2.1}{0.1} \times \frac{1}{17.03} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{a} \times \frac{1,000}{W}$$

ただし、W: 試料溶液 1 ml 中の試料の量 (mg, µl)

試薬・試液等

ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミングリシン $C_{15}H_{19}N_3O_6$ (市販試薬)

0.002% Triton X-100 を含むリン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.2 mol/L) 第1液: リン酸一カリウム 27.22 g を量り、0.002% Triton X-100 を含む水を加えて溶かして 1,000 ml とする。第2液: 無水リン酸二ナトリウム 28.39 g を量り、0.002% Triton X-100 を含む水を加えて溶かして 1,000 ml とする。第2液に第1液を加え、pH を 6.5 に調整する。

リン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.2 mol/L) 第1液: リン酸一カリウム 27.22 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。第2液: 無水リン酸二ナトリウム 28.39 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。第2液に第1液を加え、pH を 6.5 に調整する。

トリクロロ酢酸溶液 トリクロロ酢酸 65.36 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。

発色試液 A フェノール 40.46 g、ペンタシアノニトロシル鉄(Ⅲ)酸ナトリウム二水和物 0.15 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。遮光して 4℃ 以下で保存する。

発色試液 B 水酸化カリウム 49.94 g を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。4℃ 以下で保存する。

発色試液 C 無水炭酸カリウム 200.40 g、次亜塩素酸ナトリウム 8.33 ml を量り、水を加えて溶かして 1,000 ml とする。用時調製する。

次亜塩素酸ナトリウム $NaClO$ 食品添加物次亜塩素酸ナトリウムを用いる。

(11) 安定性

保存においては、4℃ で 6 ヶ月安定である。

(12) 食品中での分析方法

本品は、6. で考察した通り、使用基準を設定する必要がないと判断されるため、食品中での本品の定量法の設定は必要ないと考えられる。また、本品は、食品の製造工程において加工助剤として利用されるものであり、最終食品中において機能を与えるものではなく、最終食品中では失活又は分解して、食品の常在成分(蛋白質・ペプチド・アミノ酸)となってしまうため定性的に確認する方法の設定も困難である。

(13) 成分規格案の設定根拠

本品の成分規格は、昭和 34 年厚生省告示 370 号に記載されている 5 種の酵素(パパイン、プロメライン、ペプシン、トリプシン、リゾチーム)の成分規格を参考に設定した。純度試験については、第 53 回 FAO/WHO 合同食品添加物専門家委員会(JECFA)において、食品添加物の重金属試験の規格項目を個別の重要な金属に対する適切な限度試験で置き換えるという方針が出され、第 57 回 JECFA 会議において、食品加工に使用される酵素剤の一般規格から、重金属、ヒ素の規格が削除され、鉛の限度規格が 10 mg/kg から 5 mg/kg に変更されたことから、これに基づき設定した。

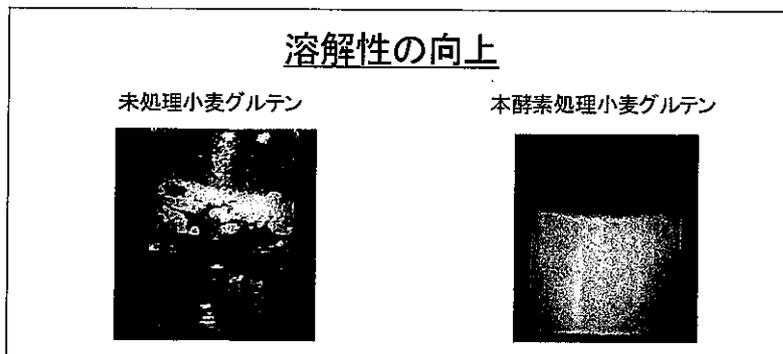
4. 有効性に関する資料

(1) 食品添加物としての有効性

本品により蛋白質の物理的機能特性(溶解性、乳化特性、泡沫特性、ゲル化特性等)を

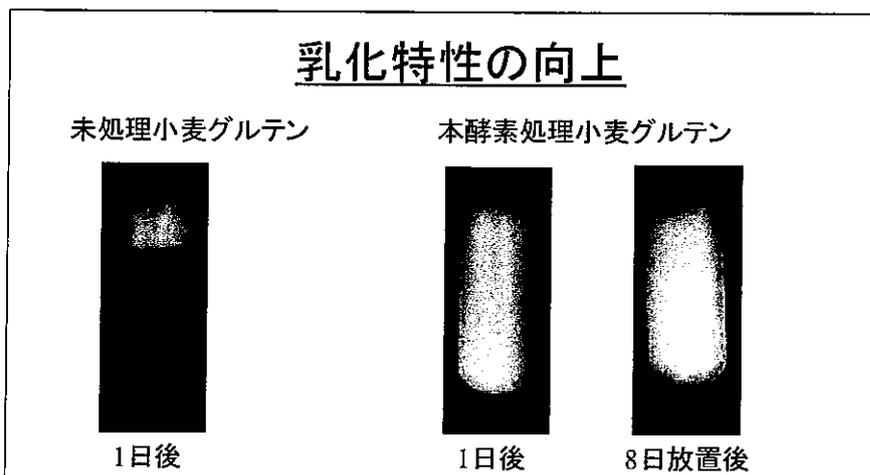
向上させることが出来る²⁸⁻³⁰⁾。以下に、本品の有効性を小麦グルテン、大豆蛋白質、卵白アルブミンに作用させた例を示し説明する。

- 1) 溶解性の向上：本品の処理により調製した脱アミド化グルテンの溶解液と未処理グルテンのそれと比較した。未処理グルテンは、下図の写真左のように、通常の中性付近の pH 領域では水に殆んど溶けず粘着性の物質となり容器の壁面に付着する。一方、本品で処理を施した小麦グルテンは均一に分散溶解し、きれいな乳白色の溶液となる(写真右)³¹⁾。このことより、本品の処理により得られる脱アミド化蛋白質は、ジュース等の飲料に使用できる。



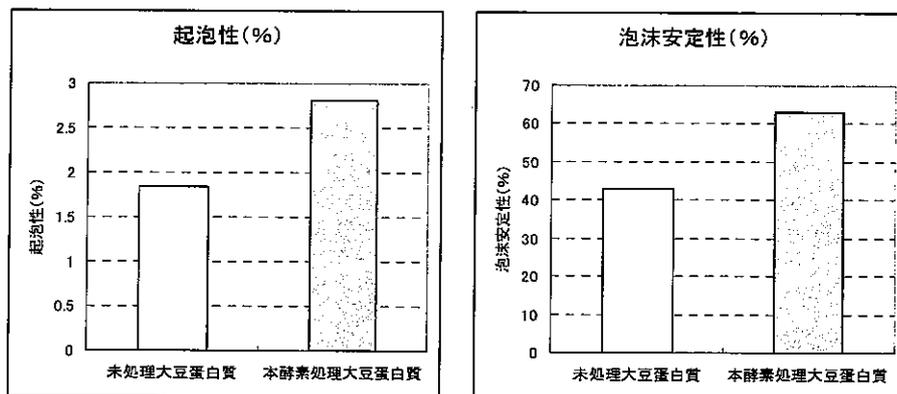
処理条件：200 mmol/L リン酸緩衝液 (pH7.0) 中 10 mg/ml の小麦グルテン懸濁液に、小麦グルテンに対し 1.04% の本品を添加後、40℃、30 時間処理して、脱アミド化グルテン溶解液を得た。

- 2) 乳化特性の向上：本品で処理した小麦グルテンとコーン油を用いて調製した乳化液を未処理グルテンのそれと比較した。未処理グルテンは、下図の写真左のように、通常の中性付近の pH 領域ではエマルジョンを形成できず水層と油層に分離してしまう。しかしながら、本品で処理を施した小麦グルテンは写真右のように、均一できれいなエマルジョンを形成できる。さらに本エマルジョンは、8 日間放置しても崩れることなく非常に安定である³¹⁾。このことより、本品の処理により得られる脱アミド化蛋白質は、ケーキ、菓子、アイスクリーム、コーヒーホワイトナーなどの様々な食品に使用できる。

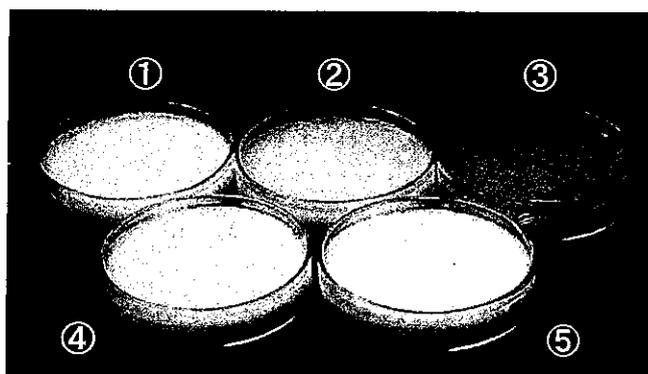


処理条件：4. (1) 1) で得た脱アミド化グルテン溶解液を、0.1 mol/L 酢酸に対して透析後、凍結乾燥により得た脱アミド化グルテン粉末及び対照として未処理グルテン粉末各々の 0.09% 溶液に 10% のコーン油を添加し、激しく攪拌して乳化液を得た。

- 3) 泡沫特性の向上：本品で処理した大豆蛋白質と未処理の大豆蛋白質の泡沫特性（起泡性及び泡沫安定性）を比較した。下図のように、本品で大豆蛋白質を処理することにより、起泡性、泡沫安定性いずれにおいても向上させることができる〔添付資料2〕。本品の処理により得られる脱アミド化蛋白質は、ホイップクリーム、ビール様飲料などの様々な食品に使用できる。



- 4) ゲル化特性の向上：本品で処理した卵白アルブミンと未処理の卵白アルブミンを熱処理して得られたゲルを比較した。次ページの写真のように、未処理の卵白アルブミンは、白色度が高い加熱ゲルを生ずる（①、②）に対し、本品で処理した卵白アルブミンは、半透明のゲルを形成する傾向にあり、その程度は添加酵素量に比例していた（③、④、⑤）。また、レオメーターによりゲル強度を測定したところ、本品で処理した卵白アルブミンは、未処理のものに比べより弾性のあるゲルを形成することができる〔添付資料3〕。これらのことより、本品の処理により得られる脱アミド化蛋白質は、ゼリー、グミなどの様々な食品に応用できる。



- 5) その他の有効性：本品により脱アミド化することにより蛋白質溶液中でのカルシウム溶解性が向上し³²⁾、易吸収性高カルシウム飲料の開発に繋がる。また、本品により脱アミド化された小麦蛋白質はアレルギー誘発性が低減し、低アレルギー化小麦食品の開発にも繋がる可能性がある^{31, 33)}。その他にも農産物から蛋白質の抽出効率の向上³²⁾、蛋白質分解酵素による分解率の向上（消化性の向上）³²⁾、小麦グルテンのドウ(dough)の伸展性向上³²⁾などが報告されている。
- 6) 有効性のまとめ：下表に本品の有効性を示す例をまとめた。栄養価や栄養機能性が高いのにも関わらずその物理的な機能特性が低いために利用が制限されていた乳清蛋白質、大豆蛋白質などは、本品によって物理的機能特性を改良することにより様々な食品に利

用することが可能となり、消費者の健康増進に寄与することが期待される。また、本品は将来の食糧危機が懸念されている状況で、有用蛋白質資源の有効利用に寄与するものとして、消費者の利益に貢献することが期待される。

対象蛋白質資源	有効性	文献
乳清蛋白質	カゼイン製造の際に生じる乳清蛋白質は高栄養価で栄養機能性の高い食品素材であるが、その利用率は3%程度である。本品によって乳清蛋白質の物性・機能特性を変え、様々な食品加工に応用できる。	28) 松村ら。 30) Gu et al.
コーングルテン (ゼイン)	コーン油・コーンスターチ製造の副産物であるゼインの溶解性向上。即溶性に優れたコーンスープ粉末製造に応用できる。	34) Yong et al.
小麦蛋白質 (グルテン)	不溶性グルテンの溶解性を向上させることにより、小麦グルテンの食品への用途が拡大される。	31) Yong. 32) 特許公報 特許第 3609648 号 35) US Patent 6756221
卵白	卵白の起泡速度の向上や卵黄の乳化安定性を向上させることにより、粉末卵白・粉末卵黄の品質を向上させることが出来る。その結果、粉末卵白・卵黄を、微生物汚染リスクの高い液卵の代替として用いることが可能となる。また、ゲル強度や透明度を向上させることが出来る。	35) US Patent 6756221 〔添付資料 3〕
大豆蛋白質	高栄養価で栄養機能性の高い大豆蛋白質の有効利用と用途拡大。大豆蛋白質の溶解性・起泡性・乳化性を向上させ、豆乳飲料、機能性ペプチド製造に利用される。	32) 特許公報 特許第 3609648 号 〔添付資料 2〕 35) US Patent 6756221

(2) 他の蛋白質脱アミド化方法との比較

蛋白質を脱アミド化する方法は、既存添加物に位置付けられる酵素を用いた方法として①プロテアーゼによる方法³⁶⁻³⁸⁾、②トランスグルタミナーゼによる方法³⁹⁻⁴¹⁾、③ペプチドグルタミナーゼによる方法⁴²⁻⁴⁴⁾が報告されている。しかしながら、これらの方法はいずれも、以下の理由により実用化は困難であった。①においては、蛋白質が分解されて、本来目指すところの蛋白質の機能特性が損なわれてしまう。②においては、トランスグルタミナーゼの本来の反応である蛋白質中のリジン残基とグルタミン残基との間の架橋反応を防ぐ為に、予めリジン残基を化学修飾により保護して、脱アミド化後にその保護基をはずす必要があり、コスト的にも安全性の観点からも実用化が不可能であった。③においては、ペプチドグルタミナーゼは低分子ペプチドには作用するが蛋白質に作用しない酵素であるため、予めプロテアーゼにより蛋白質を低分子化しておく必要があり、蛋白質の機能特性が損なわれてしまうため実用的ではなかった。

物理化学的方法として④高温での塩酸処理、⑤温和な条件でのアルカリ処理、⑥イオン交換樹脂による処理、などが報告されている⁴⁵⁾。しかしながらこれらの方法でも、蛋白質の分解（ペプチド結合の切断）は避けられず、また⑤においては、有毒物質として知られるリジノアラニン⁴⁶⁾の生成の危険がある。また⑥においては、反応効率が低くコスト的に実用化が困難であった。唯一④の方法により、脱アミド化された小麦グルテンが市販されている（Amylum 社製「SWP100」、片山化学社製「グルパール」）。そこで、以下に本品により得られた脱アミド化小麦グルテンと、SWP100 との、蛋白質の機能特性の比較試験を行ったのでその結果のまとめを以下に示す。なお、以下に示す本品による脱アミド化グルテンは次の方法で製造した。20 mmol/L リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中 10 mg/ml の小麦グルテン懸濁液に、小麦グルテンに対して 0.4% の本品を添加し 37℃ で 24 時間処理し、70℃ で 60 分

間熱処理を施した後、水に対して透析後、凍結乾燥して脱アミド化グルテン粉末を得た。

	溶解性 (pH 5~7)	乳化特性		泡沫特性	
		乳化性	乳化安定性	起泡性	泡沫安定性
本品による脱アミド化グルテン	良好	非常に良好	中	中	非常に良好
SWP100 (Amylum 社製)	中	中	良好	中	悪い

SWP100: Amylum Group (ベルギー) が販売している酸処理脱アミド化グルテン

このように、本品により得られた脱アミド化小麦グルテンの物理的機能特性は、溶解性、乳化特性、泡沫特性全般に渡って、中程度から非常に良好であるのに対し、酸処理により得られる市販脱アミド化グルテンは、溶解性と起泡性においては優れているが、乳化性、乳化安定性、泡沫安定性においてかなり劣っていた。

(3) 食品中での安定性

本品は、食品又は食品蛋白質素材の製造工程において、70℃以上の熱処理により不活性化されるため、食品中へ残存してその作用を示すことはない。【図表7】に本品の失活条件に関するデータを示す。

(4) 食品中の栄養成分に及ぼす影響

本品を使用した場合の食品成分の変化は、蛋白質中のグルタミン残基のグルタミン酸残基への変換である。通常食品蛋白質中のグルタミンの大部分は、胃酸存在下でグルタミン酸に変化していると考えられる。よって、本品により処理された食品蛋白質を摂取しても、通常の食品蛋白質を摂取した場合と栄養学的に大差はないと考えられる。また、本来酵素は、他の物理化学的処理と異なり、特異性の高い触媒であり、反応条件も常温付近(～50℃)、常圧であるため、蛋白質以外の食品成分が変化することは考えにくい。また、本品は、高度に精製されており、副反応もほとんどない。

5. 安全性に関する資料

(1) 生産菌の安全性に関する検討

本品の生産菌株が非病原性であり、非トキシン生産性であることを確認するために、農林水産省農林水産技術会の研究成果「動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発」⁴⁶⁾に記載の方法及び文献47に記載の方法に従って、生菌体懸濁液のマウス静脈内接種及び経口接種試験並びに菌体培養上清液及び破碎上清液のマウス静脈内接種試験を行ったが、死亡例、体重推移の異常、生残菌は認められなかった。また、本菌の培養液中にはエンドトキシン(リポポリサッカライド)活性は検出されなかった〔添付資料1〕。さらに文献検索の結果、本菌を含む類縁菌においてトキシン生産性に関する報告はなかった。よって、本生産菌株は非病原性・非トキシン生産性であると考えられた。

(2) 本品が消化管内で分解して食品常在成分となることの確認のための検討

元来酵素は、天然に存在する蛋白質(アミノ酸のポリマー、糖や脂質等が結合している場合もある)であり、食品常在成分からなる物質である。本品も、【図表1】に示すアミノ酸組成からなることが明らかにされている。このことをより明らかにするため、衛化第29号「食品添加物の指定及び使用基準改正に関する指針」の表2に従って、以下に試験及び考察を加えた。

- 1) 通常の使用条件下で、本品が容易に消化管内で分解して食品常在成分と同一になること：本品の人工胃液による消化実験を行った〔添付資料4〕。消化実験に用いた人工胃液 (Simulated Gastric Fluid, SGF) の組成は ILSI (International Life Science Institute) の Allergy and Immunology Institute の提案している国際バリデーション試験方法⁴⁸⁾に、人工腸液 (Simulated Intestinal Fluid, SIF) の組成は US Pharmacopia Ver. 28⁶⁰⁾に従った。【図表8】に示すように、人工胃液による本品の分解は非常に速やかに行われ、pH1.2では反応開始後0.5分で、pH2.0では5分後に、本品(図中のPG)のバンドが消失し分解産物も SDS-PAGE で確認できないほどに分解された。これは、本品が速やかに SDS-PAGE 上で確認できないほどの大きさのペプチド、あるいはアミノ酸レベルにまで分解されることを示している。食品蛋白質の中で、速やかに分解されるものとしてホウレンソウの Rubisco、分解されにくいものとして卵白オボムコイド(図中のOvm)、非常に分解されにくいものとして牛乳のβ-ラクトグロブリン(図中のBLG)⁴⁹⁾を対象蛋白質として用いた。本品は、速やかに分解される Rubisco とほぼ同等の易分解性を示し、卵白オボムコイド、牛乳β-ラクトグロブリンは、これらに比べ分解性が非常に悪いことが示された。

また、人工腸液中での分解性も、他の食品蛋白質 Rubisco、卵白オボムコイドと同等の分解性を示した。以上の実験結果から、本品は消化管内で非常に速やかに分解され、食品常在成分と同一になることが示された。

- 2) 消化管内での分解に関わる主要な因子(pH、酵素等)が明らかであること：本品の人工胃液による消化実験は ILSI により国際バリデーションとして提案されている試験方法に従っているが、その条件・因子は、pH1.2~2.0の酸性条件であること、及び0.075%ペプシンである。また、腸液(中性域)中のトリプシン、キモトリプシンも分解に関与している。〔添付資料4〕
- 3) 本品の通常の使用条件下で適正な量を使用した場合、本品の体内への吸収が食品成分と同程度であり、他の栄養成分の吸収を阻害しないこと：1)で示したとおり、本品は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来の蛋白質と同じように体内へ吸収されると考えられる。また、他の食品由来の蛋白質と同じように体内へ吸収されるため、糖質、ミネラル、ビタミンなどその他の栄養成分の吸収を阻害する懸念はない。
- 4) 摂取された本品の未加水分解物又は部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されないこと。更に、未加水分解物又は部分加水分解物が生体組織中に蓄積しないこと：1)で示したとおり、本品は人工胃液内においては非常に速やかに分解され、未加水分解物、部分加水分解物は確認されない。よって、未加水分解物、部分加水分解物が大量に糞便中に排泄されることも、生体組織中に蓄積する懸念もない。
- 5) 本品を使用した食品を摂取したとき、当該食品の主成分の過剰摂取の問題が起きないこと：本品を使用した食品蛋白質の変化は、グルタミン残基のグルタミン酸残基への変換である。通常食品蛋白質中のグルタミンの大部分は、胃酸存在下でグルタミン酸に変化していると考えられる。よって、本品により処理された食品蛋白質を摂取しても、通常の食品蛋白質を摂取した場合と栄養学的に大差はない。

補足：グルタミン酸について、かつてそのナトリウム塩がチャイニーズレストラン・シンドロームとの関連を疑われたことがあったが、2000年に詳細に検討され、グルタミン酸ナトリウムばかりでなくグルタミン酸の過剰摂取と上記症状との関連性が否定され、グルタミン酸の一日許容摂取量(ADI)は特定しないとされている⁴⁹⁾。

(3) 毒性に関する資料

衛化第 29 号「食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針」の IV 1. (1) では、「食品添加物の指定の要請に際しては、原則として、同指針の表 1 に示された資料を添付する。ただし、当該食品添加物が食品常在成分であるか又は食品内若しくは消化管内で分解して食品常在成分になることが科学的に明らかである場合には毒性に関する資料の添付を省略することができるが、げっ歯類の 28 日間反復投与毒性試験および変異原性試験は添付することが望ましい。なお、上記ただし書に該当するか否かは、表 2 の事項について検討の上判断することが必要である」とされている。

5. (2) において、衛化第 29 号の表 2 に従って検討した結果、本品が他の食品蛋白質と同様天然に存在するアミノ酸からなること、また人工胃液を用いた試験において消化管内で速やかに分解されることが示された。従って、衛化第 29 号 IV 1. (1) のただし書に従い下記の試験を実施した。なお、反復投与毒性試験は 28 日間に換えてより投与期間が長く、毒性学的知見の有無をより正確に得られる 90 日間とした。

- 1) 90 日間反復投与毒性試験〔添付資料 5〕：厚生省ガイドライン（医薬審第 655 号，1999）および食品添加物の指定および使用基準改正に関する指針（衛化第 29 号，1996）に従い、医薬品 GLP (1997) に準じて実施した。本品の投与量は、0、635、1,269、2,538 mg/kg/日とし、Sprague-Dawley 系 SPF ラット [Crj:CD (SD) IGS, 6 週齢, 12 匹/群/性] に 13 週間強制経口投与した。その結果、いずれの群においても死亡動物は認められなかった。一般状態、体重、摂餌量、摂水量、眼科学検査、血液学検査、血液化学検査、器官重量、剖検および病理組織学検査のいずれにおいても被験物質による影響はみられなかった。尿検査では 2,538 mg/kg 投与群の雌でナトリウムおよび塩素の排泄量の高値が見られたが、これらは被験物質に由来するナトリウムおよび塩素の増加に伴う体液恒常性維持の結果と考えられた。以上の結果より、無毒性量は雌雄共に 2,538 mg/kg/日を上回ると判断された。
- 2) 変異原性試験
 - a) 微生物を用いる復帰変異試験〔添付資料 6〕：OECD ガイドライン (No. 471, 1997) に従い、医薬品 GLP (1997) および OECD GLP (1997) に準じて実施した。*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535、TA1537 および *Escherichia coli* WP2uvr の 5 菌株を用い、5000 µg/plate を最高用量とし公比 2 で 5 段階 (313~5,000 µg/plate) について試験を実施した。本試験を 2 回繰り返した結果、いずれも代謝活性化の有無にかかわらず 5 菌株とも陰性対照値の 2 倍以上となる変異コロニーの増加は認められず陰性となった。
 - b) 哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験〔添付資料 7〕：OECD ガイドライン (No. 473, 1997) に従い、医薬品 GLP (1997) および OECD GLP (1997) に準じて実施した。チャイニーズ・ハムスター肺線腫由来株化細胞 (CHL/IU) を用い、50% の細胞増殖抑制が見られた用量を最高に 3 段階の用量について標本観察を実施した。即ち、短時間処理 (6 h) 非代謝活性化系では 213、425 および 675 µg/ml、短時間処理代謝活性化系では 106、213、425 µg/ml、連続処理系 (24 h) は 63、125、250 µg/ml について標本を観察し、その結果、すべての試験系において染色体構造異常および数異常のいずれも増加せず陰性となった。
 - c) げっ歯類を用いる小核試験〔添付資料 8〕：OECD ガイドライン (No. 474, 1997) に従い、医薬品 GLP (1997) および OECD GLP (1997) に準じて実施した。CDI (ICR) マウス (雄) を用い、24 時間間隔で 2 回 (500、1,000 および 2,000 mg/kg) 経口投与後、骨髓細胞の塗抹標本作製し小核を有する多染性赤血球数を計測した。その結果、いずれの

用量においても小核を有する多染性赤血球の出現頻度は増加せず陰性となった。

なお、国際機関によって設定された食品用酵素剤一般に対するガイドラインにおける安全性に関する資料は、〔添付資料9〕の11ページに記載した。JECFAにおいては、SCF及び文献24等を引用しており、「げっ歯類を用いた90日間反復投与毒性試験」、「細菌による変異原性試験」、「染色体異常試験」、「一日摂取量に関する資料」、「基原微生物の安全性（生産菌は、非病原性、非毒素生産性であること）」が要求されている。

(4) アレルギー誘発性に関する資料

本品のアレルギー誘発性評価は、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）⁵⁹⁾に従って行った。本品は遺伝子組換え微生物を利用して製造されたものではないが、対象物質が蛋白質であることより同基準に従うことが妥当と考えられた。

- 1) 既知のアレルゲンとの一次配列の相同性の比較：調査に用いた Allergen Database for Food Safety (ADSF、国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)など5つのデータベース検索サイトを【図表9】に示した。これらは、ILSI-HESI (International Life Science Institute- Health and Environmental Sciences Institute) の Protein Allergenicity Technical Committee 報告書 (Chapter 6, 2005年2月) に記載されているものの中から、相同性検索機能を備えているサイトとして選んだ。検索基準として、6、7および8アミノ酸の連続一致検索、80アミノ酸スライディングウインドウ検索（配列を80アミノ酸ごとに区切り、その中で35%以上の相同性を示すものの検索）を行った。

結果を【図表10】にまとめた。連続6アミノ酸の一致が3件見出されたが、連続7及び8アミノ酸ではヒットするものはどのデータベースにおいても無かった。また、80アミノ酸スライディングウインドウ検索でもヒットするものもなかった。

連続6アミノ酸でヒットした3件は、卵由来のオボムコイド (Gal d1)、ラテックスアレルゲンであるゴムの木由来クラスIキチナーゼ(putative) (Hev b11.0101 とそのアイソザイム Hev b11.0102)、*Aspergillus fumigatus* 由来の機能未知蛋白質 (Asp f9 と Asp f16、両者は相同蛋白質) であるが、これら三つの蛋白質と本品との全体の相同性は認められなかった（【図表11~15】にそれぞれのアレルゲンとのマルチプルアライメントを示し、〔添付資料10〕にE-valueの検討結果を示す）。80アミノ酸スライディングウインドウ検索の結果からも局所的な相同性は認められなかったため、6アミノ酸の連続一致はノイズ（偶然の一致）の範囲内と判断できる可能性が高いと考えられた（下記注参照）。また一般にアレルギー反応は、抗原タンパク分子が少なくとも2つ以上のIgE抗体と結合し、IgEレセプターを架橋することで起こると言われており、1分子のIgE抗体のみではアレルギー性反応を惹起できないことが明らかとなっている⁵⁰⁾。本品においては、1種のアレルゲンにつき、連続6アミノ酸の一致が一ヶ所しか見られなかった。従って、仮にその一ヶ所に抗体が結合したとしてもアレルギー反応を誘発する可能性は無い若しくは非常に低いことを示している。

このように、連続6アミノ酸の一致は、マルチプルアライメント、80アミノ酸スライディングウインドウ検索、E-value分析の結果から偶然の一致であると考えられ、また一種のアレルゲンにつき一ヶ所しか見られないことより、本品がアレルギー誘発性を有する可能性は無い若しくは極めて低いと考えられる。

補足：連続6アミノ酸の一致が見られた対象アレルゲンにおいて、推定されているエピトープとこれら連続6アミノ酸の一致箇所との関係を分析した〔添付資料12〕。結果、ゴムの木由来

のクラス I キチナーゼにおいては、エピトープとされるドメイン（ヘベイン様ドメイン）とは別の位置での一致であった。いくつかのグループでの研究報告をすべて総合すると、ほぼ全域がエピトープとされるオボムコイドにおいては、本連続6アミノ酸配列に推定エピトープが含まれていた。*Aspergillus fumigatus* 由来の機能未知蛋白質については、マイナーなアレルゲンであるためエピトープが推定されていない。

注：アミノ酸配列から *in silico* においてアレルゲン性を評価する試みは ILSI や International Food Biotechnology Council (IFBC) などで国際的に広く行われており、1996 年には「既知アレルゲンタンパクとの8以上連続したアミノ酸の一致」でアレルゲン性の疑いがあるとの論文⁵¹⁾が発せられ、CODEX 委員会による審査においては、8アミノ酸以上の一致を指標として安全性審査が行われている。一方で2001年、FAO/WHO 専門家会議は6アミノ酸以上の連続完全一致を指標として評価する指針としてアレルゲン性評価の判断樹 (decision tree) を設けた⁵²⁾。これは従来 CODEX が指標としていた8アミノ酸を基準とした指標にかわって6アミノ酸連続完全一致を指標として採用している。しかし6アミノ酸連続完全一致を指標とする調査はノイズ (=アレルゲン性有無とは関係のない偶然の一致) が多いため偽陽性が出やすいという指摘がある⁵³⁾。重ねて1次配列で相同性が高くないにもかかわらず、3次元構造が類似している場合にアレルゲン性を示すことがあるという報告もあり⁵⁴⁾、現在も相同性検索でのアレルゲン性評価の判断指標については統一的な基準が設定されていない。

- 2) 人工胃液中での分解実験：5. (2) 1) で述べたように、人工胃液及び人工腸液中での分解実験の結果、本品は最も分解性の早い蛋白質グループに分類され、人工胃液中では0.5分後に既に分解断片も検出されなかった。従って、本検討において、本品はアレルゲン性を有する可能性が低いと判断された。

以上の検討を総合的に判断し、本品のアレルギー誘発性は極めて低い、と結論した。

(5) 体内動態に関する資料

5. (2) で考察したとおり、本品は消化管内で速やかに分解され、他の食品由来の蛋白質と同じように体内へ吸収されると考えられる。

(6) 一日摂取量に関する資料

一日摂取量に関する考察：本品は食品添加物として様々な食品に使用されることが推定されるが、使用方法は大きく分けて次の二通りがある。一つは、①食品蛋白質素材を本品により脱アミド化して、得られた改質蛋白質が各種加工食品に添加される場合、二つ目は②各種加工食品の製造工程に本品が添加される場合、である。食品蛋白質素材には、乳清蛋白質、カゼイン、小麦グルテン、大豆蛋白質、卵白などがあり、加工食品には、パン、ケーキ、麺類などの小麦加工食品、豆腐、油揚げなどの大豆加工食品、水産練り製品、ハム・ソーセージなどの魚肉・畜肉加工食品、チーズなどの乳製品、ビール、茶などの飲料、醤油などの調味料がある。

① の場合：日本で流通している上記蛋白質素材の全量（輸入量と生産量の和）が本品により処理され食品として消費された場合を仮定し、本品の添加量から本品の一日推定摂取量を求めたところ 14.032 mg/人/日であった【図表 16】。尚、本品の添加量は、【図表 18】に記載の文献から得られる添加量、蛋白質当たり 0.49~1.04%の値を用いた【図表 18】。この値を平均体重 50 kg で除すると、本品の一日推定摂取量は 0.281 mg/kg 体重/日と計算された。

② の場合：本品が使用される可能性のある加工食品のすべてに本品が添加され全量が食品として消費された場合を仮定し、「平成 16 年国民栄養調査票の栄養素等摂取量（総数）」

から得られるそれぞれの加工食品の国民一人当たりの摂取量と本品の添加量から、本品の一日推定摂取量を求めたところ 17.550 mg/人/日であった【図表 17】。尚、本品の添加量は文献 32 中の最高添加量である蛋白質当たり 0.09%の値を用いた【図表 18】。この値を日本人の平均体重 50 kg で除すると、本品の一日推定摂取量は 0.351 mg/kg 体重/日と計算された。

6. 使用基準に関する資料

5. (3) 1) より、本品の 90 日間反復投与毒性試験より評価された無毒性量 (NOEL) は 2,538 mg/kg 体重/日であり、安全係数を 100 とした場合、一日許容摂取量 (ADI) は 25.38 mg/kg 体重/日と算出される。

一方、5. (6) で考察したように本品の一日推定摂取量 (EDI) は、①の場合と②の場合の和である 0.632 mg/kg 体重/日であり、ADI 25.38 mg/kg 体重/日より十分に低い値である。仮に、本品の添加量を 5. (6) で設定した量の 10 倍としても（経済性の観点及び最適効果を得る添加量の観点から非現実的ではあるが）EDI は 6.32 mg/kg 体重/日であり、ADI を超えることはない。また、5. (2) 1) ~ 4) に記述した通り、本品は消化管内で速やかに分解され食品の常在成分になる。さらに本品は食品蛋白質素材の改良若しくは食品の製造の際に加工助剤として用いられるものであり、過剰摂取の可能性は低いと考えられる。よって、使用基準は設定する必要は無いと判断した。

尚、最近の JECFA での酵素の評価方法に従うと次の様になる。

5. (3) 1) より、本品の 90 日間反復投与毒性試験より評価された NOEL は 2,538 mg/kg 体重/日であり、5. (6) で考察した本品の EDI は、①の場合と②の場合の和である 0.632mg/kg 体重/日である。NOEL と EDI を比較した安全マージンは $2,538/0.632=4,016$ であり、十分に大きな安全幅を確保できる。よって、ADI は設定する必要は無いと判断できる。

【図表1】

プロテイングルタミナーゼのアミノ酸配列（アミノ酸の一文字表記）

LASVIPDVATLNSLFNQIKNQSCGTSTASSPCITFRYPVD 40
 GCYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVYGNLKASTGTCCVAW 80
 SYHVAI LVS YKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTD TAWRNA 120
 CVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYRSPSNSYLYDNNLINTN 160
 CVLTKFSLLSGCSPSPAPDVSSCGF 185

【図表2】

プロテイングルタミナーゼのアミノ酸組成

アミノ酸	残基数
Asp	7
Asn	16
Thr	13
Ser	27
Glu	2
Gln	4
Gly	11
Ala	15
Val	14
Met	2
Ile	8
Leu	12
Tyr	11
Phe	6
Lys	7
His	2
Arg	6
Pro	9
Trp	2
Cys	11
合計	185

【図表3】

プロテイングルタミナーゼの速度定数

基質	K_m (mM)	k_{cat} (min^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
カゼイン	0.36	323.8	903.7
インシュリン B 鎖、酸化型	0.78	974.5	1250.4
Z-Gln-Gly	1.58	525.9	333.6
Gly-Gln-O-methyl	1.47	342.8	232.8
Gly-Gln-Gly	41.01	410.8	10.0
Phe-Gln-Gly-Pro	16.25	129.5	8.0
Gly-Gln-Pro-Arg	6.36	14.6	2.3
Z-Gln	14.50	120.7	8.5
Gly-Gln	155.20	275.0	1.8
Gln	99.75	36.2	0.36

【図表4】

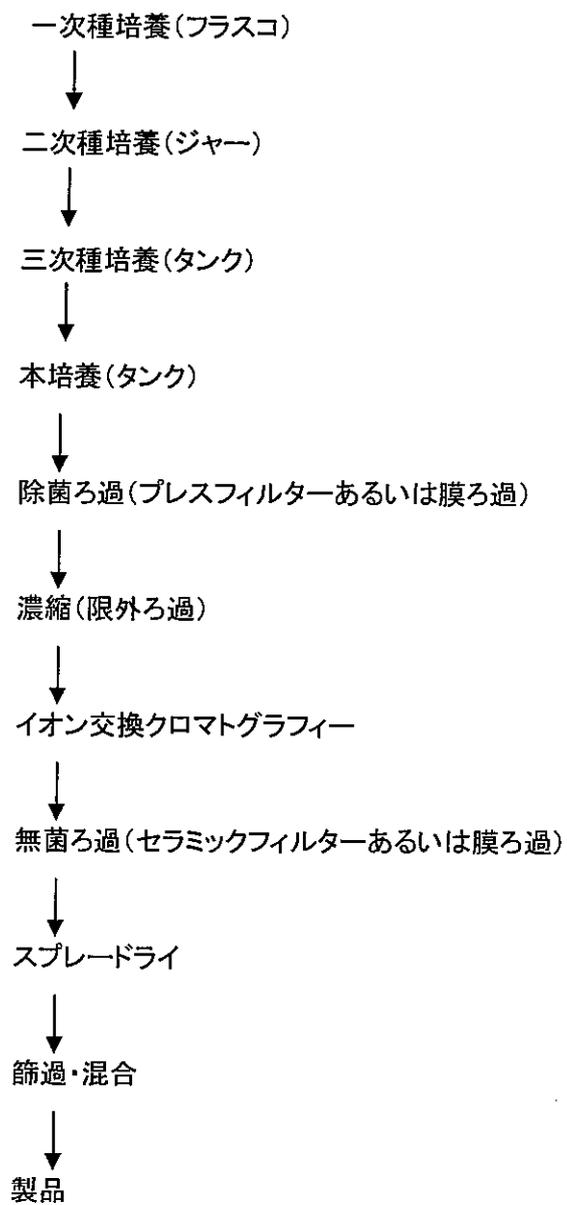
プロテイングルタミナーゼの各種蛋白質に対する反応性

蛋白質	比活性 ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{a}}$)	蛋白質	比活性 ($\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \pm \text{SD}^{\text{a}}$)
α -カゼイン	19.12 \pm 0.51	トウモロコシゼイン	0.655 \pm 0.176
β -カゼイン	18.11 \pm 0.15	α -キモトリプシノーゲンA	0.650 \pm 0.118
小麦グルテン ^{b)}	7.200 \pm 0.333	アクチン	0.450 \pm 0.022
小麦グリアジン ^{b)}	5.473 \pm 0.017	アプロチニン	0.224 \pm 0.064
リボヌクレアーゼA	2.912 \pm 0.367	ニワトリ筋肉粉末	0.210 \pm 0.034
分離大豆蛋白質	1.170 \pm 0.064	コラーゲン (牛Type I) ^{b)}	0.177 \pm 0.017
α -ラクトアルブミン	0.836 \pm 0.009	ミオグロビン	0.014 \pm 0.001
β -ラクトグロブリン	0.728 \pm 0.001	血清アルブミン	0.009 \pm 0.001
ゼラチン (牛 Type B)	0.696 \pm 0.100	卵白オボアルブミン	0.005 \pm 0.002

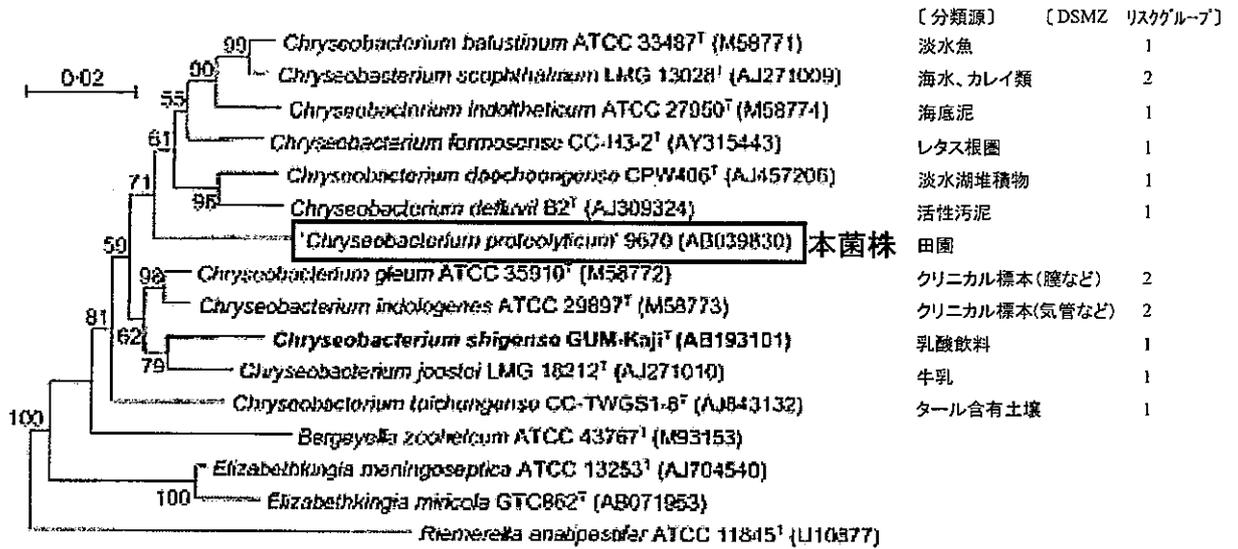
^{a)} 3回の測定の平均値と標準偏差を示す。 ^{b)} 反応開始時はサスペンション状態。

【図表5】

本品の製造方法



【図表6】 *Chryseobacterium* 属の 16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹(文献 23 より引用)

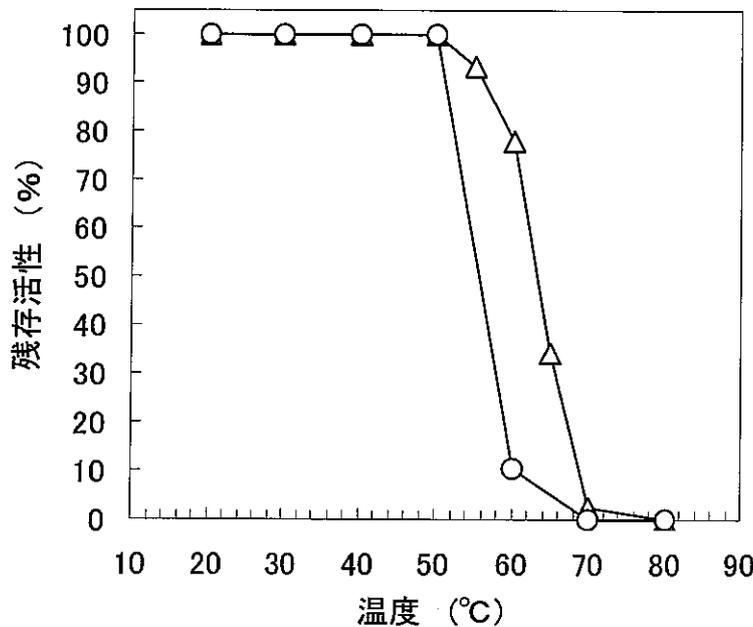


〔分類源〕は、文献 8、21、22、23 及びそれらに引用されている文献から記載した。〔DSMZ リスクグループ〕は、<http://www.dsmz.de/microorganisms/html/bacteria.genus/chryseobacterium.html>から記載した。

【図表7】

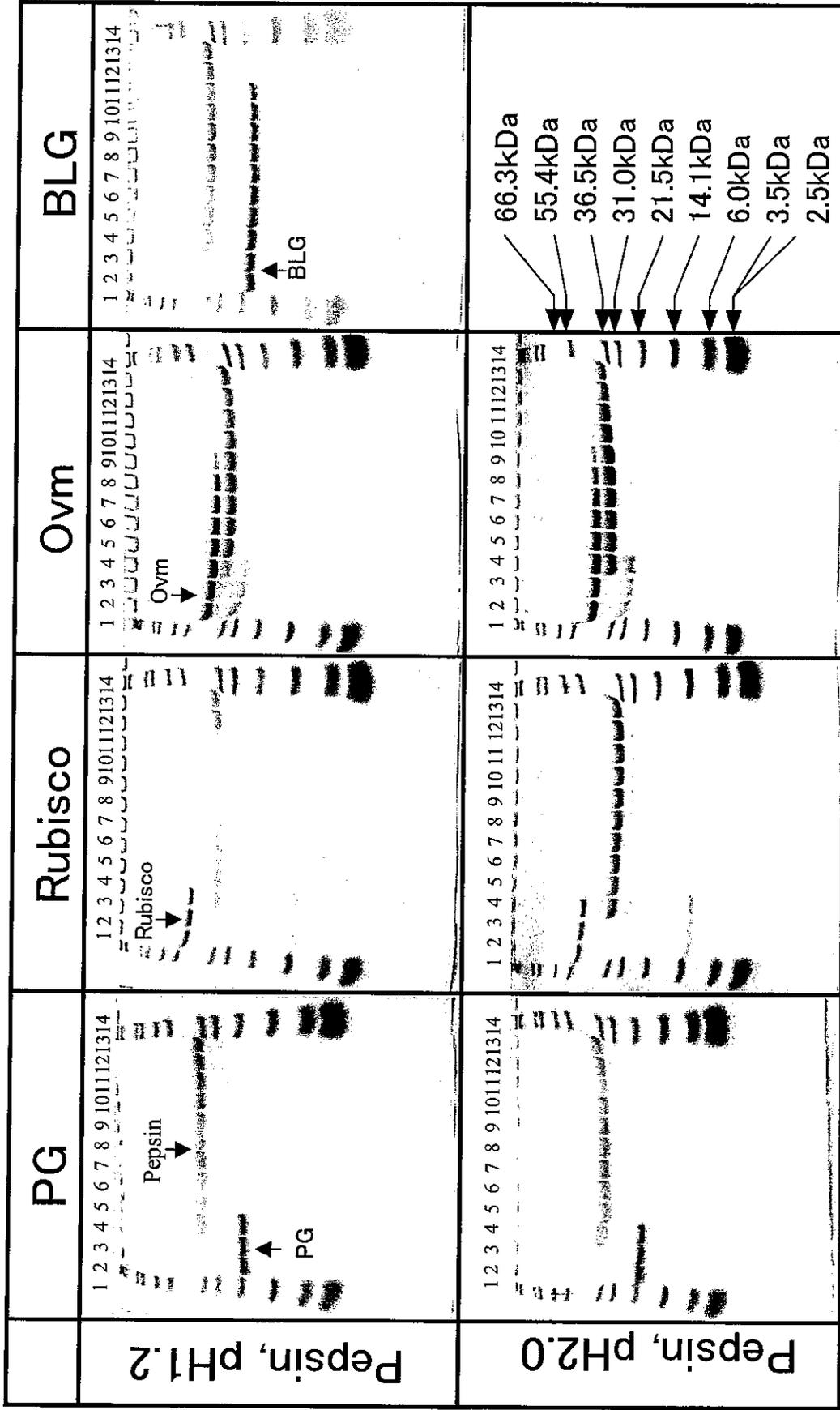
プロテイングルタミナーゼの温度安定性

50 mM りん酸緩衝液 (pH7.0) 中、各温度で 10 分 (△)、60 分 (○) 処理後の残存活性を示す。



【図表8】

人工胃液消化試験の結果



レーン1, 14 : 分子量マーカー
 レーン4~11 : 試験蛋白+ペプシン、順に0, 0.5, 2, 5, 10, 20, 30, 60分
 ; レーン2, 3 : 試験蛋白のみ、順に0分, 60分
 ; レーン12, 13 : ペプシンのみ、順に0分, 60分

【図表9】

サイト名	URL
ADFS	http://allergen.nih.gov/ADFS/
Allermatch	http://www.allermatch.org/
SDAP	http://fermi.utmb.edu/SDAP/sdap_ver.tml
FARRP	http://www.allergenonline.com/
Allerpredict	http://sdmc.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/Allergen/

【図表10】

検索実施日	データベースサイト名	検索結果				
		連続完全一致 アミノ酸数				80mer スライディング ウインドウサーチ (※2)
		8	7	6	6アミノ酸連続完全一致 したアレルゲンタンパク	
2006/4/28	Allergen Database for Food Safety (ADFS)	0	0	2 (1)	Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2006/4/28	AllerMatch	0	0	5 (3)	Asp f 9 : TSTASS Asp f 16 : TSTASS Gal d 1 : SSYANT Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2005/9/1 (※1)	Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)	0	0	5 (3)	Asp f 9 : TSTASS Asp f 16 : TSTASS Gal d 1 : SSYANT Hev b 11.0101 : CSPSPA Hev b 11.0102 : CSPSPA	no hits
2006/4/28	FARRP	0	0	0		no hits
2006/4/28	AllerPredict	0	0	0	no hits	no hits

(※1) SDAPは2006年4月28日時点でサーチが実行できなかったため、過去のデータを載せた

(※2) 80mer Searchの結果は80mer以上で35%のidentityを示すものがないとき、no hitsと表記した

【図表 11】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase -----LASVIPDVA
Hev_b_11.0101 EQCGRQAGGALCPGGLCCSQYGCANTPEYCGSGCQSQCDDGGGGEDGGIDLGSIIIS-RS
                                         *.*.*. :

Protein-glutaminase TLNSLFNQIKNQSCGTS-----TASSPC
Hev_b_11.0101 TFEEMLKHRNDAACPAGKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTTGDVDTCKREIAAFFGQTSHATT
*:::~::~ : * :.
                                         * :.

Protein-glutaminase ITFRYPVDGCIYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVY----GNLKASTGTCCVAWSY-----
Hev_b_11.0101 GGWPTAPDGPYAWGYCYKEELNQASSYCSPPAYPCAPGKKYYGRGPIQLSWNNYNGQCG
. : . ** ** . : : * : . * . . * * : . * . :.*.*

Protein-glutaminase HVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAG---
Hev_b_11.0101 QALGLDLLNNDLVATDRVISFKAAIWFWMTPQFPKPSCHDVTGQWSPTGHDISAGRAP
:. * :*.. * :.*.*. . :* : : * :. * . * :. : **

Protein-glutaminase -----NVYYRSPSNSLYDNNLINTNCVLTKFSLLSGCSPSPAPDVS---SCGF-
Hev_b_11.0101 GYGVITNIINGGLECGRWDARVEDRIGFYKRYCDMFAVGYSNLDVCYNQTPFGLG
* : . . . : * : : . : : . : . . * . * :
    
```

【図表 12】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase -----LASVIPDVA
Hev_b_11.0102 EQCGRQAGGALCPGGLCCSQYGCANTPEYCGSGCQSQCDDGGVGGEGGCVDLGSIIIS-RS
                                         *.*.*. :

Protein-glutaminase TLNSLFNQIKNQSCGTS-----TASSPC
Hev_b_11.0102 TFEEMLKHRNNAACPAGKGFYTYDAFISAAKAFPAFGTTGDVDTCKREIAAFFGQTSHATT
*:::~::~ : * * :.
                                         * :.

Protein-glutaminase ITFRYPVDGCIYARAHKMRQILMNNGYDCEKQFVY----GNLKASTGTCCVAWSY-----
Hev_b_11.0102 GGWPTAPDGPYAWGYCHKEELNQASSYCSPPAYPCAPGKKYYGRGPIQLSWNNYNGQCG
. : . ** ** . : : * : . * . . * * : . * . :.*.*

Protein-glutaminase HVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAG---
Hev_b_11.0102 QALGLDLLNNDLVATDRVISFKAAIWFWMTPQFPKPSCHDVTGQWSPTGHDISAGRAP
:. * :*.. * :.*.*. . :* : : * :. * . * :. : **

Protein-glutaminase -----NVYYRSPSNSLYDNNLINTNCVLTKFSLLSGCSPSPAPDVS---SCGF-
Hev_b_11.0102 GYGVITNIINGGLECGSGWDARVEDRIGFYKRYCDMFAVGYSNLDVCYNQTPFGLG
* : . . . : * : : . : : . : . . * . * :
    
```

【図表 13】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase      ---LASVIPDVATLNS----LFNQIKNQSCGTS--TASSPCITFRYPVD-GCYARAHKMR
Ovomucoid                AEVDCSRFPNATDKEGKDLVLCNKDLRPICGTDGVTYTNDCLLCAYSIEFGTNISKEHDG
                        .* :*: : . : * : . ***. * : . * : * : : * . :
Protein-glutaminase      QILMNNGYDCEKQFVYGNLKASTGTCCVAWSYHVAILVSYKNASGVTEKRIIDPSLFSSG
Ovomucoid                ECKETVPMNCSS---YANTTSEDGKVMVLCNRAFNPVCGTDGVT-YDNECLLCAHKVEQG
                        : . . :*.. *. * .. * . * . . : . . . : : : : . . . *
Protein-glutaminase      PVTDTAWRNACVNTSCG-SASVSSYANTAGNVYYRSPNSYLYDNNLINTNCVLTKFSL
Ovomucoid                ASVDKRHDGGCRKELAAVSVDCSEYKPKDCTAEDRPLCGS---DNKTYGNKCNFCNAVVE
                        . . * . . * : . . * .. * . * : . . * . . * ** : . . * : : :
Protein-glutaminase      SGCSPSPAPDVSSCGF
Ovomucoid                SNGTLTLS-HFGKC--
                        * . : : : . . . *
    
```

【図表 14】

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

```

Protein-glutaminase      -----LASVIPDVATLNSLFNQIKNQSCGTS-----TAS
Asp_f_9                  KRSFILRSADMYFKYTAALAAVLPLCSAQTWSKCNPLEKTCPPNKGLAASTYTADFTSA
                        **:*:* : : . : : : * . . . . * : :
Protein-glutaminase      SPCITFRYPVDGCYARAHKMRQILMNNG---YDCEKQFVYGN---LKASTGTCCVA--
Asp_f_9                  SALDQWEVTAGKVPVGPQGAFTVAKQGDAPTIDTDFYFFFGKAEVVMKAAPGTGVVSSI
                        * . . . . . . . : . : : * . * : * . : * : * : * : * : * :
Protein-glutaminase      -----WSYHVAILVSYKN
Asp_f_9                  VLESDDLDEVDWEVLGGDTTQVQTNVYFGKGD'TTYDRGTYVPVATPQETFHTYIDWTKD
                        : : * . : : * :
Protein-glutaminase      ASGVTEKRIIDPSLFSSGPVTDTAWRNACVNTSCGSASVSSYANTAGNVYYR-----
Asp_f_9                  AVTWSIDGAVVRTLTYNDAKGGTRFPQTPMRLRLGWSWAGGDPSPNPKGTIEWAGGLTDYSA
                        * : . : : * . . . * : : : . ** : . . : * . * : :
Protein-glutaminase      -----SPNSYLYDNN-----LINTNCVLTKFSLLSGCSPSPAPDVSS
Asp_f_9                  GPYTMVYKSVRIENANPAESYTYSDNSGSWQSIKFDGSDISSSSSVTSSTTSTASSASS
                        . * : * * * . * : * : : . : : . * : : : : * . * . . . * * . . . *
Protein-glutaminase      CGF
Asp_f_9                  TS-
    
```


【図表16】
プロテイングルタミナーゼの一日推定摂取量の算出①

①脱アミド化蛋白質素材が摂取される場合

	a	b	c	d	e
	2005年 蛋白質素材の年間輸入 量・生産量 ¹⁾ トン/年	蛋白質素材の国民1人あたり1日 の消費量 (a×1000,000/126,149,000 ²⁾ /365)	プロテイングルタミナーゼ 添加量 %	プロテイングルタミナーゼ 摂取量 (b×c/100×1,000) mg/人/日	プロテイングルタミナーゼ 一日推定摂取量 (d/50) mg/kg/日
カゼイン	7522	0.163	0.490 ³⁾	0.800	0.016
カゼイネート	10777	0.234	0.490 ³⁾	1.147	0.023
WPC(ラクトアルブミン)	8894	0.193	0.490 ³⁾	0.946	0.019
乳蛋白質濃縮物(TMC, MPC)	6582	0.143	0.490 ³⁾	0.700	0.014
乾燥卵白	10486	0.228	0.490 ³⁾	1.116	0.022
大豆たんぱく	43803	0.951	0.490 ³⁾	4.661	0.093
小麦たんぱく	20631	0.448	1.040 ⁴⁾	4.660	0.093
合計	108695	2.361		14.032	0.281

1) たん白・ペプチド素材の市場動向「食品と開発」VOL.41 No.7 (2006) その出展は、財務省貿易統計(<http://www.customs.go.jp/toukei/srch>)及び(財)日本植物蛋白食品協会・植物性たん白(食品)の生産、出荷統計(<http://www.protein.or.jp/pdf/seisan>)²⁾

2) 国民総人口: 総務省統計局 統計データ「平成18年11月1日現在推計人口」(<http://www.stat.go.jp/data/jinsui/200704/zuhyou/05k2-1.xls>)⁵⁶⁾

3) 公開特許公報 2001-218590⁵⁷⁾

4) Yong, Y.H., et al., *J Agric Food Chem.*, 54 pp.6034-6040 (2006)⁵¹⁾

[図表17]
プロテイングルタミンナーゼの一日推定摂取量の算出

②加工食品の製造工程で添加される場合

	a	b	c	d	e	f
	1日食品摂取量 ¹⁾ g/人/日	食品中の 蛋白質含量 ¹⁾ %	1日に摂取する 食品中の蛋白質含量 (a×b/100) g/人/日	プロテイングルタミンナーゼ ²⁾ 添加量 ²⁾ 対蛋白質%	プロテイングルタミンナーゼ ²⁾ 摂取量 (c×d/100×1,000) mg/人/日	プロテイングルタミンナーゼ ²⁾ 1日推定摂取量 (e/50) mg/kg体重/日
パン類(菓子パン除く)	33.5	9.25	3.10	0.09	2.790	0.056
うどん、中華麺類	35.7	3.36	1.20	0.09	1.080	0.022
即席中華麺	4.1	9.76	0.40	0.09	0.360	0.007
パスタ類	9.8	5.10	0.50	0.09	0.450	0.009
その他小麦加工類	5.1	7.84	0.40	0.09	0.360	0.007
豆腐	36.7	6.27	2.30	0.09	2.070	0.041
油揚げ類	7.3	15.07	1.10	0.09	0.990	0.020
その他の大豆加工品	7.1	4.23	0.30	0.09	0.270	0.005
魚介(練り製品)	9.3	11.83	1.10	0.09	0.990	0.020
魚肉ハム・ソーセージ	0.4	25.00	0.10	0.09	0.090	0.002
ハム・ソーセージ	11.4	14.91	1.70	0.09	1.530	0.031
チーズ	2.3	21.74	0.50	0.09	0.450	0.009
発酵乳・乳酸飲料	23.1	3.46	0.80	0.09	0.720	0.014
その他の乳製品	8.2	3.66	0.30	0.09	0.270	0.005
ケーキ・パストリー類	7.4	6.76	0.50	0.09	0.450	0.009
ビスケット類	1.8	5.56	0.10	0.09	0.090	0.002
ビール	61.1	0.33	0.20	0.09	0.180	0.004
茶	306.9	0.13	0.40	0.09	0.360	0.007
コーヒーマシココア	123.0	0.33	0.40	0.09	0.360	0.007
しょうゆ	16.6	8.43	1.40	0.09	1.260	0.025
マヨネーズ	3.3	3.03	0.10	0.09	0.090	0.002
味噌	11.7	11.97	1.40	0.09	1.260	0.025
その他調味料	56.8	2.11	1.20	0.09	1.080	0.022
合計	782.6	180.12	19.50		17.550	0.351

1)国民栄養の現状(平成16年厚生労働省国民健康・栄養調査報告)⁵⁸⁾

2)特許公報 特許第3609648号³²⁾

【図表 18】

プロテイングルタミナーゼの添加量

①脱アミド化蛋白質素材を製造する場合

蛋白質素材	プロテイングルタミナーゼ添加量 (%)
カゼイン ¹⁾	0.40
カゼイン ²⁾	0.49
乳清蛋白 ²⁾	0.49
α-ラクトアルブミン	0.38
小麦グルテン ¹⁾	0.40
小麦グルテン ²⁾	0.49
小麦グルテン ⁴⁾	1.04
大豆蛋白 ²⁾	0.49
卵白 ²⁾	0.49

②加工食品を製造する場合

加工食品	プロテイングルタミナーゼ添加量 (対蛋白質%)
天ぷら粉 ¹⁾	0.08
パン ¹⁾	0.01
調味液 ¹⁾	0.09
プリン様食品 ¹⁾	0.01

1) 特許公報 特許第3609648号³²⁾

2) 公開特許公報 2001-218590⁵⁷⁾

3) Gu, Y.S., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 49, pp5999-6006 (2001)³⁰⁾

4) Yong, Y.H., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 54 pp.6034-6040 (2006)³¹⁾

〔参考文献〕

- 1) 「新しい食品蛋白質の開発と実用化」(1985) 食品蛋白質応用開発研究会編、向文堂、〔1〕食品蛋白質の構造と物性 pp. 23-38.
- 2) 「たん白・ペプチド素材の市場動向」(2006) 食品と開発 VOL. 41, No. 7, pp. 36-44.
- 3) Riha III, W.E., Izzo, H.V., Zhang, J. & Ho, C.-T. (1996) Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 36, 225-255.
- 4) Hamada, J.S. (1994) Deamidation of food proteins to improve functionality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 283-292.
- 5) 「新・食品分析法」(1996) 日本食品科学工学会新・食品分析法編集委員会編、光琳、pp. 496-497.
- 6) Is HAP safe? *Ingredient*, October 1989, pp.67,69.
- 7) Schwenke, K.D. (1997) Enzyme and chemical modification of proteins in *Food Proteins and Their Applications* (Damodaran, S, and Paraf, A., eds) pp. 393-423, Marcel Dekker, New York.
- 8) Yamaguchi, S. & Yokoe, M. (2000) A novel protein-deamidating enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a newly isolated bacterium from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3337-3343.
- 9) Scheuplein, R.J, Mizutani, A., and Yamaguchi, S. (2007) Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: Protein-glutaminase. *Regulatory Toxicology and Pharmacology.* 49(2):79-89
- 10) Daussant, J.M., Neucere, N.J. & Conkerton, E.J. (1969) Immunochemical studies on *Arachis hypogaea* proteins with particular reference to the reserve proteins. II: Protein modification during germination. *Plant Physiol.* 44, 480-484.
- 11) Kumar, K.G., Vencataraman, L.V. & Appu Rao, A.G. (1980) Chickpea seed proteins: Conformational changes in 10.3S protein during germination. *J. Agric. Food Chem.* 28, 518-524.
- 12) Kumar, G.N., Houtz, R.L. & Knowles, N.R. (1999) Age-induced protein modifications and increased proteolysis in potato seed-tubes. *Plant Physiol.* 119, 89-99.
- 13) Vaintraub, I.A., Kotova, L.V. & Shaha, R. (1992) Protein deamidase from germinating wheat grains. *FEBS Lett.* 302, 169-171.
- 14) Vaintraub, I.A., Kotova, L.V. & Shaha, R. (1996) Protein deamidases from germinating seeds. *Physiol. Plantarum.* 96, 662-666.
- 15) Mycek, M.J. & Waelsch, H. (1960) The enzymatic deamidation of proteins. *J. Biol. Chem.* 235, 3513-3517.
- 16) 「産業用酵素」(1995) 上島孝之、丸善、3.2.6 食品機能の改良[トランスグルタミナーゼの利用] pp.40-42
- 17) Kikuchi, M., Hayashida, H., Nakano, E. & Sakaguchi K. (1971) Peptidoglutaminase.

- Enzymes for selective deamidation of γ -amido of peptide-bound glutamine. *Biochemistry* 10, 1222-1229.
- 18) Yamaguchi, S., Jeens D.J. & Archer, D.B. (2001) Protein-glutaminase from *Chryseobacterium proteolyticum*, an enzyme that deamidates glutaminy residues in proteins. Purification, characterization and gene cloning. *Eur. J. Biochem.*, 268, 1410-1421.
- 19) 天野エンザイム株式会社 社内報告書 AIS No.01-28480
- 20) Vandamme, P., Bernardet, J.-F., Segers, P., Kersters, K., Holmes, B. (1994) New perspectives in the identification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44, 827-831.
- 21) Kim, K.K., Kim, M.K., Lim, J.H., Park, H.Y., & Lee S.T. (2005) Transfer of *Chryseobacterium meningosepticum* and *Chryseobacterium miricola* to *Elizabethkingia* gen. nov. as *Elizabethkingia meningoseptica* comb nov. and *Elizabethkingia miricola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, May; 55(Pt 3), 1287-1293.
- 22) Jooste, P.J., & Hugo, C.J. (1999) The taxonomy, ecology and cultivation of bacterial genera belonging to the family Flavobacteriaceae. *J. Food Microbiol.* 53, 81-94.
- 23) Shimomura, K., Kaji, S., & Hiraishi, A. (2005) *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, Sept; 55(Pt 5), 1903-1906.
- 24) Pariza M.W., & Johnson E.A. (2001) Evaluation the safety of microbial enzyme preparations used in food processing: Update for a new century. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 33, 173-186.
- 25) Creata, K.C., Chua, K-L., Subramaniam, S., Frey, J., Loh, H., & Tan, H-M. (2002) Identification and characterization of CAMP cohemolysin as a potential virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *J. Bacteriol.*, 184, 1932-1939.
- 26) Fischer L.J., Weyant R.S., White E.H., Quinn F.D. (1995) Intracellular multiplication and toxic destruction of cultured macrophages by *Capnocytophaga canimorsus*. *Infect Immun.* Sep;63(9):3484-90.
- 27) Encyclopedia of food microbiology, Robinson (2000) R., Batt, A.C. & Patel P.D. eds., Academic Press. pp.820-826.
- 28) 松村泰生、具延淑、森友彦、山口庄太郎。(2002) 新規なタンパク質脱アミド酵素・プロテイングルタミナーゼの食品タンパク質に対する作用. *食品加工技術*, 第22巻第2号, 11-18.
- 29) 山口庄太郎 (2004) 食品酵素化学の最新技術と応用-フードプロテオミクスへの展望- pp141-153.
- 30) Gu Y.S., Matsumura Y, Yamaguchi S, & Mori T. (2001) Action of protein-glutaminase on

- α -lactalbumin in the native and molten globule states. *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 5999-6005.
- 31) Yong, Y.H., Yamaguchi, S., and Matsumura, Y. (2006) Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of wheat gluten. *J Agric Food Chem.*, **54**(16):6034-40.
- 32) 特許公報 特許第 3609648 号.
- 33) Yong Y.H., Yamaguchi S., & Matsumura Y. (2005) Modification of functional properties of wheat gliadin and glutenin by protein-glutaminase-catalyzed deamidation. (2005) Abstract, Institute of Food Technologist, Annual meeting 2005. http://ift.confex.com/ift/2005/techprogram/paper_28901.htm.
- 34) Yong Y.H., Yamaguchi S., Gu Y.S., Mori T, Matumura Y. (2004) Effects of enzymatic deamidation by protein-glutaminase on structure and functional properties of α -zein. *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 7094-7100.
- 35) US Patent 6756221.
- 36) Kato, A., Tanaka, A., Lee, Y., Matsudomi, N. & Kobayashi, K. (1987) Effects of deamidation with chymotrypsin at pH 10 on the functional properties of proteins. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 285-288.
- 37) Bollecker, S., Viroben, G., Popineau, Y. & Gueguen, J. (1990) Acid deamidation and enzymatic modification at pH 10 of wheat gliadin: Influence on their fuctional properties. *Sci. Aliments*, **10**, 343-356.
- 38) Shih, F. (1990) Deamidation during treatment of soy protein with protease. *J. Food Sci.* **55**, 127-132.
- 39) Motoki, M., Seguro, K., Nio, N. & Takinami, K. (1986) Glutamine-specific deamidation of α ₁-casein by transglutaminase. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3025-3030.
- 40) Larre, C., Kedzior, Z. M., Chenu. M.G., Viroben, G. & Gueguen, J. (1992) Action of transglutaminase on an 11 S seeds protein (pea legumin): influence of the substrate conformation. *J. Agric. Biol. Chem.* **40**, 1121-1126.
- 41) Larre, C., Chiarello, M., Blanloeli, J. Y., Chenu. M. & Gueguen, J. (1993) Gliadin modification catalyzed by guinea pig liver transglutaminase. *J. Food Biochem.* **17**, 267-282.
- 42) Gill, B.P., O'Shaughnessey, A.J., Henderson, P. & Headon, D.R. (1985) An assessment of the potential of peptidoglutaminases I and II in modifying the charge characteristics of casein and whey proteins. *Ir. J. Food Sci. Technol.* **9**, 33-41.
- 43) Hamada, J.S., Shih, F.F., Frank, A.W. & Marshall, W.E. (1988). Deamidation of soy peptides and proteins by *Bacillus circulans* peptidoglutaminase. *J. Food Sci.* **53**, 671-672.
- 44) Hamada, J.S. (1992) Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using

- peptidoglutaminase. *J. Agric. Food Chem.* 40, 719-723.
- 45) Riha III, W. E., H. V. Izzo, J. Zhang, & C.-T. Ho. (1996) Nonenzymatic deamidation of food proteins. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutr.* 36:225-255.
 - 46) 農林水産省農林水産技術会議事務局：動物性飼料並びに微生物飼料の安全性評価手法の開発, 研究成果 170, P. 70-77 (1985).
 - 47) Minoru Yoshida and Hajime Minato (1987) Assessment of the Pathogenicity of Bacteria Used in the Production of Single Cell Protein., *Agric. Biol. Chem.*, 51(1), 241-242.
 - 48) Thomas K, Aalbers M, Bannon GA, Bartels M, Dearman RJ, Esdaile DJ, Fu TJ, Glatt CM, Hadfield N, Hatzos C, Hefle SL, Heylings JR, Goodman RE, Henry B, Herouet C, Holsapple M, Ladics GS, Landry TD, MacIntosh SC, Rice EA, Privalle LS, Steiner HY, Teshima R, Van Ree R, Woolhiser M, & Zawodny J. (2004) A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 39, 87-98.
 - 49) Walker R, & Lupien J.R (2000) The safety evaluation of monosodium glutamate. *J. Nutr.* 130, 1049S-52S.
 - 50) 石坂 照子 即時型アレルギーの発症機序 -肥満細胞, 好塩基球からのヒスタミン遊離の機構-(1982) 免疫学 4 (中山書店 山村雄一監修) pp119-129.
 - 51) Metcalfe DD et.al.(1996) Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 36(Supp):S165-S186.
 - 52) Allergenicity of genetically modified foods, a joint FAO/WHO consultation on foods derived from biotechnology, Rome, Italy, 22-25 January (2001)
http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf
 - 53) Hileman RE, Silvanovich A, Goodman RE, Rice EA, Holleschak G, Astwood JD, Hefle SL. (2002) Bioinformatic methods for allergenicity assessment using a comprehensive allergen database. *Int Arch Allergy Immunol.* Aug; 128(4):280-291.
 - 54) Kolaskar AS and Kulkarni Kale U. (1999) Prediction of three-dimensional structure and mapping of conformational epitopes of envelope glycoprotein of Japanese Encephalitis Virus. *Virology*, 261:31-42.
 - 55) Peter J. Wilde (1995) Foam Measurement by the Microconductivity Technique: An Assessment of Its Sensitivity to Interfacial and Environmental Factors. *J. Colloid and Interface Sci.*, 178, 733-739.
 - 56) 国民総人口: 総務省統計局 統計データ「平成 18 年 11 月 1 日現在推計人口」
 - 57) 公開特許公報 特開 2001-218590
 - 58) 国民栄養の現状 (平成 16 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告), 10-15, 52-53, 64-65, 72-83, 146-147, 162-163, 238-241, 274-277

- 59) 食品安全委員会, 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準, 平成16年3月25日, 食品安全委員会決定
http://www.fsc.go.jp/senmon/idensi/gm_tenkabutukijun.pdf
- 60) U. S. Pharmacopeia 28 National Formulary 23 (2005), 2858
- 61) Behrendt, U., Ulrich, A., & Schumann, P. (2008) *Chryseobacterium gregarium* sp. nov., isolated from decaying plant material. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008 May;58(Pt 5):1069-1074
- 62) Vaneechoutte, M., Kämpfer, P., De Baere, T., Avesani, V., Janssens, M., & Wauters, G. (2007) *Chryseobacterium hominis* sp. nov., to accommodate clinical isolates biochemically similar to CDC groups II-h and II-c. *Int J Syst Evol Microbiol.* Nov;57(Pt 11):2623-2628.
- 63) 池澤善郎, 大砂博之 (2002) Latex-Fruits Syndrome, アレルギー, 51(8), 591-604.
- 64) Salcedo, G., Daiz-Perales, A., & Sanchez-Monge, R. (2001) The role of plant panallergens in sensitization to natural rubber latex. *Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 1:117-183.
- 65) Diaz-Perales A, Collada C, Blanco C, Sanchez-Monge R, Carrillo T, Aragoncillo C, & Salcedo G. (1998) Class I chitinases with hevein-like domain, but not class II enzymes, are relevant chestnut and avocado allergens. *J Allergy Clin Immunol.* Jul;102(1):127-133.
- 66) Karisola P, Kotovuori A, Poikonen S, Niskanen E, Kalkkinen N, Turjanmaa K, Palosuo T, Reunala T, Alenius H, & Kulomaa MS. (2005) Isolated hevein-like domains, but not 31-kd endochitinases, are responsible for IgE-mediated in vitro and in vivo reactions in latex-fruit syndrome. *J Allergy Clin Immunol.* Mar;115(3):598-605.
- 67) Cooke SK, & Sampson HA. (1997) Allergenic properties of ovomucoid in man. *J Immunol.* Aug 15;159(4):2026-2032.
- 68) Besler, M., Peterson, A., Steinhart, H., & Paschke, A. (1999) Identification of IgE-Binding Peptides Derived from Chemical and Enzymatic Cleavage of Ovomucoid (Gal d 1). *Internet Symposium on Food Allergens* 1(1):1-12.
- 69) Mine Y, & Zhang J. W.. (2002) Identification and fine mapping of IgG and IgE epitopes in ovomucoid. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 12;292(4):1070-1074.
- 70) Banerjee, B., Kurup, V. P., Greenberger, P. A., Johnson, B. D., & Fink, J. N. (2001) Cloning and expression of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 16 mediating both humoral and cell-mediated immunity in allergic bronchopulmonary aspergillosis (ABPA). *Clinical Experimental Allergy*, 31, 761-770.