

遺伝子組換え食品等評価書

Streptomyces violaceoruber (pNAG) 株を利用して
生産されたキチナーゼ

2008年8月

食品安全委員会

<審議の経緯>

2008年1月29日	厚生労働大臣より遺伝子組換え食品等の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省食安発第0129001号）、関係書類の接受
2008年1月31日	第224回食品安全委員会（要請事項説明）
2008年2月18日	第58回遺伝子組換え食品等専門調査会
2008年6月20日	第63回遺伝子組換え食品等専門調査会
2008年7月3日	第245回食品安全委員会（報告）
2008年7月3日より2008年8月1日	国民からの御意見・情報の募集
2008年8月5日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長より食品安全委員会委員長へ報告
2008年8月7日	第250回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）
小泉直子（委員長代理）
長尾 拓
野村一正
畑江敬子
廣瀬雅雄
本間清一

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	丹生谷博
石見佳子	飯 哲夫
宇理須厚雄	山川 隆
小関良宏	山崎 壮
橘田和美	和久井信
澁谷直人	渡邊雄一郎
手島玲子	

要 約

食品安全委員会は、食品添加物「*Streptomyces violaceoruber* (pNAG) 株を利用して生産されたキチナーゼ」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を行った。

本添加物は、その品質を高めるため、*Streptomyces violaceoruber* 1326 株を宿主として、*Streptomyces avermitilis* ATCC31267 株由来のキチナーゼ構造遺伝子 (*nag* 遺伝子) に *Streptomyces cinnamoneus* IFO12852 株由来のホスホリパーゼ D 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を結合した遺伝子をプロトプラスト法で形質転換して作製された *S. violaceoruber* (pNAG) 株により生産されたキチナーゼである。

本添加物の評価では、*S. avermitilis*、*S. cinnamoneus* 及び *S. violaceoruber* との間において、自然に遺伝子交換がなされていると考えられることから、*S. violaceoruber* (pNAG) 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在すると考えられた。

以上の結果から、「*Streptomyces violaceoruber* (pNAG) 株を利用して生産されたキチナーゼ」については、「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) の第 1 章総則第 3 対象となる添加物及び目的のうち、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではないと判断される。

I. 評価対象遺伝子組換え添加物の概要

添加物 : *Streptomyces violaceoruber* (pNAG) 株を利用して生産された
キチナーゼ
用途 : キチン又はキチンオリゴ糖の加水分解酵素
申請者 : 長瀬産業株式会社
開発者 : 長瀬産業株式会社

本添加物は、その品質を高めるため、*S. violaceoruber* 1326 株を宿主として、*S. avermitilis* ATCC31267 株由来のキチナーゼ構造遺伝子 (*nag* 遺伝子) に *S. cinnamoneus* IFO12852 株由来のホスホリパーゼ D 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を結合した遺伝子を導入して作製された *S. violaceoruber* (pNAG) 株により生産されたキチナーゼである。

キチナーゼは、カニ殻やエビ殻から調製されたキチン又はキチンオリゴ糖の加水分解に使用されている既存添加物である。

宿主である *S. violaceoruber* 及び挿入遺伝子の供与体である *S. avermitilis* 及び *S. cinnamoneus* は、植物、動物に対する病原性、毒性は知られておらず、国立感染症研究所病原体等安全管理規定において、バイオセーフティレベル 1 に相当する (参照 1, 2, 3)。また、*S. violaceoruber* による有害生理活性物質の生産は知られておらず、抗菌活性物質を生産しないことも確認されている (参照 4, 5)。

宿主、供与体が属する *Streptomyces* 属を基原とする食品添加物については、既に豊富な食経験又は使用経験がある (参照 6)。

II. 食品健康影響評価

1. 生産株 *S. violaceoruber* (pNAG) 株の構築について

宿主は、*S. violaceoruber* 1326 株である。

挿入 DNA は、*S. avermitilis* ATCC31267 株由来のキチナーゼ構造遺伝子 (*nag* 遺伝子) に *S. cinnamoneus* IFO12852 株由来のホスホリパーゼ D 遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を結合したものである。

発現プラスミド pNAG は、*S. violaceoruber* ATCC35287 由来のプラスミド pIJ702 (参照 7) を基に作成されたものであり、塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

上記で得られた発現プラスミド pNAG を用いて宿主 *S. violaceoruber* 1326 株をプロトプラスト法で形質転換し、生産株 *S. violaceoruber* (pNAG) 株を得た (参照 8, 9, 10)。

2. 評価対象添加物に該当するか否かについて

- (1) 一般的に、16S rRNA が高い相同性を持つ微生物は分類学上近縁であるとされており、*S. cinnamoneus* IFO12852 株、*S. violaceoruber* 1326 株及び *S. avermitilis* ATCC31267 株の 16S rRNA の塩基配列は高い相同性（96%以上）を示している（参照 11）。
- (2) *Streptomyces* 属の多くの菌株には、接合性プラスミドが存在し、菌と菌の接合により遺伝子交換を行うことが報告されている。このプロセスでは、菌と菌が接触した結果として、大きな染色体断片が取り込まれることが示されている（参照 12）。
- (3) 寒天培地及び土壌環境中において、*S. violaceoruber*（旧名 *S. lividans*）由来の接合プラスミド pIJ101 及びその派生プラスミド pIJ211 は、*Streptomyces* 属間で転移することが示されている。このような転移は、通常、自然に起こることが報告されている（参照 13）。
- (4) 土壌中の *S. violaceolatus* と *S. violaceoruber*（旧名 *S. lividans*）の生活環を調査し、特定の段階でプラスミドの転移、ファージの感染及び細胞の接合が生じていることが確認されている（参照 14）。
- (5) 滅菌土壌において、水銀耐性遺伝子をエンコードする *Streptomyces* 由来巨大線型プラスミドが、プラスミドを含有しない水銀感受性菌である *S. violaceoruber*（旧名 *S. lividans*）に転移することが確認されている（参照 15）。
- (6) 土壌より分離された *Streptomyces* 属の 99 株（*S. cinnamoneus* 及び *S. violaceoruber* の系統を含む。）について、これらの 16S rRNA 情報を元に得られた系統樹を比較したところ、芳香ポリケチド生合成に関わる遺伝子が分類学上近縁でない *Streptomyces* 属に存在することが示されている。また、*S. cinnamoneus*、*S. violaceoruber* 及び *S. avermitilis* は、菌糸の色素に関する同等の遺伝子を持っていることが示されている（参照 16）。
- (7) ストレプトマイシン生合成に関わる遺伝子を持つと思われる 2 種類の菌株を土壌より分離したところ、そのうちの 1 つの菌株は、ストレプトマイシン生合成に関わる遺伝子クラスターを構成する全遺伝子を持ち、もう一つの菌株は同じクラスターを構成する遺伝子の一部分を持っていたが、これら 2 種の菌株は分類学上近縁でないことが示されている（参照 17）。

(1)～(7)に示される科学的知見から、*S. cinnamoneus*、*S. violaceoruber*及び

*S. avermitilis*の間では、自然に遺伝子交換がなされていると考えられ、*S. violaceoruber* (pNAG) 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在しうると考えることは妥当である。

以上の結果から、「*Streptomyces violaceoruber* (pNAG) 株を利用して生産されたキチナーゼ」については、「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）の第 1 章総則第 3 対象となる添加物及び目的のうち、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではないと判断される。

<参照>

1. 国立感染症研究所病原体等安全管理規定（平成 19 年 6 月）；国立感染症研究所
2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition Group 25. 667-669
3. The Prokaryotes Second Edition Chapter 41. 934-941
4. 抗菌活性分析（長瀬産業株式会社資料）
5. Specification for identity and purity of certain food additive, APPENDIX A TO ANNEX 1: Determination of Antibiotic Activity.
6. 食品添加物総覧 2004；既存添加物名簿収載品目リスト
7. Katz E, Thompson CJ, Hopwood DA. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. J Gen Microbiol. 1983 Sep;129(9):2703-14.
8. 発現プラスミド pNAG の構築（長瀬産業株式会社資料）
9. 発現プラスミド pNAG の確認（長瀬産業株式会社資料）
10. 挿入遺伝子の遺伝子配列比較（長瀬産業株式会社資料）
11. 16S rRNA の塩基配列の相同性比較（長瀬産業株式会社資料）
12. K.F. Chater, D.A. Hopwood, T. Kieser, and C.J : Thompson. Gene Cloning in Strptomyces. Current Topics in Microbiology and Immunology 1982； 96: 69-93
13. Fatemeh Rafii, and Don L : Crawford. Transfer of Conjugative Plasmids and Mobilization of a Nonconjugative Plasmid between *Streptomyces* Strains on Agar and in Soil. Appl. Environment. Microbiol. 1988； 54: 1334-1340
14. Elizabeth M.H. Wellington, Neil Cresswell, and Paul R. Herron : Gene Transfer between Streptomyces in Soil. Gene 1992； 115: 193-198
15. Jacques Ravel, Elizabeth M.H. Wellington, and Russell T. Hill : Interspecific Transfer of *Streptomyces* Giant Linear Plasmids in Sterile Amended Soil Microcosms. Appl. Environment. Microbiol. 2000.； 66: 529-534
16. Mikko Metsä-Ketelä, Laura Halo, Eveliina Munukka, Juha Hakala, Pekka Mäntsälä, and Kristiina Ylihpnko : Molecular Evolution of Aromatic Polyketides and Comparative Sequence Analysis of Polyketide Ketosynthase and 16S Ribosomal

- DNA Genes from Various *Streptomyces* Species. Appl. Environment. Microbiol. 2002 ; 68: 4472-4479
17. S. Egan, P. Wiener, D. Kallifidas, and E.M.H Wellington : Phytogeny of *Streptomyces* Species and Evidence for Horizontal Transfer of Entire and Partial Antibiotic Gene Clusters. Antonie van Leeuwenhoek 2001 ; 79: 127-133