

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

第98回会合議事録

1. 日時 平成23年11月25日（金） 13：59～15：57

2. 場所 食品安全委員会中会議室

3. 議事

(1) 食品健康影響評価について意見を求められた遺伝子組換え食品等の安全性評価について

- ・BR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された4- α -グルカノトランスフェラーゼ
- ・イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズBPS-CV127-9 (食品・飼料)

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

澤田座長、五十君専門委員、鎌田専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、手島専門委員、中島専門委員、飯専門委員、和久井専門委員

(食品安全委員会委員)

小泉委員長、熊谷委員、長尾委員、廣瀬委員

(事務局)

栗本事務局長、中島事務局次長、坂本評価課長、北村課長補佐、三木係員、種池技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①BR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された4- α -グルカノトランスフェラーゼ
- ②イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズBPS-CV127-9 (食品)
- ③イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズBPS-CV127-9 (飼料)

参考資料1 遺伝子組換え食品等評価書 (案)

BR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ

参考資料2 食品影響評価に係る指摘事項

イミダゾリノン系除草剤耐性ダイズBPS-CV127-9

6. 議事内容

○澤田座長 それでは、ちょっと早目ですけれども、皆様、お揃いですので、ただいまから第98回遺伝子組換え食品等専門調査会を開催いたします。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づきまして非公開で行います。

本日は所用により、宇理須専門委員、澁谷専門委員は御欠席とのことです。

本日の議題であります、新規の品目でありますBR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された4- α -グルカノトランスフェラーゼ、それから、継続の品目でありますイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズBPS-CV127-9の、これは食品と飼料の両方がありますけれども、安全性についての審議となります。

それでは、お手元の資料の確認をいたしたいと思います。事務局からよろしくお願ひします。

○北村課長補佐 それでは、議事次第に基づきまして配布資料の確認をさせていただきます。配布資料は、議事次第、座席表、専門委員名簿、資料としまして、食品健康影響評価に関する資料、参考資料1としまして、遺伝子組換え食品等評価書(案)です。参考資料2といたしまして、安全性評価にかかわる指摘事項となっております。参考資料1の方は現在、パブコメ中の案件でございます、本日、御審議いただきます4- α -グルカノトランスフェラーゼの審議の際の参考にしていただければと思います。なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルに綴じまして委員の皆様の机の上に置かせていただいております。本ファイルにつきましては調査会終了後、回収させていただきます、次回、また配布いたします。不足等ございましたら事務局までお願いいたします。

○澤田座長 それでは、議題1の審議に入らせていただきたいと思います。

まず、4- α -グルカノトランスフェラーゼの審議を行いたいと思います。事務局の方から御説明をお願いします。

○三木係員 それでは、御説明させていただきます。

まず、お手元に黄色いプラスチックのファイルを御用意くださいますようお願いいたします。こちらの申請品目名は、BR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された4- α -グルカノトランスフェラーゼとなっております。

まず、1ページ目には本品目の概要が書かれておまして、2ページから御説明させていただきます。

第1、安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違に関する事項といたしまして、1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料となっております。(1) 名称、基原及び有効成分につきましては、以下の記載のとおりとなっております。また、本品目のIUB分類、CAS番号、反応特異性についても以下の記載のとおりとなっております。

(2) 従来の4- α -グルカノトランスフェラーゼの製造工程は、下の図1に示されたと

おりとなっております。

3 ページ目にまいりまして、(3) 用途及び使用形態となりますけれども、従来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼは、トウモロコシデンプン等のデンプンから高分子糖質を工業的に製造する工程で使用されます。その下の図 2 に示されますように、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、同時に生じた末端を非還元末端に連結して、新たな α -1,4-D-グルコシド結合を合成する反応を触媒するということです。製造されました高分子糖質は、加熱による酵素失活、ろ過等の精製工程を経まして食品原料として用いられるということです。

その下にまいりまして、(4) 摂取量につきましては、デンプン加工に利用され、最終製品は種々の精製工程を経て製造されるために、酵素剤の残存は考えられないということです。実際、最終製品である高分子糖質に残存するタンパク質をケルダール法により測定したところ、検出限界以下であったということでした。この結果から、4- α -グルカノトランスフェラーゼを摂取する可能性は低いと考えられると記載されております。

4 ページにまいりまして、2.の宿主及び導入 DNA に関する事項でございますけれども、(1) 宿主につきましては、宿主菌株は *Bacillus subtilis* BR151 株であり、*Bacillus subtilis* 168 株の変異株ということになっております。

(2) DNA の供与体でございますけれども、DNA の供与体といたしましては *T. thermophilus* ATCC33923 株となりまして、こちらはグラム陰性の高度好熱性細菌ということです。また、*T. thermophilus* が、有害生理活性物質を生産するという報告はないということになっております。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法でございますけれども、挿入 DNA は *T. thermophilus* 由来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子及び化学的に合成されたりリボソーム結合サイト (SD 配列) を持っているということです。SD 配列は *Bacillus subtilis* のリボソーム RNA の配列をもとに、化学的に合成されたものということです。挿入 DNA をベクターに導入することにより、発現プラスミド pUMQ1 を作製し、この発現プラスミドを宿主である *Bacillus subtilis* BR151 に導入することによって、生産株を得たということになっております。

その下の 3. の宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関する事項でございますけれども、*Bacillus subtilis* は自然界に広く分布している微生物であり、長期にわたり食品製造工程に安全に使用されてきたということです。

4. の宿主の構成成分等に関する資料といたしまして、*Bacillus subtilis* が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、また、*Bacillus subtilis* 168 株系統株は、OECD の GILSP 微生物基準を満たしているということになっております。

その下の 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料といたしまして、(1) 製品名は TaqAM、有効成分は *T. thermophilus* 由来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼということになっております。また、IUB 分類、CAS 番号、反応特異性につま

しては、次のページに記載されております。

(2) 製造方法につきましては、下の部分にいていただきまして、TaqAM の製造工程は図 3 に示されたとおりでございまして、従来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼの製造工程と基本的には同様であります、相違点といたしましては、①菌体破碎の方法●●●、②加熱工程を加えたことという 2 点でございます。上の方に戻ってしまいますけれども、この生産菌は溶菌及び加熱処理において死滅し、その後のろ過工程で除去されるということです。

その下の (3) にまいりまして、用途及び使用形態につきましては従来のものと同じであるとなっております。

6 ページの (4) 、有効成分の性質及び従来の添加物との比較でございますけれども、TaqAM 中の有効成分は従来のものと同じであり、同じ反応を触媒するという事になっております。

6. の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けれども、(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物につきましては、TaqAM 中の有効成分 4- α -グルカノトランスフェラーゼのアミノ酸配列は、従来のものと同じであるということ、また、TaqAM は従来の添加物と比べ、反応至適温度、反応至適 pH において同様の性質を有しているということです。(2) 組換え体と宿主につきましては、本組換え体は 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミドの導入によって、4- α -グルカノトランスフェラーゼの産生性を新たに獲得している点、また、カナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子を保持していることによりそれぞれの抗生物質に対する耐性を持つ点が宿主と相違するということです。

7 ページにまいりまして、第 2、宿主に関する事項といたしまして、1. の分類学的な位置づけにつきましては以下の記載のとおりです。

また、2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項でございますけれども、*Bacillus subtilis* は自然界に広く分布している微生物であり、長期にわたり食品製造工程に安全に使用された歴史を持つということになっております。また、*Bacillus subtilis* 168 株系統につきましても、多くの食品用酵素製造に利用されており、有害生理活性物質の生産に関する報告はないということです。また、*Bacillus subtilis* は研究開発等での第二種使用規定に係る省令、文部科学省・環境省令のものでございますけれども、そこではクラス 1、人を含む動物に対する病原性がない細菌として分類されているということです。また、米国国立衛生研究所 (NIH) のガイドラインにおいてはリスクグループ 1、すなわち、健康な成人にとって非病原性の微生物として分類されております。

その下の 3. 寄生性及び定着性に関する事項といたしまして、定着の可能性はあるものの、安全上の懸念があることはないとなっております。

4. の病原性の外来因子に汚染されていないことに関しましては、性質の変化を示唆す

るような事実は認められておらず、また、病原性の外来因子の存在を示唆するような事実も認められていないということになっております。

5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項といたしまして、8 ページにまいりまして、*Bacillus subtilis* の毒性物質の生産が知られている *Bacillus cereus* や *Bacillus anthracis* とは明確に区別されており、宿主の *Bacillus subtilis* 151 株及びその近縁株には病原性はなく、有害生理活性物質も産生しないと考えられるということになっております。

第 3、ベクターに関する事項といたしまして、1. 名称及び由来に関する事項といたしましては、発現プラスミド pUMQ1 を構築するために用いられたプラスミドは pUB110 であり、*Staphylococcus aureus* に由来するという事です。

2. 性質に関する事項といたしまして、(1) DNA の塩基数は 4,548 bp であり、その配列は明らかになっているということでございます。

(2) 制限酵素による切断地図に関しましても、明らかになっているということです。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項といたしまして、pUB110 は詳細にわたって研究されており、カナマイシン耐性遺伝子、プラスミド複製にかかわる配列、ブレオマイシン耐性遺伝子及びヘルパープラスミドによる他の *Bacillus* 属細菌への移動に関与する配列を含んでいるが、既知の有害塩基配列を含むという報告はないということが書かれております。

(4) 薬剤耐性に関する事項といたしましては、カナマイシン及びブレオマイシン系抗生物質耐性の形質を与える遺伝子を含むということです。

(5) 伝達性に関する事項といたしまして、前述のとおり、ヘルパープラスミド存在下での *Bacillus* 属細菌間の移動という非常に特殊なケースを除いて、基本的には伝達性はないと考えられているということです。

9 ページにまいりまして、(6) 宿主依存性に関する事項でございますけれども、プラスミドの複製開始配列は、*Staphylococcus* 属細菌、*Bacillus* 属細菌内で機能することが知られておりまして、それ以外の菌で機能することは知られておらず、宿主依存性は高いと考えられるということです。

第 4、挿入 DNA、遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項といたしまして、1、挿入 DNA の供与体に関する事項といたしまして、(1) 名称、由来及び分類につきましては、DNA 供与体は *T. thermophilus* ATCC33923 株であり、その分類学的な位置づけは記載のとおりとなっております。

(2) 安全性に関する事項といたしまして、この株につきましては、好熱性、好気性のグラム陰性細菌でありまして、成育最適温度は 70~75℃、最低成育温度は約 40℃とされており、このことから、本菌株がヒト等への寄生性あるいは感染性を有するとは考えにくいということです。また、*T. thermophilus* は第二種使用等の省令において病原性がない細菌、すなわちクラス 1 に分類されているということです。以上のことから *T.*

thermophilus の安全性は高いと考えられるとなっております。

その下の 2、挿入 DNA または遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項の (1) 挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項といたしましては、挿入 DNA の設計は次のページの表 1 のとおりとなっております、その全塩基配列の決定により、設計どおりであることが確認されております。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項といたしましては、挿入遺伝子の塩基配列、塩基数及び制限酵素切断地図は、それぞれ明らかになっております。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項といたしまして、遺伝子産物である *T. thermophilus* 由来 4- α -グルカノトランスフェラーゼは従来のもと同様、アミロースやアミロペクチンなどを基質とし、その α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、生じた末端を別の非還元末端の 4 位水酸基に転移する転移酵素でございます。アミノ酸配列に変更はなく、反応至適温度、反応至適 pH とともに従来のもとの差は認められないということになっております。また、この酵素に関しまして既知のタンパク質との相同性をデータベース検索した結果、既知の毒性タンパク質の相同性は見つからなかったということです。さらに、既知のアレルゲンとの構造相同性を検索した結果、35%以上のアミノ酸が一致する配列は見つからず、連続する 8 個のアミノ酸配列が一致する箇所も見つからなかったということです。以上のことから、安全上の問題はないと考えられるとなっております。

11 ページにまいりまして、3、挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項、(1) プロモーターにつきましては、新たなプロモーターは導入していないということございまして、用いた pUB110 の配列中にプロモーターとして機能し得る配列が存在していることから、この配列がプロモーターとして機能しているとされるということございまして。

また、(2) のターミネーターにつきましても新たな配列は導入しておらず、pUB110 に本来存在するパリンドロームを形成し得る配列がターミネーターとして機能していると考えられるということです。

(3) その他の配列につきまして、4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子の開始コードの直前に SD 配列を導入しているということです。

4、ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項といたしましては、挿入 DNA は 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子及びその上流の SD 配列とともに、1,551 塩基対の DNA 断片として構築されました。この DNA 断片及び pUB110 をそれぞれ制限酵素処理した後で混合し、リガーゼにより連結し、発現プラスミドを構築したということになっております。

5、構築された発現ベクターに関する事項といたしまして、(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項といたしまして、発現プラスミドの塩基数は明らかになっておりまして、その構成要素、位置、サイズ及び機能につきましては、12~13

ページの表 2 に示されたとおりとなっております。また、制限酵素による切断地図につきましても明らかになっております。

13 ページにまいりまして、(2) 目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームに関する事項でございますけれども、pUMQ1 の持つオープンリーディングフレームについて検索した結果、87 個の ORF が見つかったということでございます。さらに、これらの既知のタンパク質との相同性についてデータベースを用いて、E-value の閾値を 0.1 として検索したところ、pUB110 に本来存在するものと *T. thermophilus* 由来 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子に相当する ORF のみに相同性が示されたということになっております。

さらに、この 87 個の ORF につきまして、既知のアレルゲンとの構造相同性をデータベースを用いて検索した結果、連続する 8 アミノ酸配列につきましては既知のアレルゲンと一致するものはなく、また、80 残基以上のアミノ酸を有する ORF について検索した結果、ヨモギ属の多年草由来のアレルゲンと相同性を示す ORF が見つかったということです。この ORF は、*T. thermophilus* 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子の相補鎖の一部に相当しまして、遺伝子供与体である *T. thermophilus* ATCC33923 株の染色体に存在しているものであるということです。また、その開始コドンの上流には、*Bacillus subtilis* において機能し得る SD 配列は存在しないことから、組換え体において本タンパク質が翻訳される可能性は極めて低いと考えられるということです。

(3) につきまして、意図する遺伝子の発現プラスミド上での位置は明らかになっております。

(4) につきまして、発現プラスミドは目的以外の遺伝子が混入しないように構築され、宿主に導入されております。

6、DNA の宿主への導入方法に関する事項といたしまして、こちらにつきましては第 4 の 4 に示されたとおりとなっております、導入の有無につきましてはカナマイシン含有寒天培地上で選択し、確認したということです。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項といたしまして、(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項としましては、pUB110 上にはカナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子が存在します。カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ（以下、KAN）につきましては、カナマイシンのアミノ糖残基の水酸基にヌクレオチドを付加することにより、抗生物質を不活化するとなっております。

15 ページにまいりまして、一方、ブレオマイシン耐性遺伝子によりコードされるタンパク質 (BRP) は、ブレオマイシン・フレオマイシンに結合し、その DNA 鎖切断作用を阻害するということです。pUB110 は食品用酵素製造に長期間、安全に使用されてきた歴史がございます、また、抗生物質耐性遺伝子を保持したまま使用されているが、安全上の懸念はないとされているということです。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項といたしまして、TaqAM から発現プラスミド由来の DNA 断片及び生産菌が含まれていないことが確認されたということです。また、KAN 及び BRP につきましては、TaqAM 製造工程中の加熱処理工程で失活除去される可能性が高いと考えられ、仮に残存したとしても精製工程において除去され、最終製品に残存する可能性はほとんどないと考えられるということです。

第 5、組換え体に関する事項といたしまして、1、宿主との差異に関する事項といたしましては、*T. thermophilus* 由来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼの産生性を新たに獲得している点、また、カナマイシン耐性及びブレオマイシン耐性を獲得している点ということでございます。なお、これらの形質の違いは宿主の非病原性、非毒素生産性に影響はしないということです。

2、遺伝子導入に関する事項といたしまして、(1) 制限酵素による切断地図に関する事項としましては、本組換え体内におきまして発現プラスミドの構造は変化しておらず、制限酵素切断地図は前述のとおりということです。

また、(2) オープンリーディングフレームに関する事項でございます、16 ページでございますけれども、こちらにつきましても前述のとおりということです。

第 6、組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項でございますけれども、1、添加物の製造原料または製造器材としての使用実績につきましては、原料につきましては食品または食品添加物製造用として一般的に広く用いられているもののみを使用しているということ、また、器材につきましても従来から食品用酵素剤の製造に使用されているものということです。

2、添加物の製造原料または製造器材としての安全性につきましては、原料及び器材につきまして食品用の酵素剤製造に一般的に使用されているものであり、使用前には十分な殺菌及び洗浄を行っているということです。

第 7、遺伝子組換え添加物に関する事項といたしまして、諸外国における許可等につきましては、米国において GRAS 物質として 2010 年に認められているということです。

2、組換え体の残存に関する事項といたしましては、生産菌の混入がないことが確認されております。さらにサザンハイブリダイゼーション法による分析の結果、発現プラスミドに由来する DNA 断片は検出されなかったということです。

3、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項といたしまして、宿主及びその系統株は多くの食品用酵素製造に使用されており、有害な物質を生産するという報告はないということです。また、TaqAM は JECFA の食品用酵素剤に関する一般規格を満たしていることから、安全性についての懸念はないということです。

4、精製方法及びその効果に関する事項といたしまして、17 ページにまいりまして、各工程とその効果は明らかになっているということでございます。

5、含有量の変動により有害性を示唆する常成分につきましては、想定はされないということです。

第 8 ですけれども、第 2 から第 7 までの事項において安全性の知見は得られており、本酵素剤の毒性試験は必要ないと申請者は判断したということになっております。

以上でございます。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、項目ごとに先生方からの御意見をいただきたいと思います。

まず、第 1、第 2、第 3 で、申請書の 2 ページから 9 ページまでにわたりまして、御意見、コメントがありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 2 ページ目とそれから 5 ページ目に精製工程が書かれていて、間違っているわけではないのですが、後で出てくると思うのですが、生産のときにカナマイシンとかの抗生物質を使っているかどうか、どこにも書いていないので、後で書いてもらう必要があると思うのですが、それが除去されているかどうかというのが実はちゃんと書いてなくて、例えば精密ろ過というのは何のことかわからないというところなのですが、後ろの方の添付資料を見てみると、●●●と思うのだけれども、そういう表現になっていないので、単に精密ろ過というよりは、ちゃんと書いていただいた方がいいのかなというふうに思います。

○澤田座長 この精密ろ過というのは普通は●●●によるものですね。

○鎌田専門委員 そうですね。ただ、一応、彼らの言い分からすると、●●●というので、この形で使っているというふうには書かれているようです。

○澤田座長 それをちょっと確認していただくのと、あと、抗生物質を培養中に入れているか。多分、入っていない。

○鎌田専門委員 多分、入っていないと思うのですが、入っていないのだと入っていないと書かないといけないと思うのですが。

○澤田座長 五十君先生。

○五十君専門委員 8 ページの 2、性質に関する事項の (3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項の中で、プラスミドの伝達性に関わる記載がありまして、その中でヘルパープラスミドによる移動ということに触れられているのですけれども、遺伝子組換えでは遺伝子が動くということに関して推薦しておりません。ヘルパープラスミドと書いたからには、このプラスミドがいるかないか記載していただいて、そのおそれがないことを示していただきたいと思います。

○澤田座長 ORF β 自身は不完全、ちょっと断片化されているわけですね。

○五十君専門委員 単独では動かないということがわかるので、ヘルパープラスミドが全く含まれていないということを示していただきたい。

○澤田座長 それでは、安全性に関してもうちょっと説明を追記していただきます。

9 ページまでで他によろしいでしょうか。

○飯専門委員 6 ページの恐らく真ん中辺、6 の (1) の記載になるかと思うのですけれども、最初の 1 ページの「はじめに」というところを見ますと、その第 2 段落なのです

が、TaqAM の反応特異性、基質特異性及び安定性は従来のもので同等ですと書いてあるのですが、6 ページの方には至適温度と pH のことは一応書かれているのですが、「はじめに」に書かれてある内容が見つからないので、整合性をとる形で資料を提出するなり、文章を修正するなりしていただきたいと思います。

○澤田座長 これはとにかく整合性をとっていただければ。

○飯専門委員 「はじめに」に書いてある以上、何もないというのはまずいかなど。従来品と同じであるということが伝わるような提出の仕方ということを考えてつくって、その辺は修正していただけたらと思います。

○澤田座長 他によろしいでしょうか。

それでは、次の第 4 で 9 ページから 15 ページにかけて、御意見がありましたらお願いしたいと思います。

○鎌田専門委員 13 ページから 14 ページにかけて、意味はないと思うのですが、既知アレルゲンとの構造相同性を調べて一つだけ見つかったと。Art v 1 だったかなというのと、一定以上の相同性があったということだけが書かれていて、その後、何も書いていないというのは本当はおかしな話で、だから、何なのかというのを書いていただきたいのですが。多分、情報がないのでわからないのですが、もともとの Art v 1 における例えばエピトープみたいなのがわかっていて、それとここは一致しないとか、何かの情報があって書いてくればいいのですが、何もないと書きようもないので、何かそこら辺をもう少しきちっと安全性としてわかるように書いていただければと思います。

○澤田座長 これは Art v 1 の方のエピトープの情報がわかっていれば。

○鎌田専門委員 書けるはずだと思います。

○澤田座長 手島先生、御存じですか、これは。

○手島専門委員 ちょっと詳細なことは存じ上げないのですが、エピトープの方はデータベースの中に入っているかどうかというようなことで調べられると思いますので、そこは調べていただければと思います。あと、これだと 8 残基の連続するものについての相同性はなかったということで、これを見ていると多くても 4 残基ですか、14 ページにあるのは 4 残基連続の方の相同ということですので、恐らくエピトープではないと思うのですが、ただ、エピトープ情報があるかどうかということとの考察というのはしていただいた方がよろしいかと思います。

○澤田座長 たとえ似ていても似ている部分が非常に短いとか、そこら辺のことを書いてもらえばいい。

○手島専門委員 そうですね。

○澤田座長 他に 15 ページまでで。五十君先生。

○五十君専門委員 15 ページの第 5、組換え体に関する事項の 1、宿主との差異に関する事項の最後の方の部分なのですが、抗生物質耐性についてカナマイシンとブレオマイシンを獲得しているとはっきり書いています。先ほど指摘のあったように培養液中に抗生物質

は入れていないと思われまので、その辺を書いていただきたい。安全性基準の中ではカナマイシンは今まで実績があって問題ないと思うのですけれども、抗生物質のマーカ-遺伝子がある場合は、プロダクトの性質とか基質特異性のあたりまできちっと整理してくださいという記載があるので、できれば、ブレオマイシンに関してこのあたりの説明をもう少しどこかでしていただければと思います。

○澤田座長 ブレオマイシンはあまり使うことがないのですけれども、pUB110 はかなりよく使われていますね。

○五十君専門委員 今まではこんなにはっきりとブレオマイシン耐性を獲得していると書いていなかったものすから。

○澤田座長 このブレオマイシン耐性は本当に生きているかどうか、それも確認していただいて。普通、製造では使われないので、安全性に問題があるかどうかというところまで議論されなかったかと思われまですが。

○五十君専門委員 おそらく、精製工程でタンパク質がなくなるということなので大丈夫だと思ふのですけれども、今まで、こんなにはっきりと耐性を獲得していると書かれていなかったものすから、その辺を含めて確認をしていただきたい。

○澤田座長 今まで pUB110 を使った例が何件かあったような気がするのですが。

○北村課長補佐 8 月に御審議いただいた 6- α でも同じ pUB110 を使っていて、同じ 15 ページの (2) の 2 パラ目のところで、TaqAM からは、pUMQ1 由来の DNA 断片を検出できなかつたことから、ブレオマイシン耐性遺伝子は含まれていないことを確認しているという記載があります。

○澤田座長 これに関して再確認していただきたいと思ふます。

○中島専門委員 今回の遺伝子は ORF β の中に入っているので、ブレオマイシン耐性の ORF γ の遺伝子は無傷すから確かに耐性はあるのかなど。

○澤田座長 ありがとうございます。

他に 15 ページまで。

○児玉専門委員 確認させていただければと思ふのですけれども、今回は消化性試験とか、そういうデータは提出されていないのですけれども、従来品とアミノ酸配列が完全に一致しているので、それは要らないだろうという、そういう判断でよろしいのでしょうか。

○澤田座長 食品とちょっと違って、すべての場合に求めているわけではなくて、それで、何か懸念があるときは求めていたように思ふますけれども、手島先生。

○手島専門委員 それで問題ないと思ふます。

○澤田座長 今回は全くタンパクとしては同じもので、微量を食している可能性はあるかもしれません。

○鎌田専門委員 くだらないことなのですが、15 ページの (2) の真ん中ぐらいに、「TaqAM 製造工程中の加熱処理工程で失活除去される可能性が高い」と書いてあるのですが、●●●程度の処理で、さて、除去までされるのかという、その後ろのステップで

除去工程が入っているのですが、失活だけにしておいていただいた方がいいかなと思います。
○澤田座長 「可能性」だけではまずいので、それは確認して適切に修正していただきたいと思いますが、他によろしいでしょうか。

それでは、続きましてちょっと第 5 に入ったところもありましたけれども、第 5、第 6、第 7、第 8 で、15 ページから最後にかけてまして、御意見、コメントがありましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、本件に関しましては、細かい記載整備的なことを御指摘いただきましたけれども、特に安全性上、大きな問題があるということではないようでありますので、続きまして評価書案の審議に入りたいと思います。事務局から御説明をお願いしたいと思います。
○三木係員 それでは、右上に資料と書かれております食品健康影響評価に関する資料を御準備ください。こちらの 1 ページからが本品目の評価書案になりますけれども、少しページをめくっていただいて 6 ページから御説明させていただきます。

6 ページの 22 行目にございますけれども、I の評価対象添加物の概要といたしまして、品目、用途、申請者及び開発者をそれぞれ記載しております。

31 行目ですけれども、本添加物は 4- α -グルカノトランスフェラーゼの生産性を高めるために、*Bacillus subtilis* BR151 株を宿主として、*Thermus thermophilus* ATCC33923 株由来の 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pUMQ1 を導入して作製した BR151 (pUMQ1) 株を利用して生産された 4- α -グルカノトランスフェラーゼであると記載しております。

37 行目ですけれども、食品健康影響評価につきまして、第 1、安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違でございますけれども、次の行の 1、従来の添加物といたしまして、(1) 名称、基原及び有効成分につきましては、以下の記載のとおりとなっております。また、(2) の製造方法、また、59 行目の (3) の用途及び使用形態につきましても、記載のとおりとさせていただきます。7 ページ目にまいりまして、(4) の摂取量につきましても記載のとおりとなっております。

70 行目にまいりまして、2、宿主及び導入 DNA につきまして、(1) 宿主につきましては、宿主は *Bacillus subtilis* 168 株の突然変異株 *Bacillus subtilis* BR151 株であり、芽胞形成能を失っているとしております。

(2) DNA 供与体は、*T. thermophilus* ATCC33923 株であるとしております。

(3) 挿入 DNA である 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子は、4- α -グルカノトランスフェラーゼを発現するということです。この遺伝子を含む発現プラスミド pUMQ1 を宿主に導入したということを記載しております。

85 行目にまいりまして、3、宿主の添加物製造に関しましては、*Bacillus subtilis* は食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験があり、安全に使用されているということです。また、OECD において GILSP が適用できる宿主微生物として認定されていると記

載しております。

91 行目、4、宿主の構成成分等に関する事項といたしまして、*Bacillus subtilis* が有害生理活性物質を生産する報告はないとしております。

94 行目、5 の遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料といたしまして、(1) 製品名及び有効成分につきましては以下の記載のとおりとなっております。

次のページにまいりまして 107 行目、(2) の製造方法でございますけれども、2 行目で、製造方法は従来の添加物と基本的には同様であるということです。また、111 行目にまいりましてけれども、生産菌は精製工程におけるろ過により除去されるとしております。

(3) 用途及び使用形態につきましても、従来の添加物と変わらないとしております。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較といたしまして、こちらは従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素とさせていただきます。

120 行目にまいりまして、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といたしまして、本添加物と従来の添加物のアミノ酸数及びアミノ酸配列、反応至適温度、反応至適 pH は変わらないということとなっております。宿主との相違点といたしましては、4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミドが導入され、4- α -グルカノトランスフェラーゼ産生性を獲得している点、及びカナマイシン及びブレオマイシン耐性を獲得している点となっております。

129 行目ですけれども、以上より、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し、以下の各事項について評価を行ったとしております。

132 行目にまいりまして、第 2、宿主に関する事項といたしまして、1、分類学上の位置づけに関する事項といたしましては、以下の記載のとおりとなっております。

2、病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項といたしまして、*Bacillus subtilis* の病原性は知られておらず、有害生理活性物質を生産するという報告はございません。9 ページ目にまいりまして、また、国立感染症研究所病原体管理規程のバイオセーフティレベル 1 に該当するとしております。なお、本品目の申請書には国立感染症研究所の規程に関する記載はございませんけれども、同じ宿主を用いていて、以前に御審議いただいた 6- α -グルカノトランスフェラーゼのものと記載を揃えさせていただきます。後で、申請者に依頼し、本品目の申請書にも国立感染症研究所病原体管理規程に関する記載を追記させていただきたいと考えております。

145 行目にまいりまして、3、寄生性及び定着性に関する事項といたしまして、*Bacillus subtilis* が腸管内に定着する可能性はあるが、食経験を有することから安全上の問題はないと考えられるとさせていただきます。

149 行目、4 につきまして、病原性の外来因子の存在を示唆する事実は認められていないとしております。

5、宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項といたしまして、近縁株である *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は、毒性物質を生産することが知られているが、宿主とは明確に区別されるとしております。

157 行目にまいりまして、第 3、ベクターに関する事項といたしましては、1、名称及び由来に関する事項に関しましては、発現プラスミドの作製には *Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 が用いられておりまして、このプラスミドは食品用酵素の製造等に長年安全に利用されており、ヒトに対する有害性は知られていないとさせていただきます。

163 行目にまいりまして、2、性質に関する事項といたしまして、(1) DNA の塩基数及びその塩基配列、(2) 制限酵素による切断地図については、それぞれ明らかになっているとしております。170 行目の (3) 既知の有害塩基配列につきましては含まれていないとしております。(4) 薬剤耐性につきましては、カナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子が含まれているということです。(5) の伝達性につきましては、伝達を可能とする塩基配列は含まれていないと今のところ、させていただきます。

181 行目、(6) の宿主依存性に関する事項といたしましては、次のページにまいりまして、プラスミドの複製開始配列が *Staphylococcus* 属菌及び *Bacillus* 属菌で機能することは知られているが、それ以外の菌で機能することは知られていないことから、宿主依存性は高いと考えられるというふうにしております。

186 行目の第 4、挿入 DNA、遺伝子産物並びに発現ベクターの構築に関する事項といたしまして、1、挿入 DNA の供与体に関する事項といたしましては、(1) 名称、由来及び分類については、4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子の供与体は *T. thermophilus* ATCC33923 株であるというふうにしております。

192 行目の安全性につきましては、本株はヒトへの寄生性または感染性を有するとは考えられないとして、また、研究開発等の第二種使用規程にかかわる省令においてクラス 1 に分類され、ヒトに対する病原性はないとされているということです。

200 行目にまいりまして、2、挿入 DNA または遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項といたしまして、(1) 挿入遺伝子のクローニングにつきましては、4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子は供与体の染色体 DNA から単離した遺伝子であるということです。

(2) 挿入遺伝子の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は、明らかになっているとしております。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項といたしまして、4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子が発現する 4- α -グルカノトランスフェラーゼは、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、新たに α -1,4-D-グルコシド結合を形成する反応を触媒する酵素である、アミノ酸数及びアミノ酸配列は従来の添加物の有効成分である 4- α -グルカノトランスフェラーゼと同じであるというふうな記載にしております。4- α -グルカノトランスフェラ

一ゼと既知の毒性タンパク質、また、既知のアレルゲン、また、次のページにまいりまして、抗原決定基について、データベースを用いて相同性検索を行った結果、それぞれに該当するものは見出されなかったということです。

228 行目にまいりまして、3、挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現にかかわる領域に関する事項といたしまして、(1) プロモーター、(2) ターミネーターについては、それぞれプラスミド上の配列が機能していると考えられるということです。

238 行目、(3) その他、*Bacillus subtilis* 由来のリボソーム RNA をもとに合成した SD 配列を付加したというふうにさせていただいております。

244 行目にまいりまして、4、ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項といたしまして、プラスミドに 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子及び SD 配列を挿入することにより、発現プラスミドを作製したというふうにしております。

248 行目、5 の構築された発現ベクターに関する事項といたしまして、(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図については、それぞれ明らかになっています。

253 行目、(2) 目的以外のタンパク質を発現するオープンリーディングフレームにつきましては、発現プラスミドの全塩基配列についてオープンリーディングフレーム検索を行った結果、30 アミノ酸以上の ORF が 87 個見出されたというふうになっております。これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性について、Swiss Plot Protein sequences データベースを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す機知の毒性タンパク質は見出されなかったというふうに記載しております。

次のページにまいりまして、また、これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性についても ADFS データベースを用いて検索を行った結果、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す ORF が 1 個見出されたが、この ORF は 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子の相補鎖の一部に相当し、遺伝子供与体である *T. thermophilus* に本来存在するものであること、また、この ORF に対する SD 配列は存在しなかったことから、タンパク質が翻訳される可能性は低いと考えられるということです。また、抗原決定基につきましても ADFS 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 8 アミノ酸配列と一致するものは見出されなかったということを記載しております。

272 行目にまいりまして、(3) 意図する挿入遺伝子の発現プラスミド上の位置は明らかになっているということを記載しております。

277 行目、(4) につきましては、発現プラスミドは目的外の遺伝子混入がないように構築され、宿主に導入されているとしております。

6 の DNA の宿主への導入方法に関する事項といたしまして、発現プラスミドを宿主に導入後、カナマイシンを含む培地で選抜することによって得られたと記載しております。

286 行目、7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項といたしまして、(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関しましては、カナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子が存在し、それぞれ KAN、BRP を発現するというものです。これら

の遺伝子はプラスミド pUB110 に由来しているものです。その下に両タンパク質の作用に関しての記載をさせていただいております。

297 行目にまいりまして、(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項といたしまして、KAN 及び BRP は製造工程における加熱により、こちらは後ほど直させていただきますけれども、失活除去されると考えられる。また、高分子糖質の製造工程における精製により、最終製品に残存する可能性は低いということです。さらにサザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、pUMQ1 由来の断片は検出されなかったことを記載しております。305 行目にまいりまして、また、pUB110 は食品用酵素の製造等に長年安全に利用されてきており、安全上の懸念はないとしております。

以上のことから安全性についての問題はないと考えられるとさせていただいております。

311 行目、第 5、組換え体に関する事項といたしまして、1、宿主との差異に関する事項といたしましては、発現プラスミド中の 4- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ブレオマイシン耐性遺伝子が導入されていることが宿主との差異であるとしております。

319 行目、2、遺伝子導入に関する事項の (1) 制限酵素による切断地図に関する事項としまして、発現プラスミドの制限酵素による切断地図は明らかになっております。

(2) オープンリーディングフレームに関する事項といたしまして、発現プラスミドにおいて確認された目的以外の ORF については、既知のタンパク質との相同性は認められなかったと記載しております。

330 行目の第 6、組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項といたしまして、1、添加物の製造原料または製造器材としての使用実績につきましては、TaqAM の製造原料は、食品または食品添加物製造用として、一般的に使用されているものということを記載しております。

2、添加物の製造原料または製造器材につきましても、一般的に使用されているものを使用しているとさせていただいております。

14 ページにまいりまして、第 7、遺伝子組換え添加物に関する事項といたしまして、1 の諸外国における許可等について、米国において GRAS として認定されていることを記載しております。

2、組換え体の残存に関する事項ですけれども、生産菌の残存がないことを培養法で確認し、また、発現プラスミドに由来する DNA 断片は、サザンハイブリダイゼーション分析の結果、検出されなかったとしております。

351 行目、3、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項といたしまして、TaqAM は JECFA の食品用酵素剤に対する一般規格を満たしており、また、宿主につきましても食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験があり、有害な物質を生産するという報告はないことから、製造に由来する非有効成分の安全性に問題はないと考えられると記載させていただいております。

4、精製方法及びその効果に関しましても、精製方法及びその効果は明らかでありまして、有害物質が混入することは考えられないとさせていただいております。

5の有害性が示唆される常成分の変動に関する事項といたしましても、TaqAMは従来の食品用酵素の製造に使用されているものであり、JECFAの純度規格を満たしているということを記載させていただいております。

第8につきましても、第2から第7までの事項により安全性の知見は得られているとさせていただいております。

その下に食品健康影響評価の結果を記載させていただきます。

以上です。

○澤田座長 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、コメントをいただきたいと思います。なお、細かい字句の修正等につきましては、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。

それでは、順番に、先ほどと同じように第1から第3、10ページの184行までで御意見がありましたらお願いしたいと思います。

○北村課長補佐 事務局ですが、122行目、123行目の「至適」の字が違いますので、申しわけありません、修正いたします。

○澤田座長 どうぞ。

○児玉専門委員 6ページの48行目のIUB分類名というところにブランチングエンザイムと出てくるのですが、もともとの申請書とか、101行目にもIUB分類名と出てくるのですけれども、そっちとブランチングエンザイムは多分、ここだけしか出てこないのですけれども、多分、IUB分類名はちょっと自信がないのですけれども、ブランチングエンザイムという方が正しいような気がするのですが、そこを確認して統一というか、修正していただければと思います。

○澤田座長 ブランチングというとは何となくおかしいような気がしないでもないのでけれども、大きなくくりとしてはそれが正しいかもしれません。

○児玉専門委員 そうですね。多分、大きなくくりはブランチングエンザイムに入っています。

○澤田座長 トランスフェラーゼなので。

○児玉専門委員 ただ、申請書は4- α -グルカノトランスフェラーゼとなっているのですね、その部分も、確認してもらって。

○澤田座長 それで、IUBのもとに戻って確認していただければと思います。

ほかによろしいでしょうか。

それでは、また、後で問題がありましたらお願いしたいと思いますが、続きまして、第4の挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターのところ、13ページの309行まで、ここに関しまして御意見がありましたらお願いしたいと思います。

ちょっと気になったことだけ、197行目の「クラス1に分類され」というのは「において」ではなくて省令のクラス1ではないかなと。分類する方法は、この下の告示で初めて分類されるのではないかなと思います。ちょっと確認していただければ。

他によろしいでしょうか。

○児玉専門委員 13ページ目の303行目に、TaqAMにはネオマイシンレジスタンスで「neor」と出てくるのですけれども、これは多分、カナマイシン耐性遺伝子のことだと思うのですけれども、ここだけこういう表記になっていますので。

○澤田座長 もう1か所あります。12ページの288行も「neor」になっていますので、申請書では「kan」になっていたのですけれども。

○児玉専門委員 そうですね、申請書では「kan」になっているのですよね。

○澤田座長 前の評価書も「neor」になっていましたか。

○北村課長補佐 遺伝子の方は「neor」にしていまして、カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼのタンパク質の方は「KAN」にしています。

○澤田座長 「kan」と「neor」と多分、両方に耐性なので、人によって違う表記となる可能性はあるのですけれども、前の評価書でも「neor」にしているわけですね。

○北村課長補佐 この記載は6-αの記載と同じにしております。

○澤田座長 どちらかという、「kan」の方がポピュラーなような気がしますけれども、「neor」も使いますか。

○五十君専門委員 ないわけではないので間違いないと思います。遺伝子名はイタリックにさせていただきたいと思います。ただ、neor遺伝子と書いてみたり、310行目、カナマイシン耐性遺伝子に戻っていたり、おさまりが悪いので統一した方が良いかと思います。

○澤田座長 一つの評価書の中では統一した方がいい。

他はよろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 12ページの一番上のところ、さっきの一応、アレルゲンと相同性が見つかったというのは、多分、新しいのが何かちょっと加わってくると思うので、そこだけ書いておいていただければと思います。

○澤田座長 アレルゲンの名前をという意味ですか。

○鎌田専門委員 というよりも、相同性があったところはエピトープではないとか、何か、そういう。

○澤田座長 説明の追加ですね。

○鎌田専門委員 説明を追加していただければと思います。

○澤田座長 他はよろしいでしょうか。

○児玉専門委員 ちょっと戻ってしまうのですけれども、9ページ目の179行目ですが、「伝達性を可能とする塩基配列は含まれていない」とあるのですけれども、先ほどヘルパーフェージ云々というところがありましたので、ただ、従来過去の事例は多分、こうなっているのだと思うのですが、申請書に書かれてしまっているのです、どうしたものかなと

いうふうにならざるを得ないのですけれども。

○澤田座長 「可能でない」という表現ではいけないですか。

○児玉専門委員 「可能」ではいけない。

○澤田座長 pUB110 になった後は、伝達は可能ですか。

○児玉専門委員 先ほど申請書の中で、ヘルパープラスミドがあった場合には伝達にかかわる配列が云々という表現があったので、ただ、過去の事例では多分、こうなっているのだと思うので、単独ではいけないと思いますので。

○澤田座長 これは後で申請者の見解も聞いて、整合性をとるように直したいと思います。他はよろしいですか。

それでは、第 5、組換え体に関する事項から最後までで、コメント、御意見がございましたらお願いしたいと思います。よろしいでしょうか。

それでは、何点か御指摘をいただきましたけれども、いただきました修正に関しましては評価書の方の修正もあわせて事務局の方で修正した後、私の方とそれから御意見をいただいた先生方に確認していただきまして、問題がなければ食品安全委員会に御報告して、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。ありがとうございました。

それでは、続きまして次のイミダゾリノン系除草剤耐性ダイズの審議に移りたいと思います。

この品目は昨年、もう 1 年ぐらい前ですけれども、専門調査会で審議を行いまして、指摘事項が出されたものであります。指摘事項に対する回答書が参りましたので、事務局から御説明をお願いしたいと思います。

○北村課長補佐 それでは、御説明いたします。お手元にピンクのファイルの御用意をお願いいたします。

本ダイズにつきましては、先ほど座長から御説明いただきましたように、昨年 10 月、その前に一昨年の 10 月に御審議いただきまして、3 回目の審議になります。

まず、指摘事項 1 ですが、リアレンジメントに関する事項となっておりまして、前回、昨年 10 月の調査会での指摘の回答につきましては、このファイルの一番最後のタグ、平成 22 年 10 月 27 日回答書というところに添付がされてございます。今回の指摘につきましては、今回の解析結果ではどのようなリアレンジメントが起こっているか、また、既知の遺伝子を破壊していないかを判断することができないということから、再検討してくださいということ、再検討の際には宿主において既にリアレンジメントが存在する可能性、農業形質の調査結果からは既知の遺伝子が破壊されていないこと、安全性に問題がないとは言えないということ踏まえて、検討してくださいという指摘になってございます。

前回の指摘が先ほど申しました一番後ろについてございますけれども、その 5 ページ目のところで、相同性が認められた配列が 18 番染色体に間違いはないかということと、既知の遺伝子を破壊していないかを検討してくださいという指摘がございまして、その回答として、相同性検索をしました結果、ダイズの 18 番染色体と相同性があるということ、

リアレンジメントが起きていますということ、それと ORF 検索の結果、挿入領域の近傍配列、1,000 bp について既知のアレルゲン、毒性タンパクとの相同性はないという回答があったところがございますが、前回の調査会におきまして、この結果からどのようなリアレンジメントが起きているか、既知の遺伝子を破壊していないかを判断することはできないという御判断をいただきまして、この指摘をいただいたところです。

回答は、2 ページ目の 3 パラ目からになりますが、今回、この指摘を踏まえまして、CV127 系統の 5' 末端近傍配列領域 1 の上流 2 kbp 及び 3' 末端近傍配列領域 4 の下流約 1 kbp のシーケンス解析を新たに行っております。得られた挿入 DNA の近傍配列、あと、宿主であります Conquista のゲノム配列及びゲノム解読が終了しておりますダイズ品種 Williams82 のアライメントを行っております。

まず、1 つ目の回答としまして、Williams82 のシーケンス情報から領域 1、領域 3 周辺のプライマーを設計しまして、Conquista ゲノムを用いて PCR 解析を行い、この PCR 産物のシーケンス解析を行っております。7 ページの図 19 が設計しましたプライマー及び PCR 産物の図になってございます。この Conquista ゲノム情報と CV127 系統の近傍配列と Williams82 ゲノムのアライメントを行いまして比較検討しております。

先ほどの 7 ページの図に戻っていただきまして、PCR 産物のところで赤で示してありますところが相同性が認められた領域でございまして、黒のところが相同性が認められなかった領域となっております。3 ページにいただきまして、PCR 産物は 4 種類ございますが、これと Williams82 とは 98%の相同性が認められたということでございます。その下については、この図のように黒のところが相同性が認められず、赤のところが相同性が認められたということが記載されてございます。

次に、「また」以下になりますけれども、これは 3' 末端の方になりますけれども、この領域 4、また、7 ページの図 19 の一番右に領域 4 というのがございますが、領域 4 の下流約 1 kbp のシーケンス情報を得まして、同様に Conquista ゲノム、Williams82 とのアライメントを行っております。この 3' 末端領域 4 の下流域約 1 kbp 以降は繰り返し配列が続いて、プライマーの設計が困難だということから、1 kbp の結果のみ得られたということでございます。

8 ページに図 20 がございますけれども、プライマーをこのように設計いたしまして、4 つの PCR 産物が A1 から A4 になりますが、これについてシーケンス解析を行っております。この 4 つの断片の共通した配列につきまして、Conquista ゲノムの PCR 産物及び Williams82 とのアライメントを行っております。その結果、この 1 kbp の領域については、Conquista ゲノムと 100%の相同性が認められておりまして、この配列と Williams82 とは 94%の相同性が認められてございます。

さらに、バイオインフォマティクス解析から、得られました領域 4 の下流域 1 kbp から、さらに 2 kbp の Williams82 のシーケンス情報を用いまして、相同性の検索を行っております。このダイズ染色体 2 番におきます配列は、ダイズ染色体のうち、15 番、5

番、17番と相溶性が高いということから、これ以上の3'末端近傍配列領域のシーケンス解析は困難だということが記載されてございます。

このアライメントの結果から、Conquista ゲノムとデータベースである Williams82 とは 94%の相溶性が認められたということから、遺伝子を挿入する前の宿主 Conquista におきまして、既にリアレンジメントが存在する可能性は考えにくいということでございます。また、本系統は遺伝子導入によりまして、挿入 DNA の近傍配列において大きなリアレンジメントが起こったと考えられるということでございます。

挿入 DNA 配列から上流 829 から 998 bp の領域については、ダイズ由来の CDS Glyma02g36330.1 と 100%の相溶性が認められまして、この領域はダイズ由来の 2 つの EST 配列とも 100%の相溶性を示してございます。この遺伝子の機能は不明だということが前回、報告されてございます。

今回、この CDS の遺伝子配列を詳細に解析しましたところ、9 ページの図 21 になりますけれども、この近傍配列領域 1 にはこの遺伝子のエキソン 2 が存在しまして、さらに上流にはエキソン 1 が存在するということがわかったということです。この挿入 DNA については、本遺伝子のイントロン領域に挿入されたと考えられまして、この遺伝子が破壊されている可能性が高いということが考えられますということです。4 ページにまいりまして、この遺伝子と相溶性が認められる配列は、ダイズ染色体の 2 番に 1 つ、10 番に 2 つ存在するということです。

さらに 10 ページの図 22 に示してありますように、近傍配列領域 3 及び 4 のリアレンジメントによって、既知の遺伝子が破壊されている可能性について調べたということです。その結果、コード配列が破壊されている遺伝子は認められませんでした。領域 4 の 5' 末端側 353 bp がこの遺伝子の推定 5' UTR 領域であることが確認されたということです。この遺伝子の機能は不明となっております。この遺伝子産物は、記載の 6 つの遺伝子産物との相溶性が認められたということで、相溶性の高いものが存在するということです。

以上のことから、本系統の挿入 DNA 及び近傍配列は、遺伝子挿入時に大きなリアレンジメントが起こりまして、内在性の遺伝子は破壊されている可能性が高いということです。しかしながら、農業形質及び種子の主要構成成分、栄養阻害物質の分析結果から、リアレンジメントに起因すると考えられる影響は、認められなかったという記載になってございます。

29 ページからが指摘事項 2 になります。これも前回の指摘の回答に対する指摘になってございまして、パンクレアチンを含まない SIF でタンパク質が分解されている原因として、試験に用いたタンパク質に含まれる不純物が考えられるということから、精製度を高めたタンパク質を用いて再試験を行い、この結果を踏まえて原因について説明することという指摘になっております。

次に、31 ページになりますが、指摘事項 3 番についても同じく人工腸液に関する感受

性の試験の指摘になってございまして、ウエスタンブロット分析において非特異的バンドが検出されたことは、分析結果の解釈を複雑にすることから、精製度を高めたタンパク質を用いて再試験を行うことという指摘になってございまして、再試験を行ったという回答がそれぞれされてございます。

29 ページに戻っていただきまして、前回の回答におきまして、大腸菌で発現させました改変 AHAS(m)タンパク質及び本系統の葉から抽出しました AHAS タンパク質は、非常に不安定だということから、60 分後のパンクレアチンを含まない SIF 中において分解されるという結果になったということで、前回の回答書に記載がされておりますように、抽出物中の他の構成タンパク質の違いが、AHAS タンパク質の安定性に影響を与えているのではないかという推測をされてございます。

今回、本系統の総 AHAS タンパク質の発現量が低いということから、植物体からタンパク質を得るのは困難だということになりまして、大腸菌で発現させた改変 AHAS タンパク質を用いまして精製度を高めて、再試験を行ってございます。この大腸菌で発現させましたタンパク質については、本系統から産生されます改変 AHAS タンパク質と実質的に同等であることを確認してございます。

この結果については、30 ページの図 30 に示されたとおりでございまして、SDS-PAGE 分析及びウエスタンブロット分析において、パンクレアチンを含まない SIF で、AHAS タンパク質が分解されないということが確認されてございます。30 ページの A の方が SDS、B がウエスタンブロットでございまして、左から 2 レーン目がパンクレアチンを含まない SIF の 60 分後です。パンクレアチンを含む SIF で速やかに分解されまして、反応 0.5 分後以降、改変 AHAS(m)タンパク質のバンドは検出されなかったという結果になってございます。

31 ページ、先ほど説明しました 3 番の回答も、今、説明をしました図 30 のとおりでございます。

次、4 番、指摘事項 4 になりますけれども、前回の指摘事項 13 に対する回答につきまして、大腸菌由来の改変 AHAS(m)タンパク質において、フィードバック制御が確認されなかった理由として、本制御にかかわるタンパク質が含まれていないためと説明をしているが、その根拠が示されていないということから、根拠を示すか、記載内容を適切に修正することという指摘になってございます。

回答としましては、バリン及びロイシンの濃度が高まると、AHAS 小サブユニットタンパク質 (AHASS タンパク質) が関与しまして、AHAS 酵素活性を調節することが報告されています。大腸菌で発現させて精製した改変 AHAS(m)タンパク質には、AHASS タンパク質が含まれていないので、フィードバック制御が確認されなかったと考えているということでございます。

32 ページからは修正事項がございまして、1 番、33 ページに 2 番、34 ページに 3 番の修正事項があつて修正がされてございます。

説明は以上です。よろしくお願ひします。

○澤田座長 ありがとうございます。

それでは、指摘事項に対する回答につきまして、項目ごとに順番に御意見をいただきたいと思ひます。まず、指摘事項 1 のリアレンジメントで、これはかなりいろいろ御意見があるかと思ひますけれども、鎌田先生、澁谷先生、小関先生からいろいろ御意見をいただいたのですけれども、小関先生はおられず、澁谷先生も今日、御欠席ということですので、鎌田先生の方からお願ひしたいと思ひます。

○鎌田専門委員 今回の結論が結局、よくわからないという結論なので、どうしたものかなというような大変頭が痛いところです。いずれにしても、リアレンジメントが起こったので、当初、入っていた周辺だけではなくて、他の染色体の部分も巻き込んでいるので何が起こったかはわからない。

ただ、それが食品の安全性上、どれぐらい問題があるかが次の問題で、これまでだと周辺のもの、リードスルー等が起こったときのことも含めて、一応、6 つの読み枠で全部、アレルゲン、毒性タンパクは見てもらっていて、今回の 1 kbp のところまでは見てもらっていると。ところが、さらにその外側にもリアレンジメントが起こっているので、さて、でも、リアレンジメントは外来の遺伝子そのものではなくて、ダイズのゲノムのアレンジメントなので、今回、見ている限りは、若干、わからない部分があるところはあるのですが、そうすると、そこまで踏み込んで安全性の議論をするのかと。

そうすると、既存のダイズ品種、組換えでなくても、全部、議論しろという話になるので、余りそこまで踏み込めない。リアレンジメントが起こったことは確かだけれども、少なくともここで見ている限りはほとんどが宿主か、ゲノム配列がわかっている標準ダイズのどこかの部分とほぼ一致しているなので、その意味では、変な外来遺伝子が混ざった形でのリアレンジメントではないので、そう考えると、ダイズの一般的ないろんな交配の中でも起こり得ることなので、あまりそこまで突っ込んで、明確に、要するにリアレンジメントが起こっていないところまで要求すると言われてたら、それは多分、現実的には無理だということと、リアレンジメントが起こっている中については、既存のダイズゲノムの中のアレンジメントだと考えられるので、そこまでこれ以上、アレルゲン、毒性のことも含めて要求するのは多分、現実的ではないし、あまりそれがこの系統の食品安全性上の意味ということにはならないだろうというふうに思ひます。

○澤田座長 それでは、他の先生、いかがでしょうか。

一つは 18 番染色体由来の断片がリコンビネーションで入ってきてしまう。それから、2 番染色体の大分離れている断片も入ってきてしまう。また、領域 4 の下流がちょっと短くて、その下流がどうなっているかわかっていないところがあるというのは問題になるかと思ひますけれども、Glyma02g36330 というのですか、遺伝子が破壊されていることは確からしいですね。それは機能がよくわかっていなくて、申請者が言うにはダイズは 4n で多重性があるので、一つ遺伝子が壊れても余り影響はないだろうという、そういう議論

になっております。

○鎌田専門委員 遺伝子破壊の方に関しては比較で、もし破壊されていたときにどこまで安全性の観点から、いろんなデータなり、考え方を要求するかは一番難しい問題で、本来持っている遺伝子がミュートーションでなくなるケースももちろんいっぱいあるので、壊れていたから食品安全上、問題があるというのは一般的には余り考えられない。そのかわりに、もし、今回のような場合、1個に限らないのですね、実は。ゲノム配列上、どかっとな抜けている可能性があるんで、そうすると、1個1個の安全性議論は多分、それも現実的ではないと思うので、やっぱり毒性物質とかが知られている場合に、それがふえてしまうと、本来、何かそういう毒性物質の合成を抑制しているような遺伝子があつて抜けたりすると、毒性物質が増えたりするというのが一番、食品の安全性上は問題があるので、そこら辺だけのデータはきっちり押さえられているかどうかを、ここで確認した方がいいのではないかというふうに思います。

○澤田座長 OECD 文書で示された必ず調べた方がいいというダイズの既知の構成成分に関しましては、きちんとやっていて、いろいろなものに、変化がないことは確認されています。ちょっと気になるのは、領域1と4の間が、すぼっと、さっきおっしゃったように抜けてしまっている可能性があるのですけれども。確か kb でいくと、数百 kb ぐらいですか。ダイズの場合、染色体はデュプリケートしているので、そのくらい、抜けても形質に変化はない可能性は高いかと思えますけれども、そこら辺、他の先生方、いかがでしょうか、なかなか判断が難しいところがあるかと思えますけれども。

○飯専門委員 私も先ほど鎌田先生が言われたように、結局、これだけリアレンジメントが起きたら、結果的に毒性物質だとか代謝産物に変化があるかないかでしか判断のしようがないのではないかなという気がします。恐らくは落ちている方向の変異ですから、先ほど言われたような抑制されているものが、抑制されなくなるという可能性だけを考えておけばいいような気がするのですけれども。

○澤田座長 他の先生方はいかがでしょうか。

○五十君専門委員 よろしいですか。ダイズの毒性成分にかかわる遺伝子の位置とかはある程度、プロットできますか、難しいですか。

○鎌田専門委員 まだ、できていない。二次代謝系が。

○五十君専門委員 もし、それができるとしたら、この遺伝子近傍ではないという判断ができ、すっきりすると思います。というのは、パススルーが起こる可能性もまだないわけではないので、影響を受けないだろうということになれば良いと思いました。先ほどの抑制型の遺伝子が機能しなくなったかどうかと、これらの2つが明らかでないということになれば、代謝産物の結果で判断をすることは可能かなと思います。

○澤田座長 細かいことを言い出しますと、18番と2番の相手方も本当は見なければいけないという議論が出てくるかと思えますけれども、今回に限っていえば、領域1と4の間で抜けたところを一応精査して、どういう遺伝子があるかを見て、それでたとえ抜け

でも安全性上、問題はないだろうということをもってもらえればよろしいと、そういうことですか、今、おっしゃっていることは。

○五十君専門委員 基本的にはそのあたりで、もし、毒性に係る遺伝子の位置が判ればある程度、いいかなということですよ。

○澤田座長 児玉先生。

○児玉専門委員 これだけリアレンジメントが激しいと、もう対症療法でいくしかないの、落ちる分には抑制遺伝子型を考えればいいのですけれども、あとはリードスルーという形になりますので、リードスルー前後には起きていないという確認を出してもらおうということは、あってもいいかなというふうにちょっと思うのですけれども。

○澤田座長 他に。よろしいですか。

それでは、もう一回、理論的な説明になるかと思えますけれども、求めると。

○鎌田専門委員 理論的なことをもちろん書いていただくのはいいのだけれども、多分、抜けた領域のところにはどんなコード配列があるか、多分、ゲノム情報があるので、それなりに予測はつくのだけれども、今回みたいに予測がつかない遺伝子が入っていたときに、結局、回答のしようがなくなるのですね、その部分は。何か機能未知の遺伝子が入っていましたということしか書けなくなるので、そこはどうしたらいいのかというのは、なかなか難しいところで、フィチン酸なんかがあるので、フィチン酸の例えば生合成の遺伝子かどうか、分かればいいのだけれども、分からなかったらということになるわけですね、最後は。だから、返ってくる回答を考えると機能未知があったときに、今度、我々が何を判断するのかというのが次の課題になるので、それもある程度、考えて質問しておかないと答えが出なくなってしまうという気はするのですが。

○澤田座長 ジーンのアノテーションの問題になるかと思うのですけれども、現時点で分かっている範囲で、ホモロジーなりを考えて、大体、機能が類推できる場合は類推していただいて。できない場合はアンノウンでやるしかないということですよ。

それでは、よろしいでしょうか。次の指摘事項 2 と 3 になりますけれども、消化性試験、これは手島先生と橘田先生の御指摘かと思えますけれども、手島先生。

○手島専門委員 これに関しましては大腸菌で発現させて、そして精製して人工腸液での SIF での実験をしたということで、パンクレアチンなしで時間を置いても減少していくというふうな、前回見られたような現象は見られていませんので、実験的に改良されておりますので、この回答で特に問題ないと思いました。

○澤田座長 ありがとうございます。

橘田先生、追加で何か、よろしいですか。

○橘田専門委員 特に追加はございません。これでよろしいかと思えますけれども、最初からこういうデータを出してきていただければありがたいなと思うのですけれども。

○澤田座長 それでは、指摘事項 4 でフィードバック制御の関連で、これは飯先生。

○飯専門委員 リファレンスになるものを挙げてもらえましたので、基本的にこれでいい

かと思います。ただ、文章の修正のところ、31 ページの修正事項の次の最初の行のところですが、下線で「の濃度」というのが入っているのですけれども、多分、これはない方がかえって読みやすいかと思います。その数行後の「の濃度」というのも同じで、これらの2か所に関しては無理に入れない方がかえっていいかなと思いました。

○澤田座長 内容はよろしいですね。

○飯専門委員 内容的には一応、これでいいかなと。

○澤田座長 ありがとうございます。

それで、あと、細かい修正事項が幾つかついていますけれども、これは何か問題がなければ、よろしいでしょうか。

これに関しまして、もう一回、次に回すか、評価書案の審議に移るかなのですけれども、いかがでしょうか。

○鎌田専門委員 いつ返ってくるかですね。

○北村課長補佐 評価書は、次回に、もう一度、審議していただいた後でよろしいですか。

指摘の内容なのですけれども、リアレンジメントでダイズゲノム上、欠失しているところについて、遺伝子があるかないかということがはっきり分かればいいということによろしいでしょうか。

○鎌田専門委員 こういうことだと思います。今回、Williams82 というのがゲノム情報でもわかっていますので、それと照らし合わせたときに、ここの入った位置で欠失と欠失が考えられる領域について転写を、いわゆる ORF になるかどうかと、もしなる場合に機能がわかっている場合については、その機能から予測して安全性に影響がないことを説明することと、そういう文章でよろしいのではないかと思うのですが。

○澤田座長 具体的にはクロモソーム上の塩基の番号がどこかに書いてありましたね。それで、領域の1と4の間が大きく欠失をしているところに相当すると思うので、その間をちょっと調べていただくのかなと。

○北村課長補佐 前回の回答書の8ページに領域1から4のゲノムの位置が書かれていて、その1と4の間の欠失しているところという意味で。

○澤田座長 前回の8ページの4,178万から4,434万、大体、このあたりが一応、大きく欠失しているところになるかと思います。

○飯専門委員 今の点ですが、どのくらい欠失しているかにもよるのですけれども、恐らく機能未知のタンパクや単なる転写因子様のタンパク質とアノテートされているものがぞろぞろ出てくる可能性があって、そうすると、何をしているか、結局はわからないわけですね。危惧するのは恐らく有害生理活性物質をつくるものが上がっているかどうかとか、そういう点に結局はなってくるので、今までの提出されているデータでそれが十分なのかどうかという見方が、一方では必要なのではないかという気もするのですけれども。アノテーションからは機能を推測できないタンパクが出てきたら、それで結局は分からないということになってしまうのではないかという気がするものですから。

○澤田座長 分からないなりに努力はしていただく。

○鎌田専門委員 一言、よろしいでしょうか。昔、食品の安全性の一番最初のガイドラインを作った時に考えていたのは、こういう遺伝子が破壊されたりした時に、野生植物だと毒物が知られているけれども、現在の野菜になる過程で、そういういわゆる天然毒物がうんと少なくなっているものが非常に多いので、そういうのが抑制タンパクでもしできなくなっているのだとすれば、それが抜けるのが一番食品安全上は問題だというふうに考えて、だから、野生種で知られているような毒物についても、そういう場合にはちゃんと記載をしてくださいというようなことを求めたのですね。多分、それがあある意味、ちょっと形を変えた形でこういうふうに残っているの、そこら辺を考慮して、今のデリレーションした部分について議論していただければというふうに思うのですが。

○澤田座長 よろしいですか。

○飯専門委員 後になってこれも出してくださいというのは気の毒な気もするので、逆に今、話しておいた方がいいのかなという気もするのですが。今、ざっと見ただけですけれども、例えばフィチン酸とかは一応定量されていて変化がないとか、その辺、しっかりデータをとっている部分に関してはある程度、それを根拠にできるのではないかと思うのですが、一方で、ダイズだとアレルギーがいろいろと発現しているのですけれども、そういうのが増えていないということを確認してくれているのであれば、それはそれで一つの証拠になると思いますので、何か、そういう工夫も回答のときにしていただけたらなと思うのですけれども。

○澤田座長 いずれにしろ、もう一度、ここで検討することになりますでしょう。

よろしいでしょうか。そうしますと、飼料の方にはまだいけない段階ということで、議題1に関しましては、これで終了ということになります。

議題2のその他でありますけれども、私の方から少し御報告がありまして、8月と9月の専門調査会で審議いたしました6- α -グルカノトランスフェラーゼと、それからダイズ2系統のスタックでありますけれども、申請書等の修正の指摘を出しておりました。これらの品目の取扱いについては、御担当の先生方に協力をいただきまして、座長預かりとなっていたところであります。いずれの品目も指摘に基づきまして修正されたことを確認いたしましたので、評価書を食品安全委員会に御報告いたしました。なお、これらは現在はパブリックコメントの募集中とのことであります。

私からの御報告は以上であります。

他に事務局から何かありますでしょうか。

○北村課長補佐 特にございませぬ。

○澤田座長 それでは、以上をもちまして、第98回遺伝子組換え食品等専門調査会を閉会いたします。どうもありがとうございました。