

遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた *Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼに係る食品健康影響評価（平成 24 年 11 月 7 日付け厚生労働省発食安 1107 第 2 号）については、平成 25 年 9 月 6 日に開催された第 118 回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

審議結果（案）については、幅広く国民に意見・情報を募った後に、食品安全委員会に報告することとなった。

2. *Bacillus subtilis* DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼに係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

平成 25 年 11 月 11 日(月)開催の食品安全委員会（第 493 回会合）の翌日の平成 25 年 11 月 12 日（火）から平成 25 年 12 月 11 日（水）までの 30 日間。

2) 受付体制

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

Bacillus subtilis DTS1451 (pHYT2G) 株を利用して
生産されたシクロデキストリングルカノトランス
フェラーゼ

2013年11月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<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>.....	3
要 約.....	4
Ⅰ. 評価対象添加物の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
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.....	5
1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料.....	5
2 宿主及び導入 DNA.....	6
3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料.....	6
4 宿主の構成成分等に関する資料.....	6
5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料.....	6
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.....	7
第2 宿主に関する事項.....	7
1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項.....	7
2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項.....	8
3 寄生性及び定着性に関する事項.....	8
4 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項.....	8
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.....	8
第3 ベクターに関する事項.....	8
1 名称及び由来に関する事項.....	8
2 性質に関する事項.....	8
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.....	9
1 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	9
2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項.....	9
3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカ遺伝子の発現に関わる領域に関する 事項.....	11
4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	12
5 構築された発現ベクターに関する事項.....	12
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	13
7 抗生物質耐性マーカ遺伝子の安全性に関する事項.....	13
第5 組換え体に関する事項.....	13
1 宿主との差異に関する事項.....	13
2 遺伝子導入に関する事項.....	13
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.....	14

1	添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	14
2	添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること	14
第7	遺伝子組換え添加物に関する事項	14
1	諸外国における認可、食用等に関する事項	14
2	組換え体の残存に関する事項	14
3	製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	14
4	精製方法及びその効果に関する事項	14
5	含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	14
第8	第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要事項	15
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	15
<参照>		15

＜審議の経緯＞

2012年11月7日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発食安1107第2号）、関係書類の接受

2012年11月12日 第453回食品安全委員会（要請事項説明）

2013年1月17日 第111回遺伝子組換え食品等専門調査会

2013年9月6日 第118回遺伝子組換え食品等専門調査会

2013年11月11日 第493回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

熊谷 進（委員長）

佐藤 洋（委員長代理）

山添 康（委員長代理）

三森国敏（委員長代理）

石井克枝

上安平冽子

村田容常

＜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＞

2013年9月30日まで

澤田純一（座長）

鎌田 博（座長代理）

五十君静信

宇理須厚雄

橘田和美

児玉浩明

澁谷直人

手島玲子

中島春紫

飯 哲夫

和久井信

2013年10月1日から

澤田純一（座長）

鎌田 博（座長代理）

小関良宏

宇理須厚雄

橘田和美

児玉浩明

近藤一成

手島玲子

中島春紫

飯 哲夫

和久井信

要 約

「*Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」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実施した。

本添加物は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの生産性及び品質を高めるために、*Bacillus subtilis* DTS1451 株を宿主として、*Bacillus clarkii* 7364 株由来の改変シクロデキストリン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 pHYT2G を導入して作製した DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。本添加物は、デンプンを加水分解し、 α -1,4-グルコシド結合による環状化反応を触媒する酵素であり、シクロデキストリンを含有する糖質を製造するために使用される。

「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）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性、アレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「*Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

品 目：*Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

用 途：デンプンを加水分解し、 α -1,4-グルコシド結合による環状化反応を触媒する酵素であり、シクロデキストリンを含有する糖質を製造するために使用される。

申請者：日本食品化工株式会社

開発者：日本食品化工株式会社

本添加物は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの生産性及び品質を高めるために、*Bacillus subtilis* DTS1451 株を宿主として、*Bacillus clarkii* 7364 株由来の改変シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *cgtrv* 遺伝子）、*B. subtilis* ISW1214 株由来のトリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子（*trpS* 遺伝子）、*Bacillus* sp. JAMB750 株由来のプロモーター及びシグナル配列並びに *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株由来のターミネーター配列を含む発現プラスミド pHYT2G を導入して作製した DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである。

II. 食品健康影響評価

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

1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称：CD アミラーゼ G

基 原：*Bacillus clarkii* 7364 株

有効成分：シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

IUB 分類命名法による酵素番号及び CAS 番号は以下のとおり。

IUB No.： 2.4.1.19

CAS No.： 9030-09-5

(2) 製造方法

CD アミラーゼ G は、*B. clarkii* 7364 株を生産菌として用い、培養工程、製剤化工程を経て製造される。生産菌は、製剤化工程で分離、除去される。

(3) 用途及び使用形態

CD アミラーゼ G は、デンプンを加水分解し、 α -1,4-グルコシド結合による環状化反応を触媒する酵素であり、シクロデキストリン含有糖質を製造するために使用されている。

(4) 摂取量

CD アミラーゼ G は、デンプンの加工に使用されるが、最終製品であるシクロデキストリン含有糖質の製造工程において除去され、最終製品には残存しない。

最終製品であるシクロデキストリン含有糖質中の CD アミラーゼ G は、ELISA 法を用いて測定した結果、1 ppm 未満であった。

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*B. subtilis* ISW1214 株より中性プロテアーゼ遺伝子、アルカリ性プロテアーゼ遺伝子、芽胞形成に関与する *spo0H* 遺伝子及びトリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子を欠失させた *B. subtilis* DTS1451 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変 *cgtrv* 遺伝子の供与体は *B. clarkii* 7364 株、*trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株、プロモーター及びシグナル配列の供与体は *Bacillus* sp. JAMB750 株並びにターミネーター配列の供与体は *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *cgtrv* 遺伝子は、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを発現し、*trpS* 遺伝子はトリプトファン tRNA 合成酵素を発現する。

これらの遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2G を宿主に導入した。

3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

B. 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、長期にわたり食品製造に安全に使用されている。

4 宿主の構成成分等に関する資料

B. subtilis が有害生理活性物質を生産するという報告はない。

5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は以下のとおりである。

製品名：CD アミラーゼ RV

有効成分：シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ

IUB 分類命名法による酵素番号及び CAS 番号は以下のとおり。

IUB No. : 2.4.1.19

CAS No. : 9030-09-5

(2) 製造方法

CD アミラーゼ RV は、DTS1451(pHYT2G)株を生産菌として用い、製造される。製造方法は、従来の添加物と基本的には同様であり、培養工程、製剤化工程を経て製造される。

生産菌は、製剤化工程において分離、除去される。

(3) 用途及び使用形態

CD アミラーゼ RV は、従来の添加物と同様にデンプンの加工に使用され、用途及び使用形態は、従来の添加物と変わらない。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

CD アミラーゼ RV は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素であるが、中性及びアルカリ性 pH 領域における酵素比活性が向上している。

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

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

CD アミラーゼ RV と従来の添加物との相違点は、アミノ酸配列及びアミノ酸数が異なる点である。また、従来の添加物と比較して、中性及びアルカリ性 pH 領域における酵素比活性が向上している。

(2) 組換え体と宿主

DTS1451(pHYT2G)株と宿主との相違点は、DTS1451(pHYT2G)株には改変 *cgtrv* 遺伝子及び *trpS* 遺伝子を含む発現プラスミド pHYT2G が導入され、シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ産生性及びトリプトファン tRNA 合成酵素産生性を獲得している点並びにテトラサイクリン耐性を獲得している点である。

以上 1～6 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、第 2 以下の各事項について評価を行った。

第 2 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は *B. subtilis* ISW1214 株の変異株 *B. subtilis* DTS1451 株であり、芽胞形成能を欠失させている。

B. subtilis は、広く自然界に存在し、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、ヒトは納豆等の食品を通じて多くの食経験がある。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. 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ない。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。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis が腸管内に定着する可能性はあるが、ヒトは納豆等の食品を通じて食経験を有することから、安全上問題はないと考えられる。

4 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

B. subtilis DTS1451 株は、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。

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

B. subtilis の近縁種である *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、*B. subtilis* とは明確に区別されている。

第3 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

発現プラスミド pHYT2G の作製には *Escherichia coli* 由来のプラスミド pACYC177 と *Streptococcus faecalis* 由来のプラスミド pAM α 1 から構築されたプラスミド pHY300PLK が用いられた (参照 1)。

2 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pHY300PLK の塩基数及び塩基配列は明らかになっている (参照 1)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pHY300PLK の制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 1)。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pHY300PLK の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pHY300PLK にはテトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。なお、*B. subtilis* 内において、アンピシリン耐性遺伝子は発現しない (参照 1)。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pHY300PLK には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pHY300PLK の複製開始配列は、*Bacillus* 属、*Escherichia* 属及び *Streptococcus* 属で機能することが知られている。

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

1 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

改変 *cgtrv* 遺伝子の供与体は *B. clarkii* 7364 株、*trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株である。

(2) 安全性に関する事項

B. clarkii 7364 株、*B. subtilis* ISW1214 株、*Bacillus* sp. JAMB750 株及び *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。また、これらは国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当する（参照2）。

2 挿入 DNA 又は遺伝子（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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

改変 *cgtrv* 遺伝子は、*B. clarkii* 7364 株の *cgtrv* 遺伝子の塩基配列に基づき、中性及びアルカリ性 pH 領域における発現量を高めるために成熟型タンパク質をコードする領域をクローニングした後、塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子である。従来のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼと比較して、アミノ酸数は多くなっている。

trpS 遺伝子は、*B. subtilis* ISW1214 株の *trpS* 遺伝子をクローニングした後、塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子である。

(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

挿入 DNA 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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・改変 *cgtrv* 遺伝子

改変 *cgtrv* 遺伝子が発現するシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼは、デンプンを加水分解し、 α -1,4-グルコシド結合による環状化反応を触媒する酵素であり、従来の添加物と比較して中性及びアルカリ性 pH 領域において比活性が向上している。

・ *trpS* 遺伝子

trpS 遺伝子はトリプトファン tRNA 合成酵素を産生し、宿主のトリプトファン tRNA 合成酵素産生能の欠失を相補する。

CD アミラーゼ RV は、従来の CD アミラーゼ G と同様の反応を触媒する酵素であるが、アミノ酸配列が異なることから、アレルギー誘発性について「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成 20 年 6 月 28 日食品安全委員会決定）の第 2 章第 5 の 5 に準じて、検討された。

1) 遺伝子産物の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

改変 *cgtrv* 遺伝子の供与体である *B. clarkii* 7364 株に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

2) 遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼに関して、アレルギー誘発性を示唆するような知見は確認されていない。

3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① 人工胃液に対する感受性

CD アミラーゼ RV の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始後 1 分以内に消化されることが確認された（参照 3）。

② 人工腸液に対する感受性

CD アミラーゼ RV の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 6 時間を経過しても消化されなかった（参照 3）。

③ 加熱処理に対する感受性

CD アミラーゼ RV の加熱による免疫反応性の変化を ELISA 法を用いて分析した結果、酸性及び中性 pH 条件いずれでも 80°C の加熱処理により免疫反応性が一時的に上昇したが、その後は経時的に低下した。したがって、CD アミラーゼ RV の免疫反応性は長時間の加熱処理に不安定であることが確認された（参照 4）。

4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に関するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

CD アミラーゼ RV 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、

Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP)^aデータベースを用いて同源性検索を行った結果、*Aspergillus oryzae* 由来の Taka-amylase A precursor 及び *Schizophyllum commune* H4-8 由来 glucoamylase と 80 アミノ酸配列で 35%以上の同源性を示す領域が認められた。これらの領域は、いずれも野生型シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼにも存在する配列であり、アミノ酸変異が導入されたことにより 35%以上の同源性を示す領域が増加することはなかった（参照 5）。また、抗原決定基との同源性の有無を確認するために、SDAP データベース^aを用いて同源性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致する配列は見いだされなかった（参照 5）。

5) 摂取量

CD アミラーゼ RV は、デンプンの加工に使用され、最終製品であるシクロデキストリン含有糖質の製造工程において除去される。最終製品中の CD アミラーゼ RV 含有量は、ELISA 法を用いて測定した結果、1 ppm 未満であった。

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) プロモーターに関する事項

改変 *cgtrv* 遺伝子のプロモーターは *Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺伝子のプロモーター配列由来である。*Bacillus* sp. JAMB750 株は、病原性や毒素産生性などのヒトに対する有害性は知られていない。

(2) ターミネーターに関する事項

改変 *cgtrv* 遺伝子のターミネーターは *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株由来の α -アガラーゼ遺伝子のターミネーター配列由来である。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

改変 *cgtrv* 遺伝子の上流には、本酵素を菌体外に分泌させるため、*Bacillus* sp. JAMB750 株由来のマンナナーゼのシグナル配列が付加された。また、同源性検索の結果、当該アミノ酸配列と同源性を示す既知のタンパク質及び連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 5）。

^a FAO/WHO Allergenicity Rules based on Sequence Homology プログラムを用いて 2012 年 10 月 24 日に検索

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pHY300PLK に、改変 *cgtrv* 遺伝子、プロモーター及びシグナル配列並びにターミネーター配列及び *trpS* 遺伝子を挿入することによって、発現プラスミド pHYT2G が作製された。

5 構築された発現ベクターに関する事項

(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

発現プラスミド pHYT2G 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（参照 6）。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

発現プラスミド pHYT2G の全塩基配列について、六つの読み枠においてオープンリーディングフレーム（ORF）検索を行った結果、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の目的以外の ORF が挿入遺伝子領域に 69 個見いだされた。これらの ORF についてタンパク質データベース^bを用いて blastp による相同性検索を行った結果、12 個の ORF に相同性が認められたが、既知の毒性タンパク質との相同性は見られなかった。また、この 69 個の 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、SDAP データベース^cを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸以上の配列で 35% 以上の相同性を示す ORF は見いだされなかった。また、抗原決定基との相同性の有無を確認するために、SDAP 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 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかった（参照 6）。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、発現プラスミド pHYT2G の全塩基配列であり、宿主においてはプラスミドの状態で作保持される。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

発現プラスミド pHYT2G は目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

^b UniProt (Swiss-Prot+TrEMBL) プログラムを用いて 2013 年 5 月 8 日に検索

^c FAO/WHO Allergenicity Rules based on Sequence Homology プログラムを用いて 2013 年 5 月 8 日に検索

6 DNAの宿主への導入方法に関する事項

発現プラスミド pHYT2G をプロトプラスト法により宿主に導入後、テトラサイクリンを含む培地で選抜することによって DTS1451(pHYT2G)株を得た。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

アンピシリン耐性遺伝子がコードする β -ラクタマーゼは、アンピシリンの β -ラクタム環を加水分解することによって活性を不活化する。また、テトラサイクリン耐性遺伝子がコードする膜タンパク質は、細胞内からテトラサイクリンを能動的に排出することで耐性を付与する。これらの遺伝子産物の有害性に関する報告はない(参照7)。なお、アンピシリン耐性遺伝子は *B. subtilis* では発現しないことから、DTS1451(pHYT2G)株においてアンピシリン耐性遺伝子は発現しない。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

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の含有量を確認するために、ドットハイブリダイゼーション法で測定した結果、CD アミラーゼ RV では 10^0 ppm のオーダーで含まれていたが、最終製品では検出限界 (0.1 ppm) 未満であった(参照8)。また、CD アミラーゼ RV に含まれるテトラサイクリン耐性遺伝子産物の含有量を ELISA 法で測定した結果、検出限界 (0.05 ppm) 未満であった(参照8)。

以上のことから、これらの抗生物質耐性遺伝子及び遺伝子産物については、安全上問題ないものと考えられる。

第5 組換え体に関する事項

1 宿主との差異に関する事項

DTS1451(pHYT2G)株に導入された発現プラスミド pHYT2G 中の改変 *cgtrv* 遺伝子がシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを発現すること、*trpS* 遺伝子がトリプトファン tRNA 合成酵素を発現すること及びテトラサイクリン耐性遺伝子の導入によってテトラサイクリン耐性を獲得していることが宿主との差異である。

2 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

DTS1451(pHYT2G)株に導入された発現プラスミド pHYT2G の制限酵素による切断地図は明らかになっている(参照6)。

(2) 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

DTS1451(pHYT2G)株に導入された発現プラスミド pHYT2G の挿入遺伝子領域のオープンリーディングフレーム (ORF) については、相同性検索の結果、既知の毒性タンパク質及び既知のアレルゲンとの相同性は見いだされなかった (第4の5 (2) 参照)。

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

1 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

CD アミラーゼ RV の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

2 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

CD アミラーゼ RV の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

第7 遺伝子組換え添加物に関する事項

1 諸外国における認可、食用等に関する事項

CD アミラーゼ RV は、海外での販売及び使用実績はない。

2 組換え体の残存に関する事項

CD アミラーゼ RV に生産菌の残存がないことを培養法により確認している (参照 9)。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

発酵培地原料は従来の食品用酵素の製造に用いられてきた原料である。また、宿主 *B. subtilis* DTS1451 株の起源である *B. subtilis* ISW1214 株が有害生理活性物質を生産するという報告はない。したがって、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。

4 精製方法及びその効果に関する事項

CD アミラーゼ RV の精製方法及びその効果は明らかであり、有害物質が混入することは考えられない。

5 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項

CD アミラーゼ RV の製造原料及び製造方法は、従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、有害性はないと考えられる。

第8 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第7までにより、安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ」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)に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

- 1 Ishiwa H, Shibahara-Sone H. New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. IV. The nucleotide sequence of pHY300PLK and some properties in relation to transformation. *Jpn J Genet.* 1986;61:515-528.
- 2 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (平成22年6月) 国立感染症研究所
- 3 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その6 人工胃液及び人工腸液に対するシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの消化性) (社内報告書)
- 4 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その7 加熱処理におけるシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの抗原抗体反応への影響) (社内報告書)
- 5 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その8 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼのアレルギー誘発性及びシグナル配列の安全性に関する調査) (社内報告書)
- 6 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その3 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ発現プラスミド pHYT2G のシークエンス) (社内報告書)
- 7 Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2001;65:232-260.
- 8 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その9 シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ製剤中の抗生物質耐性遺伝子及びその産物の含有量) (社内報告書)
- 9 *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの安全性評価に係る報告書 (その4 CD アミラーゼ RV の調製)