

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 NZYM-R0 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に係る食品健康影響評価（平成 27 年 2 月 25 日付け厚生労働省発食安 0225 第 1 号）については、平成 27 年 6 月 17 日に開催された第 138 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. NZYM-R0 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 27 年 7 月 28 日（火）開催の食品安全委員会（第 571 回会合）の翌日の平成 27 年 7 月 29 日（水）から平成 27 年 8 月 27 日（木）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

NZYM-R0 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

2015年7月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

＜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	11
5 構築された発現ベクターに関する事項	11
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7 抗生物質耐性マーカ遺伝子の安全性に関する事項	12
第 5 組換え体に関する事項	12

1	宿主との差異に関する事項.....	12
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	13
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	13
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	13
第7	遺伝子組換え添加物に関する事項.....	13
1	諸外国における認可、食用等に関する事項.....	13
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 な事項	14
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	14
<参照>		15

＜審議の経緯＞

2015 年 2 月 25 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 0225 第 1 号）、関係書類の接受

2015 年 3 月 3 日 第 551 回食品安全委員会（要請事項説明）

2015 年 3 月 20 日 第 136 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015 年 6 月 17 日 第 138 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2015 年 7 月 28 日 第 571 回食品安全委員会（報告）

＜食品安全委員会委員名簿＞

（2015 年 6 月 30 日まで）

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
上安平洸子
村田 容常

（2015 年 7 月 1 日から）

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
熊谷 進
吉田 緑
石井 克枝
堀口 逸子
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＞

澤田純一（座長）
小関良宏（座長代理）
宇理須厚雄 手島玲子
岡田由美子 中島春紫
橘田和美 飯 哲夫
児玉浩明 和久井信
近藤一成

要 約

「NZYM-RO 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」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、6- α -グルカノトランスフェラーゼを生産させるために、*Bacillus subtilis* 168 株を宿主として、*Rhodothermus obamensis* JCM 9785 株由来の改変 6- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を導入して作製した NZYM-RO 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である。本添加物は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素であり、デンプンの加工助剤として使用される。

「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及び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、「NZYM-RO 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」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：NZYM-RO 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

用 途：デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素であり、デンプンからデキストリン等の高分子糖質を製造するために使用される。

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S（デンマーク）

本添加物は、6- α -グルカノトランスフェラーゼを生産させるために、*Bacillus subtilis* 168 株を宿主として、*Rhodothermus obamensis* JCM 9785 株由来の改変 6- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を導入して作製した NZYM-RO 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である。本添加物は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素であり、デンプンの加工助剤として使用される。

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： α -グルコシルトランスフェラーゼ

基 原：*Bacillus* などの細菌及びバレイショ

有効成分：6- α -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.： EC 2.4.1.18

CAS No.： 9001-97-2

(2) 製造方法

既存添加物名簿収載品目リストには、*Bacillus* などの細菌の培養液を基原とするものがある。また、平成 24 年に評価が終了した「BR151(pUAQ2)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」における従来の添加物である *Geobacillus stearothermophilus* TRBE14 株 (TRBE14 株) を生産菌として用いて生産される 6- α -グルカノトランスフェラーゼは、培養工程、製剤化工程を経て製造されるとされている（参照 1）。

(3) 用途及び使用形態

6- 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、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素であり、デキストリン等の高分子糖質を製造するために使用されている（参照 1）。

(4) 摂取量

6- α -グルカノトランスフェラーゼは、デンプンの加工に使用されるが、最終製品の製造工程で失活し除去されるため、最終製品には残存しないとされている（参照 1）。

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* 168 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 6- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子（*BEK* 遺伝子）の供与体は *Rhodothermus obamensis* JCM 9785 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

BEK 遺伝子は、6- α -グルカノトランスフェラーゼを発現する。*BEK* 遺伝子は、生産菌におけるコドン利用率の最適化を行うために *R. obamensis* JCM 9785 株の *glgB* 遺伝子の塩基配列を改変したが、アミノ酸配列は *glgB* 遺伝子が発現する 6- α -グルカノトランスフェラーゼと変わりはない。

BEK 遺伝子は、遺伝子導入用ベクターに組み込まれた後、二重交差相同組換えにより宿主の染色体に挿入された。なお、宿主である *B. subtilis* 168 株から、アミラーゼ（*amyE*）遺伝子、アルカリプロテアーゼ（*aprE*）遺伝子、中性プロテアーゼ（*nprE*）遺伝子及びシグマ F（*spoIIAC*）遺伝子を欠失させた株（*B. subtilis* JA1343 株）に、*BEK* 遺伝子が挿入された（参照 2）。

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、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。

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く、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 3）。

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 : RoBE

有効成分 : 6- α -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. : EC 2.4.1.18

CAS No. : 9001-97-2

(2) 製造方法

RoBE は、NZYM-RO 株を生産菌として製造され、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。

生産菌は除菌ろ過により、分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

RoBE は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素であり、デンプンから分岐デキストリンを製造するために加工助剤として使用される。RoBE を用いて製造された分岐デキストリンは、通常のデキストリンと比較して溶解度が高く、冷蔵・冷凍融解時に白濁及び沈殿を生じにくいとしている。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

RoBE は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素である。

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

RoBE と TRBE14 株より生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼとは、至適温度、至適 pH 及びアミノ酸配列が異なっている。

(2) 組換え体と宿主

NZYM-RO 株と宿主との相違点は、NZYM-RO 株は *amyE*、*aprE*、*nprE* 及び *spoIIAC* 遺伝子が欠失されアミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ及びシグマ F 産性能を失っている点、並びに、*BEK* 遺伝子が導入され、6- 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* 168 株である。

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 が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、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3)。

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ことは知られていない。

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 は、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

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、毒性物質を産生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

遺伝子導入用ベクターpNBT23 BEKの作製には、プラスミドpDG268が用いられた。

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pDG268の塩基数及び塩基配列は明らかになっている(参照4)。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミドpDG268の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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pDG268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pDG268にはアンピシリン耐性遺伝子及びクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれている。なお、アンピシリン耐性遺伝子は宿主の染色体に導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後欠失され、薬剤耐性の機能が失われる。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pDG268 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 pDG268 の複製開始配列は、*E. coli* で機能する。

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

BEK 遺伝子の供与体は、*R. obamensis* JCM 9785 株である。

(2) 安全性に関する事項

R. obamensis は、50～85℃で生育する超好熱菌（最適生育温度:80℃）であり、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3）。

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

BEK 遺伝子は、*R. obamensis* JCM 9785 株の *glgB* 遺伝子の塩基配列に基づき、生産菌におけるコドンの最適化を行うために塩基配列を改変した遺伝子である。なお、*BEK* 遺伝子がコードする RoBE のアミノ酸配列と *glgB* 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は同一である。

(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

BEK 遺伝子が発現する RoBE は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成させる酵素である。

RoBE の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) 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

R. obamensis のアレルギー誘発性に関する報告はない。

2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

RoBE を有効成分とする酵素製剤及び 6- α -グルカノトランスフェラーゼについて、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

①人工胃液に対する感受性

RoBE の人工胃液中での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結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが確認された（参照 5）。

②人工腸液に対する感受性

RoBE の人工腸液中での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結果、試験開始 6 時間後においても消化されないことが確認された（参照 5）。

③加熱処理に対する感受性

RoBE 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。その結果、免疫反応性は pH6.5、65°C の加熱処理により、基質存在下及び非存在下ともに 3 時間までは変化がなく、6 時間の加熱処理で減少し、24 時間の加熱処理により、基質非存在下では加熱前の 2%、基質存在下では加熱前の 43% に減少することが確認された（参照 6）。

なお、RoBE は、分岐デキストリンの製造に用いられるが、デンプンとの反応後に除去され、最終製品には残存しないと考えられる。ELISA 法により最終製品における RoBE の残存量を測定したところ、検出限界（0.07 ppm）未満であった。

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

RoBE と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、*Aspergillus oryzae* 由来の TAKA アミラーゼと連続する 80 アミノ酸配列について 35% 以上の相同性が示された（参照 7）が、この相同領域における TAKA アミラーゼと RoBE との相同性は 28.4% であった。

また、抗原決定基の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^a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 7）。

以上のことから総合的に判断し、RoBE にはアレルギー誘発性を示唆するデータはないことを確認した。

^a The Food Allergen Research and Resource Program (FARRP) version 14

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

BEK 遺伝子のプロモーターは、*Bacillus amyloliquefaciens* WR28 株由来の *amyQ* 遺伝子のプロモーター配列に変異を導入した *amyQsc* プロモーター及び *B. thuringiensis ssp. tenebrionis* DSM5526 株由来の *cry3A* 遺伝子のプロモーターを連結させた *amyQsc/cry3A* プロモーターである（参照 8）。

(2) ターミネーターに関する事項

BEK 遺伝子のターミネーターは、*Bacillus clausii* PP159 株由来の *aprH* 遺伝子のターミネーター配列である。

(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

目的遺伝子の mRNA を安定化させるため *B. thuringiensis ssp. tenebrionis* DSM5526 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列を付加した。*cry3A* 遺伝子は殺虫活性を示すタンパク質をコードするが、*cry3A* mRNA 安定化配列にはタンパク質をコードする領域は含まれない。

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 pDG268 に、pUB110 に由来するカナマイシン耐性遺伝子を組み込み、*amyE5'* 及び *amyE3'* 配列の間に、プロモーター配列、*cry3A* mRNA 安定化配列、*BEK* 遺伝子及びターミネーター配列を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK 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

遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK 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。

(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

遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK の *amyE* 遺伝子 5' 末端側領域 (*amyE5'*) 及び *amyE* 遺伝子 3' 末端側領域 (*amyE3'*) に挟まれた領域のみが宿主の *amyE* 遺伝子座に挿入される。最終的に宿主に導入される *BEK* 遺伝子発現カセット並びに *amyE5'* 及び *amyE3'* を含む断片（合計 4,240 bp）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。その結果、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 ORF が 80 個見いだされた。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った。その結果、Asp o 21

(TAKA アミラーゼ) と 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性をもつ配列が認められた。また、既知のアレルゲンと一致する連続する 8 アミノ酸配列は見いだされなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース (参照 9) を用いて E-value<0.2 を指標として検索を行った。その結果、1 個の ORF がテトラサイクリン耐性遺伝子から発現されるタンパク質と相同性を示したが、それ自体毒性を有するものではないと考えられた (参照 10)。

- (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、遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK の *amyE5'* 及び *amyE3'* 配列に挟まれた *BEK* 遺伝子を含む領域である。

- (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

遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK は、目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主である *B. subtilis* 168 株の *amyE*、*aprE*、*nprE* 及び *spoIIAC* 遺伝子を欠失させた株に、*BEK* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK を相同組換えにより導入し、*BEK* 遺伝子の存在を PCR により確認した組換え体を PL4230-1 株とした。さらに、クロラムフェニコール耐性遺伝子を欠失させるため、カナマイシン耐性遺伝子、*amyE3* 領域、プロモーター及び *cry3A* mRNA 安定化配列を有するプラスミドを PL4230-1 株に導入して相同組換えを行った。カナマイシン感受性及びクロラムフェニコール感受性で選抜して NZYM-RO 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

遺伝子導入用ベクター pNBT23 BEK には、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子が存在するが、宿主の染色体には導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は宿主に導入された後欠失されており、NZYM-RO 株に抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しない。

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

B. subtilis NZYM-RO 株は、*amyE*、*aprE*、*nprE* 及び *spoIIAC* 遺伝子が欠失されアミラーゼ、アルカリプロテアーゼ、中性プロテアーゼ及びシグマ F 産性能を失っている点並びに *BEK* 遺伝子が導入され RoBE を産生する点で宿主

と異なる。

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

B. subtilis NZYM-RO 株に導入された DNA 断片の塩基配列及び制限酵素による切断地図は、全ゲノム解析により明らかになっている。また、挿入遺伝子が 1 コピーであり、抗生物質耐性遺伝子が存在しないことが確認されている(参照 11)。

(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

B. subtilis NZYM-RO 株に挿入された、*amyE5*、*amyE3'*及び *BEK* 遺伝子を含む領域 (4,240 bp) 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。その結果、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 ORF が 80 個見いだされた。これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った。その結果、TAKA アミラーゼと 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性をもつ配列が認められた。

また、検出された ORF と連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース (参照 9) を用いて E-value<0.2 を指標として検索を行った。その結果、テトラサイクリン耐性遺伝子から発現されるタンパク質と相同性を有する ORF が 1 個検出されたが、それ自体毒性を有するものではないと考えられた (参照 10)。

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

RoBE 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。

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

RoBE 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

RoBE は、フランスにおいて 2010 年頃から販売されており、デキストリン等

の高分子糖質製造用酵素として使用されている。米国では、米国食品医薬品庁（FDA）の届出 GRAS リストに収載されている。

2 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、RoBE には組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 12）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

RoBE は、JECFA の食品用酵素の規格値及び Food Chemical Codex の規定値を満たしている。また、製造原料は食品原料又は食品への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

4 精製方法及びその効果に関する事項

RoBE の精製は、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の工程で行われ、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

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

RoBE 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 までの事項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

「NZYM-RO 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」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. 遺伝子組換え食品等評価書 (2012) BR151(pUAQ2)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 食品安全委員会
2. *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) JA1343 株の作製方法
3. 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
4. 基本ベクター pDG268 の配列 (社内文書)
5. Artificial digestion test of Branchzyme® (RoBE) in Simulated Gastric Fluid (SGF) and Simulated Intestinal Fluid (SIF) (社内文書)
6. Residual Branchzyme® (RoBE) after heat treatment (社内文書)
7. Sequence homology of branching enzyme from Branchzyme® to allergens (社内文書)
8. Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R and Sloma A Development of Marker-free Strains of *Bacillus subtilis* Capable of Secreting High Levels of Industrial Enzymes. Ind. Microbiol. Biotechnol., 25, 204-212 (2000)
9. Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. Nucleic Acids Research, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
10. Sequence homology of ORFs in NZYM-RO in *amyE* locus to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
11. *Bacillus subtilis* NZYM-RO 株 *amyE* 遺伝子座の DNA 塩基配列 (社内文書)
12. Analysis of residual DNA in Branchzyme® (社内文書)