

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第174回) 議事録

1. 日時 平成30年4月23日(月) 14:00~17:00

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)

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

・JSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼ

・カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、小関専門委員、橘田専門委員、児玉専門委員、近藤専門委員、

鈴木専門委員、柘植専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

佐藤委員長、山添委員

(事務局)

小平事務局次長、吉岡評価第二課長、池田評価情報分析官、内海課長補佐、

森山評価専門官、山口係長、松井技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

①JSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼ

②カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統(食品)

③カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統(飼料)

6. 議事内容

○中島座長 それでは、定刻になりましたので、ただいまから第174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」に基づいて、非公開で行います。

本日は、所用により手島専門委員、樋口専門委員、岡田専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼ及びカMEMシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統の安全性についての審議です。

では、お手元の資料を確認いたします。事務局からお願いいたします。

○内海課長補佐 議事次第に基づきまして、配付資料の確認をさせていただきます。

配付資料は議事次第、座席表、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料。

机上配布資料としまして、1が「 α -アミラーゼ申請書の差し替え」。

2として「NGS解析の更新について」。

3として「改変Cry51Aa2タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性検索に係る考察」となっております。

なお、これら以外の参考資料につきましては、ファイルにと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。本ファイルについては、調査会終了後、回収させていただきます、次回また配付いたします。

不足等ございましたら事務局までお知らせ願います。

また、本日は新規品目でありますJSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼの申請者でありますダニスコジャパン株式会社及びカMEMシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統の申請者であります日本モンサント株式会社の方をお呼びしております。申請品目の審議の際に、質疑応答に応じていただくことを予定しております。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づき、必要となる専門委員の調査審議等への参加に関する事項について報告をお願いいたします。

○内海課長補佐 本日の議事に関する専門委員の調査審議等への参加に関する事項について御報告いたします。

本日の議事に関しましては、専門委員の先生方からいただきました確認書を確認したところ、平成15年10月2日委員会決定の2（1）に規定する調査審議等に参加しないこととなる事由に該当する専門委員はいらっしゃいません。

○中島座長 既に御提出いただいております確認書について、相違等はございませんでしょうか。

（「はい」と声あり）

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、新規品目であるJSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼについて審議を行いたいと思います。

では、事務局から説明をお願いいたします。

○森山評価専門官 申請書の説明に入ります前に、審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御紹介がありましたが、本日は申請者のダニスコジャパン株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書を御審議いただいた後に、申請者に対する質問事項等があれば整理いただきたいと思います。その後に説明者に入室していただき、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。水色の紙ファイルを御用意ください。申請書の6ページをお願いします。

第1としまして「従来の添加物の性質及び用途に関する資料」です。

「(1) 名称、基原及び有効成分」ですが、名称は α -アミラーゼで、第9版食品添加物公定書にも記載があり、成分規格が設定されているものとなっています。

「(2) 製造方法」ですが、右側に図1としてフローが書かれてありますけれども、酵素製品の生産に合わせ、低温保管している生産菌株のフラスコ培養等を行い、発酵法で酵素を生成させる。除菌ろ過によって培養液から酵素を回収し、除菌ろ過で回収した酵素溶液を、限外ろ過で濃縮し、保存料や安定化剤を添加し、最終的に製品容器に充填し、液体製剤品として出荷するとしてあります。

「(3) 用途及び使用形態」ですが、この α -アミラーゼは、デンプン等の α -1,4-グルコシド結合を加水分解するものとなっています。

この用途としましては、ビールの製造工程において、 α -アミラーゼが麦芽及びデンプン質副材料の持つ不溶性のデンプンであるアミロース及びアミロペクチンを、発酵工程で酵母が資化できる形の糖類へ分解する。

また、シロップの製造工程においても同様に、原料のデンプンを分解する液化酵素として知られています。

次のページの「(4) 摂取量」で、机上配付資料1で差し替えをさせていただいております。

まず、ビールの方ですが、厚労省の28年国民健康・栄養調査報告により、二十歳以上のビールの平均消費量は、1日1人74.6gということで計算がされています。

もともとの申請要旨では、設定している最大配合比が原料当たりの形にされて、最終的に計算が原料当たりの形になっていたのですが、ビールとしての計算に改めていただきまして、真ん中ら辺になりますが、国民平均体重55.1kgを用いて、SLAP-Qの摂取量を求めたところ、もともとの申請用紙では0.04となっていたのを修正いただき、0.0069mg TOS/kg 体重/日となっております。

シロップ製造においても同様に調べたところ、シロップの数値は変わっておりません。9ページになりますが、0.010mg TOSということで、ビールとシロップを合算すると、0.017

mg TOS/kg 体重/日になっております。

「2 宿主及び導入DNA」ですが、(1)の宿主の種名、株名等については、*Bacillus*属の*licheniformis* BRA7株となっており、広く自然界に認められております。

「(2) DNA供与体の種名、株名又は系統名等及び由来」ですが、今回、*SLAP-Q*遺伝子の開発に用いた α -アミラーゼ遺伝子は、野性株である*Geobacillus stearothermophilus* ASP-154株由来となっております。

後ほど述べますが、そのほかの導入DNAの供与体は、いずれも宿主である*B. licheniformis*の株となっております。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」は、10~11ページに詳細が書かれてはいますが、53ページに作製の概要が書かれてありますので、そちらを先に説明させていただきます。

53ページの図12になりますが、*B. licheniformis* BRA7株を宿主とし、ステップ1~5にあるように、5つの遺伝子の欠失を行っております。そして、できた中間株としてBML780があります。

52ページの同じところに四角で囲まれた文書がありますが、途中ででき上がっている中間株であるBML780は、2017年5月に承認を既にされています、エキソマルトテトラオヒドロラーゼの生産菌の途中株にもなっております。そのため、基本的なプロセスとしては、中間株までは同じという扱いになります。

その後、エキソマルトテトラオヒドロラーゼの場合は、*catH*遺伝子にエキソマルトテトラオヒドロラーゼに関する遺伝子を挿入しておりますが、今回の α -アミラーゼは、中間株の後、*catH*遺伝子に*SLAP-Q*を入れ込み、ステップ2のところで、*catH*遺伝子を欠失しているのですが、最終的に*SLAP-Q*を入れ込むときに、*catH*遺伝子を復活させて、クロラムフェニコール耐性の形としています。

そして、ステップ10のところになりますが、クロラムフェニコールの選択圧を上昇させ、セクションをし、今回の菌株であるJSF-07-170-3株を作製したというのが大まかな概要となっております。

詳細を進めていきたいと思うので、10~11ページに戻っていただければと思います。

左側の表1には、挿入DNA断片の情報がありますが、11ページのほうから説明させていただきます。

図2にありますように、*SLAP-Q*遺伝子発現カセットを含む上記構成のDNA断片を、宿主である*B. licheniformis* BRA7株を改変して作製した、先ほどの中間株であるBML780株染色体上の欠失された*catH*座へ相同組換えにより導入しております。

参照6に図がわかりやすく書いてあるのですが、相同組換えをした後、●●●除かれ、図2にあるカセットのみが導入されております。

ここで、今回の*SLAP-Q*の開発に当たり、耐熱性が向上する α -アミラーゼを開発するため、中等度好熱菌である*G. stearothermophilus*株を遺伝子の供与体として用いております。

さらに、野生型 α -アミラーゼ遺伝子の●●●することで、耐熱性を向上させた。

また、C末端側の29アミノ酸を欠失することで、 α -アミラーゼの生産効率を高めたものとなっております。

しかしながら、酵素反応を行うアミノ酸残基である触媒サイトは変更しておらず、従来と同様、 α -1,4-グルコシド結合を加水分解し、低分子化する機能を有しております。

10ページの表1では挿入DNA断片の情報、13ページには欠失した遺伝子が書かれてあります。文書のところにもありますが、今回使っているものは、SLAP-Qに係るもの以外は、宿主であるBRA7株由来の遺伝子を使用しております。そのため、13ページの2パラ目にある、中間株と最終的なものに導入された欠失変異と、選択マーカーである*catH*遺伝子及びそのプロモーターとターミネーターの導入は、14ページでセルフクローニングに該当すると考えられるとしております。

14ページの「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」「4 宿主の構成成分等に関する資料」については、記載のとおりとなっております。

「5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」として、(1)の製品名ですが、日本での製品名は未定で、他国で使用している下記の中から選ぶ予定とのことです。

「(2) 製造方法」ですが、SLAP-Qを含む酵素製剤は、基本的に従来のもと同様となっております。

4パラグラフのところですが、ろ過助剤を用いた除菌ろ過で分離し、さらにクロスフロー膜にて清澄ろ過をする。この工程で生産菌株が完全に除去されるとされております。

このようにして得られた原体を、酵素比活性をもとに規格に合わせ濃度調整をし、最終的に液体製剤の製品を得るとされております。

「(3) 用途及び使用形態」になりますが、今回のものは従来品と比べて、特に近年ではとりわけビールの副原料としても使用される、キャッサバデンプンの液化に有効なものとされております。

16ページになりますが、同じくビールの原料の一部として麦芽以外の副原料を使用する際、副原料自体に十分な量の α -アミラーゼが含まれないため、副原料の液化工程でこのSLAP-Qを添加し、85℃で45分間反応することで液化することができる。

煮沸工程は、100℃で45～90分間で、この工程においてSLAP-Qは失活するとされております。

同様に、シロップの製造においては、SLAP-Qを添加した後、90～95℃で2時間加熱することで液化する。その後、130～140℃まで昇温またはpHを4.0～4.5にすることで、SLAP-Qを失活させることができるとされております。

「(4) 有効成分の性質及び従来品の添加物との比較」は繰り返しになりますが、有効成分はSLAP-Qで、従来品と比べ、キャッサバデンプンの液化に特に有用なものとされています。

また、既知の α -アミラーゼと比較し、耐熱性は向上しているものの、触媒サイトはその

まま保持されています。後ほど説明しますが、38ページにその図が記載されております。

「6 (1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物」になりますが、今回のSLAP-Qでは、野生型の *G. stearothermophilus* が生産する α -アミラーゼの●●●し、酵素のC末端側の29アミノ酸に相当する87塩基が欠失するように、終止コドンを導入しているものとなっています。

よって、酵素の耐熱性の改良により、特にキャッサバデンプンの液化効果が改善されているとされております。

17ページに図3としまして、実際にキャッサバデンプンの液化効果を実験したデータが記載されております。

●●●一時的に溶液の粘度が上がり始めますけれども、さらに昇温されると α -アミラーゼの活性として効果的に作用し、デンプンの液化を進めることを確認できたということにされております。

17ページの下の方の文章になりますが、酵素の耐熱性を評価するため、加熱後に残存している α -アミラーゼの活性を、SLAP-Qと従来品で比較したものが示されております。

18ページの図4になりますが、ビールの製造用途を想定し、麦芽抽出液の使用試験区と同じpHに調整した酢酸緩衝液の使用試験区をブランクとして試験を行いました。

100°Cに保った溶液に●●●分間浸漬した各サンプルの α -アミラーゼ活性を吸光度法で測定し、●●●保温時の酵素活性に対する残存活性の比率を算出したところ、グラフにありますように、麦芽抽出液使用試験区において、15分と30分加熱後のSLAP-Qの残存活性がそれぞれ●●●であったのに対し、野生型 α -アミラーゼは●●●でありました。このように、SLAP-Qの耐熱性が改善されたことが示されております。

麦芽抽出液の使用試験区は、実際のビールの製造工程を想定しているものになるので、良好な耐熱性能を有していると考えられております。

次に、19ページの「(2) 組換え体と宿主」になります。

今回のJSF-07-170-3株は、宿主である *B. licheniformis* BRA7株と比較し、SLAP-Qの産生能を獲得し、ここにあります4つの遺伝子に関する機能を欠失している点となっております。

「第2 宿主に関する事項」ですが、「1 分類学上の位置づけ」としては、宿主は *B. licheniformis* BRA7株となっております。

2は省略させていただきます。

20ページの「3 寄生性及び定着性に関する事項」「4 病原性の外来因子」「5 宿主の近縁株」に関しても、記載のとおりなので省略いたします。

「第3 ベクターに関する事項」ですが、ベクターは宿主の改良のために用いる欠失用ベクター●●●種類と、導入用ベクター●●●種類の合計●●●種類ということですがけれども、もともっているものは、ここにある欠失用のベクターが●●●、SLAP-Q遺伝子導入のベクターのもととなったのは、1種のベクターとして「pICatH」と記載されてお

ます。いずれも、エキソマルトテトラオヒドロラーゼのときと同じベクターを用いておりますので、説明は省略させていただきます。

24ページの「2 性質に関する事項」ですが、「(1) DNAの塩基数及びその塩基配列を示す事項」としまして、繰り返しになりますが、欠失用ベクターの作製に用いた●●●及びSLAP-Q遺伝子導入用ベクターの作製に用いたpICatHは、エキソマルトテトラオヒドロラーゼのときと同じものになり、それぞれ塩基数などが明らかにされております。

25ページの「(2) 制限酵素による切断地図に関する事項」「(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項」についても記載のとおりとなっております。

「(4) 薬剤耐性に関する事項」の3パラになりますが、SLAP-Q遺伝子導入用ベクターの作製に用いたpICatHは、*B. licheniformis* BRA7株宿主である、この株由来のクロラムフェニコール耐性遺伝子及びプラスミド上のネオマイシン耐性遺伝子を持つが、これらの有害性は報告されていないと記載がされております。

次の(5) (6)についても、記載のとおりとなっております。

26ページの「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」です。

「1 挿入DNAの供与体に関する事項」ですが、欠失型遺伝子の供与体については記載のとおりです。

SLAP-Q遺伝子の供与体については、繰り返しになりますが、*G. stearothermophilus* ASP-154株由来の α -アミラーゼ遺伝子を改変して得られたものとなっております。

続きまして、27ページの「(2) 安全性に関する事項」です。

SLAP-Q遺伝子の供与体についてですが、ここに記載のとおり、*G. stearothermophilus* は、日本においてGILSP遺伝子組換え微生物として告示されております。

また、下のほうになるのですが、遺伝子発現カセットは、*catH*プロモーターと*catH*ターミネーターを含め、全て宿主*B. licheniformis* BRA7株が供与体となっております。

また、SLAP-Q発現カセットと*catH*遺伝子発現カセットを含むDNA断片の両端には、同じく宿主であるBRA7株を供与体とする●●●領域を連結して用いられております。これが相同組換えに使われているところになります。

28ページの「2 挿入DNA又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項」としまして、「(1) 挿入遺伝子のクローニング」の方法ですが、欠失型遺伝子については、記載のとおりとなっておりますので説明は省略させていただきます。

29ページに「SLAP-Q遺伝子の合成方法の経緯」が記載されております。

G. stearothermophilus ASP-154株に由来する α -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、酵素の多型の抑制と酵素の耐熱性を向上する目的で、塩基配列の改変が検討されました。

なお、この最終的なSLAP-Q遺伝子を得る過程で、●●●変異を加え、酵素の特性を検討していますが、目的とするキャッサバ等トウモロコシ以外のデンプンに対する液化性能

が不十分であったことから、再度これらを復元し、その後の検討を継続したものとなっております。

そして、その後の検討としまして、繰り返しになりますが、まず1つ目として、C末端側の29アミノ酸を欠失し、酵素の生産性を向上させています。

次に、発現する酵素の●●●することで、耐熱性を向上させております。

また、*B. licheniformis* BRA7株に由来する α -アミラーゼの分泌シグナルペプチドが附加されております。以下として詳細は書かれていますが、中身は省略させていただきます。

最終的には34ページになりますが、Ethyl4アミラーゼはC末端を欠失したものになりますが、その●●●を部位特異的変異導入を用いて、●●●変異体をコードする遺伝子を作製したとしております。そこで、●●●に変換されるPCR増幅で行ったとして、●●●に変換されております。

真ん中ら辺になりますが、この開発を進めるに当たり、最終的に●●● α -アミラーゼ遺伝子をSLAP-Q遺伝子、この遺伝子がコードする α -アミラーゼをSLAP-Qと命名したと記載されております。

35ページになりますが、マーカー遺伝子のことが記載されております。

マーカー遺伝子として、*B. licheniformis* BRA7株由来の*catH*遺伝子を、*B. licheniformis* のBML780株の染色体へ相同組換えにより導入をしております。

「(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」になりますが、欠失型遺伝子については、エキソマルトテトラオヒドロラーゼと同じになりますので、詳細は省きます。

SLAP-Q遺伝子については、ここに記載がありますが、塩基配列等については明らかになっており、代表的な制限酵素が次のページの表3として示されております。

36ページの「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」になります。

今回のJSF-07-170-3株の染色体に組み込まれたSLAP-Q遺伝子発現カセットにより、耐熱性が改善された α -アミラーゼであるSLAP-Qが生産されております。また、このカセットとともに、*catH*遺伝子の発現カセットにより、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼが生産され、SLAP-Q生産菌の選択が可能になっております。

しかし、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼのアミノ酸配列には、変異を導入する改変を行っていないため、宿主*B. licheniformis* BRA7株が生産するものと同じ安全性を有しているものとなっております。

37ページの3パラ目になりますが、プロテアーゼ生産能と孢子形成能の欠失は、この菌株の自然環境中における共存・増殖能力を低下させるためのものとされております。

また、繰り返しになりますが、SLAP-Q遺伝子発現カセットの導入以外の菌株の改変については、宿主であるBRA7株由来のものであり、セルフクローニングに該当すると考えられると記載されております。

アミノ酸配列が、次のページの図8に示されています。先ほど、触媒サイトが同じとい

う文章がありましたが、触媒サイトが●●●記載されていますけれども、触媒サイトは同じで、相同性は●●●となっております。

38～39ページになりますが、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性については、検索をしたところ、特にキーワードにひっかかるものはありませんでした。

「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」としまして、人工胃液及び人工腸液処理の結果が書かれております。

まず、人工胃液の場合、次のページに図が書かれてありますが、SLAP-QのバンドはSDS-PAGE及びウェスタンブロットング分析において、0.5分以内に消失することが確認されています。

SDS-PAGEの分析では、SLAP-Qの54kDaのバンドが消失し、3kDa付近のバンドがあらわれておりますが、処理30分後には消失されております。

次に、パンクレアチン処理における図が41ページの図10に記載がありますが、これについては、SLAP-Qのバンドは360分間のパンクレアチン処理により、SDS-PAGEでもウェスタンブロットング分析でも消失しないことが確認されております。

なお、このSIF処理により、98kD付近のバンドが両方で見られておりますが、これはSLAP-Qが二量体を形成している可能性が考えられたと記載されております。

42ページで、加熱処理による免疫反応性の変化を、ELISA法によって評価したものが書かれております。実際のビールの醸造工程を想定し、麦汁中の煮沸処理100℃により、30分間の加熱でSLAP-Qの免疫反応性が失われていることが確認されています。

よって、ビールの製造工程における通常の煮沸工程（45～90分間）において、SLAP-Qは免疫反応性を消失すると考えられています。

次に「遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲンとの構造相同性」ですが、挿入されたSLAP-Q遺伝子発現カセットとその近傍配列において、6つの読み枠においてORFを検索したところ、右のページの表5にありますように、30個のORFが検出されております。

これをAllergen Onlineで検索したところ、検索1として、連続する80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン、検索2として、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の数を確認したところ、検索1として、TAKAアミラーゼが37.5%の相同性で確認されました。

検索2では、一致するものは認められておりません。

44ページに記載がありますように、今回、唯一検出されたTAKAアミラーゼは、産業上広く使われており、食品アレルゲンとはされております。

既知の有害タンパク質との相同性についても、BLASTPアルゴリズムを用いて検索をしたところ、該当するものは見出されております。

45ページになりますが、遺伝子産物のアレルギー誘発性について、SLAP-Qはアメリカで使われていますが、懸念になるような事象は報告されていません。

また、最終食品における推定残存量等についてということで、次に記載されております

が、先ほどビールを想定した煮沸温度でのSLAP-Qが失活することは実験で確認されております。

シロップについては、同じものではありませんが、類似の α -アミラーゼによって、3社のシロップ製造業者において、精製工程による酵素の除去効果を確認した結果として、次のページの表8に記載がされております。

類似の α -アミラーゼを用いたシロップで確認したところ、最終的に生成されたシロップに α -アミラーゼは検出されていないことが確認されております。

46ページの3の(1)のプロモーター、(2)のターミネーターについては記載のとおりです。

(3)としまして、*SLAP-Q*遺伝子発現にかかわるものとして、BRA7株に由来するLAT分泌シグナルペプチド配列を、*SLAP-Q*遺伝子と結合させて発現させていると記載されております。

「4 ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」ですが、欠失ベクターのところは省略させていただきます。

48ページの真ん中ら辺になりますが、遺伝子導入用ベクターへの組み込み方法としましては、*SLAP-Q*遺伝子を制限酵素で切断し、●●●結合させ、今回の遺伝子導入用ベクター-pICatH-Ethyl4-●●●を構築しております。

「5 構築されたベクターに関する事項」としましては、ここに記載のあるとおりです。

50ページの「(3)ベクター上の意図する挿入領域に関する事項」ですが、2つ目の「*SLAP-Q*遺伝子導入用ベクターについて」に記載がありますけれども、今回の*SLAP-Q*遺伝子導入用ベクター上の意図する領域は、*SLAP-Q*生産能と改変型菌株を選択するために用いるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの生産能を回復させるDNA断片であるとして、●●●もあわせた構成が、次のページの表9に記載されております。

(4)の発現ベクターについては記載のとおりです。

51ページの「6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」としまして、*SLAP-Q*遺伝子の導入用ベクターを宿主である*B. licheniformis* BRA7株の改良株である、中間株として説明させていただきましたBML780株に、プロトプラスト形質転換法により導入し、目的の*SLAP-Q*遺伝子発現カセットを、欠失した*catH*座の5'フランキング領域に相同組換えで導入されております。

以下の詳細の説明は省かせていただきます。

54ページですが、コピー数の推定のために、ゲノム領域200bpについて増幅されたリード数を算出し、これを100bpずつスライドしながら範囲を広げて解析したということで、図13に図が記載されております。

次世代シーケンサーとして使っているものは、54ページの下の方に小さく書かれてありますが、●●●と記載されております。

その結果、リード数がほかのゲノム領域に対して平均で●●●になっていたことから、

●●●コピー含まれていると推定したとの記載がされております。

「7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」ですが、「(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項」は、今回の菌株の染色体に挿入されているDNA断片には、*catH*遺伝子が含まれている。これはマーカー遺伝子として使用したのとなっておりま

す。55ページの(2)のところになりますが、*SLAP-Q*遺伝子導入用ベクターには、ネオマイシンの耐性遺伝子が存在しておりますが、●●●により、本遺伝子は生産菌であるJSF-07-170-3株には存在していません。

「第5 組換え体に関する事項」としまして、「1 宿主との差異に関する事項」は記載のとおりです。

下のほうにあります。今回の菌株に遺伝子導入用ベクターの配列が存在しないことの確認としまして、pICatH由来の配列を検出するプライマーとして●●●を用いたPCRを行ったとしてありますが、その結果自体は次のページの図14に記載されております。

使っているプライマーの配列なのですが、49ページに導入用ベクターの構造があります。ここの円の●●●という記載があつて、その●●●と記載があり、この間が●●●ぐらいになっています。このプライマーを用いてPCRを行った結果、56ページの図14にある電気泳動の図になりますが、本菌はレーン3でバンドが検出されておらず、ベクターは適切に除去されていると判断されております。

56ページの「2 遺伝子導入に関する事項」として、「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」についてですが、57ページの図15として、今回の本菌株の染色体に*SLAP-Q*遺伝子の発現カセットが適切に導入されていることをPCRで確認しております。ここで用いられているプライマーが、文章では●●●と記載されております。

同じく、先ほどの49ページの図11の遺伝子導入用ベクターで、左上の●●●がありまして、そこから●●●ところに●●●という記載がされております。

この間で●●●ぐらいかと思われそうですが、そのプライマーでPCRを行ったところ、電気泳動でいうと、本菌株はレーンの5番目を示しています。レーンの5番目にバンドが適切に検出されており、遺伝子発現カセットが*catH*遺伝子座に導入されていることが確認されたとしております。

57ページの「(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」は、先ほど述べたものと同じになりますので省略します。

また、欠失型遺伝子のオープンリーディングフレームについても記載されていますが、エキソマルトテトラオヒドロラーゼで既に審査されているものになりますので、ここは説明を省きます。

60～61ページをお願いします。

「第6 組換え体以外の製造原料及び製造機材に関する事項」ですが、1、2については記載のとおりとなっております。

61ページのほうは、机上配付の資料1として差しかえさせていただきます。

違う箇所としては、「第7 遺伝子組換え添加物に関する事項」として、諸外国における認可状況で、もともとは●●●という記載があったのですが、●●●ということでしたので、この表13から●●●が削除されております。

62ページの「2 組換え体の残存に関する事項」としまして、生産菌が残存していないことの確認を一般規格に照らし、確認試験を行い、生産菌が検出されないことを確認しております。

また、*catH*遺伝子の全長を鋳型としてPCRを行い、電気泳動の図が次のページの図16に記載されておりますが、残存していないことが確認されております。

64～65ページの「4 精製方法及びその効果に関する事項」ですが、SLAP-Qは除菌ろ過により精製されていること。

次のページの表14に、3つのロットのデータが書かれてあります。一番下の列がAAU (α -アミラーゼ活性単位)を示すものになりますが、活性があることが確認されております。

66ページの図17としまして、純度を評価した電気泳動の図が記載されております。

SLAP-Qの純度は、54kDa付近のバンドのみで●●●、二量体と考えられる100kDa付近のバンドを含めると●●●ということ、生産菌及び不純物を効果的に除去していると考えられております。

第8としまして、基本的に十分に安全であると考えられてはおりますが、OECDに基づき、急性毒性試験及びラットでの90日間の経口投与毒性試験について、参考として記載されております。いずれにおいても、特に異常は認められなかったという考察がされております。

説明は以上になります。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、先生方から御意見をいただきたいと思っております。

少々長いので、まず6～26ページの安全性評価に関する遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違、宿主に関する事項、ベクターに関する事項のところまでで何かございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 17ページのところに、酵素反応の従来品との比較のような図3があるのですが、基質はキャッサバデンプンでして、質問としては2つあるのですが、この従来品の α -アミラーゼの青線のGSというものは、今回、遺伝子組換えで用いている遺伝子のもとになったものかどうかがはっきりわからなかったもので、そこをお伺いしたい。

それから、これはキャッサバデンプンでタピオカなので、難消化性デンプンの類いに入るものだと思うのですが、今回使ったSLAP-Qは粘度が上がっていつてすと落ちてしまうので、従来品と全然違う挙動を示してしまっていて、単純に考えると、恐らく最終的にでき上がってくる限界デキストリンの大きさが非常に小さいのだろうと想像したのです。多分、酵素活性としては変わらないのだと思うのですが、なぜそういう違いが出るのかがもしかかっていればお伺いしたいということと、キャッサバデンプンで難消化性デンプンだと、 α -1,4と α -1,6結合以外に、ブリッジみたいな他の分岐鎖となる結合がある

ようでして、そういったものを分解しているのか、していないのかがもしわかっていればお伺いしたい。

○中島座長 ありがとうございます。

酵素反応についてのことで、まずはこの青線のものが今回のGSの供与体のものであるかどうか。

それから、従来、難消化性であるはずのキャッサバを基質にしたときに、従来品と大きな違いの主な理由は何か。これは申請者が来ておりますので、直接質問していただけますでしょうか。ありがとうございます。

ほかにございますでしょうか。

それでは、申請書26～55ページの挿入DNA、遺伝子産物、発現ベクターの構築に関するところで何かございますでしょうか。

51ページでは、発現カセットの長さは●●●とあるのですけれども、54ページを見ますと、どれだけ繰り返しているのかの図がわかりにくいのですが、繰り返しの領域は大体●●●くらい繰り返されているようにも見えます。

51ページの図を見ますと、繰り返すべき領域としては、最初の●●●ではないかと思うのですけれども、その辺の書き方が非常にわかりにくくなっていて、実際のところはどうなっているのかを知りたい。

あとは、●●●倍はかれこれそんなものだと思うのですけれども、この精度はどのくらいか。つまり、これがきちんとタンDEMリピートになっているのかどうか。その辺のところが少々気になるので、私としては聞いてみたいと思いますが、いかがでしょうか。

鈴木先生あたりも多分、この辺は気になられたのではないかと思いますけれども、どうですか。

○鈴木専門委員 技術的にはよくわからないのですけれども、なぜリアルタイムPCRをしたのかは気になりました。

○中島座長 申請者に直接聞くのが早いですね。ありがとうございます。

ほかに先生方、ございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 図13のところですが、次世代シーケンサーだと思うので毎度のことですが、これは質問とかではなくて、後で記入してもらえばいいのですが、資料を読むと、冗長度は●●●なのですから、少し冗長度を書いていただいて、その上でこのコピー数のところは、ほかの平均的なゲノムの領域に対して●●●になっていたという形で書いていただければと思います。

○中島座長 私もその辺の書き方が非常に曖昧で、何か言いたいのがよくわからないので、そのようにわかりやすく書いていただきたいものですね。

ほかにございますか。

では、申請書の55ページから最後までのところ何かございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 これは途中まではエキソマルトテトラオヒドロラーゼでほとんど同じで、

最後のところだけカセットに違うものを入れたという形になっているので、先行品の書きぶりと合わせてもらえばいいと思うのです。だから、前者が書いていなければそれでいいのですけれども、最終的にSLAP-Q遺伝子を入れて、●●●しているということは、申請書にもうちょっとわかりやすく書いてほしい。その部分に関してはものすごくそっけなく書いてあるのです。そこは一番大事な部分でもありますので、もうちょっと書いていただいたほうがよろしいと思ったのですが、先行品があったということで、先行品がそっけないですと言われたらそれまでですので、それに合わせていただければと思います。

○中島座長 実は私も同じようなことを思っていましたので、この文章を読んで、実際にどうなっているのかを把握するのに結構手間暇かかりました。これが染色体にちゃんと組み込まれていて、クロラムフェニコール濃度を上げて増幅させて、最終的な結果、このような形でどう増幅していたとか、その辺のところはわかりにくいので、直接安全性がどうこうなどという問題ではないと思うのですけれども、あまり親切な書き方ではないですね。

先生方、ほかにございますでしょうか。

これはものとしては単純なので、議論の対象としては割と限られております。

それでは、申請者に質問したいと思いますが、17ページの酵素反応と従来品との差について、キャッサバの難消化性については、児玉先生から直接お聞きになってください。

発現カセットの図13に関するところでデプスの書き方。それから、発現カセットは●●●●だけでも、繰り返しは●●●●に見えていて、その辺のところは実際はどうなっているのかについては、私から聞きたいと思います。

エキソマルトは、直接聞くかどうかはまたそのときでよろしいかと思えます。

そのくらいだと思うのですが、よろしいでしょうか。

それでは、申請者を呼んでいただけますでしょうか。

申請者の準備ができるまで、少々休憩にいたします。

(休 憩)

○中島座長 お忙しいところお越しいただきまして、ありがとうございます。

それでは、自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

○説明者 ダニスコジャパンの笠井と申します。

○説明者 ダニスコ株式会社の親会社に当たります、デュポン株式会社の河原と申します。よろしくをお願いいたします。

○中島座長 それでは、質疑応答に入ります。

17ページ、図3のところは児玉先生から直接お願いします。

○児玉専門委員 申請書の17ページの図3ですけれども、質問は2つありまして、1つは青色のところは従来の α -アミラーゼ、従来品で今回の遺伝子供与体と同じG

*stearotheromophilus*のデータが載っているのですけれども、これは今回の遺伝子組換えに用いた遺伝子と基本的にもとになった遺伝子になるのだと思うのですが、それに相当するものなのか、それともそこは*G. stearotheromophilus*の全然違うアミラーゼなのか、その点がまず1点。

もう1つは、タピオカデンプンなので難消化性デンプンで、難消化性デンプンというのは通常のデンプンだと α -1,4と1,6結合が主体ですけれども、それ以外にもブリッジ的に結合が入ることで難消化性になるのですが、このデータを見るとほぼ分解していますよね。一旦粘度が上がって、粘度が上がるのはほぐれて結果としてより粘度が上がること、その後、粘度が下がるということは非常に小さい単位に分解されるということを反映しているのだと思うのですけれども、もしそうだとすると、従来品と比べて限界デキストリンと呼ばれる部分の大きさが全然違うのではないかと思うのですが、そこら辺の酵素反応的な特徴的なものについて、何か情報をお持ちであれば教えていただきたいと思います。

○説明者 まず1点目なのですけれども、これは●●●の*G. stearotheromophilus*だと言われているものとの比較ですので、基本的に同じ*B. thermophilus*なのですけれども、供与体の菌株ではございません。

○児玉専門委員 遺伝子として違う。

○説明者 そうです。そう思われます。遺伝子の解析情報を私は見たことないので、恐らくちょっと違うのかなと思います。

2番目の点ですけれども、反応の様子を17ページの図3に沿って改めて御紹介したいと思うのですが、まず今、先生がおっしゃってくださったように、●●●、この場合、私が今まで見てきた範囲ですと1,4結合が起きる α -アミラーゼの働きということで、その効果でこのようになると説明を聞いておまして、1,6のほうは作用しているということではないと思っております。

デキストリンの大きさは、最終的にどういう分布になっているかというところまでのデータは見ていないのですけれども、このデータから見ますとかなり分解して、小さい単位になっていると理解しております。

○児玉専門委員 そうすると、●●●ですよね。

○説明者 多分、●●●とデータを理解しております。

○児玉専門委員 そうすると、結局これはずっと温度を上げて、昇温しているので後半では熱で失活してしまうので、酵素活性が働かないので糊化の状態にいるということで、もしそれぞれの緑なら緑の最適温度、青なら青の最適温度にすれば、やがては上がって下がるということなのですか。

○説明者 タピオカの糊化の温度と両方のファクターを振ってみたら、結果的に先生がおっしゃってくださったようになるか、それともタピオカの水溶液、糊化した液が上がり切らないとちゃんと全部分解されないのか、そこのところはここから読み取れないので、先生がおっしゃっている現象もあり得るのかなと考えております。

○児玉専門委員 社内的には1,4しか切らないということは確認しているということですか。

○説明者 はい。

○児玉専門委員 わかりました。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、51～54ページにかけて、これは発現カセット、温度感受性の複製開始点を持つプラスミドに入れておいて、それで導入して染色体上に組み換えて、これからクロラムフェニコールの濃度を上げて増幅度をふやしてということだと思うのですが、それを読み取るのにこの文章は非常に不親切な書き方で、これがなかなか読み取れなくて、もう少し何をやって、何が起きているのかがわかるように書いていただきたいです。

51ページに発現カセットの長さ●●●であるとあります。ですけれども、54ページで配列上の位置でコピー数の推定のこのデータも少々見にくいのですが、これですと●●●くらい増幅しているように見えるのですけれども、実際のところだから増幅している範囲というのはどのようなものなののでしょうか。普通に考えれば、表9の51ページのところを見てみますと、●●●が増幅していると考えるのが普通だと思うのですが、そのようには少なくとも申請書には書いていないので、増幅領域がどのようなものなのか。

それから、図13を見てみますと次世代シーケンサーはこのくらいの精度なのかなと思うのですけれども、これがぴたっとなっておりませんので、本当にタンデムリピートできちんと増幅しているのかどうか、その辺についてコメントをお願いしたいのですが。

○説明者 御指摘ありがとうございます。

まず増幅された領域の表現が非常にわかりにくくて失礼いたしました。先生おっしゃったように、実際に増幅された領域は●●●ですと、51ページで言います●●●フランキング領域を除いた領域です。具体的には*catH*のプロモーター配列から始まりまして、*LAT*ターミネーター配列までのおよそ●●●が増幅されております。

2点目、タンデムに入ったのかということに関しまして、次世代シーケンサーで生データを扱っているときに、既知の*B. licheniformis*の配列に対して合わせてマッピングをしております。ですので結論としましては、既知の野生型配列に対してこのコピーが1カ所に●●●、タンデムに入ったということを確認しておりますので、タンデムに入っているというのが回答になります。

○中島座長 ありがとうございます。そういうことがわかりやすくこの申請書に書いてあれば、こちらも質問しなくて済んだというのと、●●●は十分なのですが、それもわかりやすく書いておいていただければ、この申請書の信頼度は上がっていたかなと考えるわけです。

ほかに先生方ございますでしょうか。

ありがとうございました。これで終わります。

(説明者退室)

○中島座長 それでは、審議に戻ります。

ただいまの回答を踏まえた上で御意見、コメント等がありましたらお願いしたいのですが。

ないようですので、書き方の問題は多少ともかく、このような微生物で酵素をつくらせるような場合は、コピー数とかそういうことについては、細かいことまでは問うておりませんので、その点は問題ないかと思えます。

また、今回のアミラーゼについては人工胃液ではすぐに溶けて、人工腸液では溶けないようですけれども、加熱による失活も確認しておりまして、アレルゲン検索もヒットがない。また、念のため急性毒性試験、亜急性毒性試験などもやって万全を期しておるように思いますので、私としては安全性については問題ないと考えてのですが、先生方いかがでしょうか。ありがとうございます。それでは、本件については安全上、問題がないということですので、評価書案の審議に入りたいと思います。説明をお願いします。

○森山評価専門官 評価書案の説明に入ります。評価書を束ねた冊子の6ページ目をお願いします。

「Ⅰ．評価対象添加物の概要」ですが、品目はJSF-07-170-3株を利用して生産された α -アミラーゼ。用途はビール及びシロップの製造時の液化効率の向上となっております。

本添加物は*Bacillus licheniformis* BRA7株を宿主とし*Geobacillus stearothermophilus* 由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子を導入して作成したJSF-07-17-03株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、デンプンの α -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、耐熱性が付与されていることから、ビール及びシロップ製造時の液化効率の向上を目的として使用されております。

「Ⅱ．食品健康影響評価」としまして第1「1.従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」ですが、(1) 名称、基原及び有効成分は記載のとおりです。

(2) 製造方法、 α -アミラーゼは、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除去されるとしております。

(3) 用途及び使用形態ですが、 α -アミラーゼは、デンプン等の α -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及びシロップの製造においてデンプンを分解する液化酵素として使用されております。

(4) 摂取量については記載のとおりです。

7ページ目「2.宿主及び導入DNA」、(1) 宿主の種名については、宿主は*Bacillus licheniformis* BRA7株である。また、土壌等自然界に広く認められております。

(2) DNA供与体の種名ですが、 α -アミラーゼ (*SLAP-Q*) 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* ASP-154株である。

(3) 挿入DNAの性質の及び導入方法ですが、*SLAP-Q*遺伝子は、野生型 α -アミラーゼのC末端側29アミノ酸領域を欠失し、また、1アミノ酸を置換することにより耐熱性が向上した α -アミラーゼ (*SLAP-Q*) をコードする。*SLAP-Q*遺伝子発現カセットをクロラムフ

ェニコールアセチルトランスフェラーゼ (*catH*) 遺伝子発現カセットとともに、相同組換えにより宿主ゲノムの*catH*遺伝子座に導入した。

なお、生産菌の作製に当たり、 α -アミラーゼ遺伝子、*catH*遺伝子、芽胞形成遺伝子、アルカリプロテアーゼ遺伝子及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ遺伝子を、それぞれの欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失をさせている。

「3.宿主の添加物製造への利用経験または食経験に関する資料」については記載のとおりです。

「4.宿主の構成成分等に関する資料」についても記載のとおりになっております。

「5.遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」ですが、(1) 製品名及び有効成分として、今回、製品名は未定ということで、以下、便宜的にSLAP-Qとすると記載しております。

8ページ (2) 製造方法ですが、SLAP-Qは従来の添加物と同様、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造され、除菌ろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態も記載のとおりです。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較ですが、今回のSLAP-Qは従来と比較し同じ α -アミラーゼであるが、従来と比較すると耐熱性が向上し、特にキャッサバデンプンの液化効果が改善されている。

6. (1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点ですが、SLAP-Qと従来の添加物との相違点は、SLAP-Qが野生型 α -アミラーゼのC末端側29アミノ酸領域を欠失し、かつ1アミノ酸を置換することにより耐熱性を獲得している点、及び高いデンプンの液化効率を有している点としております。

(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、相違点は今回のJSF-07-170-3株にはSLAP-Q遺伝子が複数コピー導入され、SLAP-Qの生産性を獲得している点、並びにここにあります4種類の遺伝子に関する機能を欠失している点としております。

以上、1~6から、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、以降についての評価を行っております。

「第2.宿主に関する事項」としまして、「1.分類学上の位置付け(種名(学名)・株名等)に関する事項」としては、宿主は*B. licheniformis* BRA7株である。

2~5については、記載のとおりとさせていただきます。

「第3.ベクターに関する事項」としまして、「1.名称及び由来に関する事項」。遺伝子導入用ベクターpICatH-Ethy14改変型の作製には、pICatHが用いられた。ここで先生方に事前にお送りしているものには、欠失導入用ベクターの記載をしまっているものそのまま送っていたのですが、過去にはそう記載をしているものもありますが、直近は記載もしておらず、セルフクロニングでもあるため、消すつもりだったのがそのまま消し漏れて先生方にお渡ししてしまっていたので、ここは取り消させていただきます。ここは記載いたしません。

「2.性質に関する事項」としまして、(1)～(3)については記載のとおりです。

(4) 薬剤耐性に関する事項としまして、pICatHにはクロラムフェニコール耐性遺伝子及びネオマイシンの耐性遺伝子が含まれている。

(5) (6)については記載のとおりです。

第4「1.挿入DNAの供与体に関する事項」としまして、(1)名称、由来及び分類に関する事項ですが、*SLAP-Q*遺伝子の供与体は*G. stearothermophilus* ASP-154株である。*catH*遺伝子の供与体は*B. licheniformis* BRA7株である。

(2) 安全性に関する事項については、*G. stearothermophilus*は、GILSPの遺伝子組換え添加物であり、厚労省の第9版食品添加物公定書においても α -アミラーゼの生産菌として記載がされております。

同じく*B. licheniformis* BRA7株については、バイオセーフティーレベル1に相当すると記載をしております。

「2.挿入DNA又は遺伝子及びその遺伝子産物の性質に関する事項」ですが、(1)としまして*SLAP-Q*遺伝子は*G. stearothermophilus* ASP-154株の野生型 α -アミラーゼ遺伝子をクローニングし、終止コドンを導入しC末端側一部欠失型とした後、1アミノ酸を置換により耐熱性を向上した*SLAP-Q*遺伝子を得た。

(2)については記載のとおりです。

(3) ①としまして挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見は、文献検索を行った結果、示唆する報告は認められておりません。

②についても記載のとおりです。

11ページ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ですが、a.人工胃液に対する感受性では、消化性について確認したところ、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において0.5分以内に分解されることが示された。

b.人工腸液に対する感受性ですが、ともに両試験において試験開始6時間後においても分解はされなかった。

c.加熱処理に関する感受性ですが、加熱処理による免疫反応性について確認するため、基質として麦芽の抽出液を用いてELISA法を行った結果、100℃、30分間の加熱により免疫反応性が失われることが示されたと記載をしております。

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ですが、*SLAP-Q*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、アレルゲンデータベースを用いて行った結果、連続する80アミノ酸の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとしてTAKAアミラーゼが検出されたとしております。ここは前回と同じネブラスカ大学のアレルゲンオンラインを使っていたので、こちらが先走って「以上」と評価書に記載しているのですけれども、手島先生にも確認していただいたのですが、今回は「以上」ではなく、slidingアミノ酸という記載があるので、「以上」を消させていただいております。

なお、このTAKAアミラーゼは産業上、広く使われており、食品アレルゲンではない。

また、連続する8アミノ酸が一致する既知のアレルゲンは検出されておられません。

「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」ですが、(1) (2) については記載のとおりです。

12ページ(3) その他としまして、*SLAP-Q*遺伝子の発現に必要な*B. licheniformis* BRA7株由来のLAT分泌シグナルペプチド配列を付加したと記載しております。

「4.ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」は、記載のとおりです。

「5.構築された発現ベクターに関する事項」ですが、(1) (2) は記載のとおりとなっております。

(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ですが、遺伝子導入用ベクターpICatH-Ethyl4改変型上の意図する挿入領域は、*catH*遺伝子発現カセットの*catH*プロモーター配列から*SLAP-Q*遺伝子発現カセットのLATターミネーターの配列までの領域であると記載しております。

(4) は記載のとおりです。

「6.DNAの宿主への導入方法に関する事項」ですが、宿主ゲノムの*catH*座に相同組換えによりpICatH-Ethyl4改変型の目的とする領域を挿入した。形質転換体はクロラムフェニコール耐性とネオマイシン耐性により選択した後、クロラムフェニコールの選択圧を上昇させ、*SLAP-Q*遺伝子発現カセットを増幅させた株を今回の菌株としております。また、全ゲノム解析により複数コピー挿入されていることが推定されたと記載されております。

13ページ「7.抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」ですが、遺伝子導入用ベクターにはネオマイシン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されない。また、クロラムフェニコール耐性遺伝子は、本来宿主に存在する遺伝子を欠失させた後に再導入したものである。したがって、新たな抗生物質耐性マーカー遺伝子は導入されていないと記載しております。

第5、1.宿主との差異に関する事項ですが、今回のJSF-07-170-3株は*SLAP-Q*遺伝子発現カセットが導入され、複数遺伝子を欠失している点で宿主と異なる。

2. (1) は記載のとおりです。

(2) についても、2パラ目になりますが、基本的な結果は第4、2. (3) に記載したTAKAアミラーゼ以外のものは検出されていなかった。また、毒性タンパク質も認められなかったとの記載をさせていただいております。

13ページ、第6、1.添加物の製造原料または製造器材としての使用実績があるということで、これは食品用酵素の製造に安全に使用された実績があると記載しています。

14ページ、2.については記載のとおりです。

第7、1.諸外国における認可等に関する事項ですが、今回の*SLAP-Q*製剤はオーストラリア・ニュージーランドやヨーロッパの一部の国々において、食品加工助剤として承認されています。

2.組換え体の残存に関する事項は、培養法を用いた手法により*SLAP-Q*製剤中に生産菌

が残存しないことが確認された。また、PCRにより生産菌に由来するDNAの断片は検出されなかったと記載しています。

3.については記載のとおりです。

4.精製方法についてですが、除菌ろ過及び限外ろ過等の工程を経て製造されるため、安全性に問題のある物質が混入するとは考えにくいと記載をさせていただいています。

5.については記載のとおりです。

第8、以上、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と記載をしております。

また、参考としてSLAP-Q製造用原体を用いた急性毒性試験及び90日間経口投与毒性試験に関するデータを確認したとして、(1)急性毒性試験、(2)90日間経口投与毒性試験を簡単に記載させていただいております。いずれも異常は認められなかったとしております。

説明については以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、評価書案について御意見、コメントを承りたいと思います。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ければと思います。何かございますでしょうか。よろしいでしょうか。

○山添委員 8ページの130行目にある、一番右端に α -アミラーゼとかあるのは野生型のことですか。ここは欠失してとなくなっていますが、これは野生型を欠失したという意味ですね。アミラーゼと区別がないので野生型を入れておいたほうがいいのかなど。

○森山評価専門官 承知いたしました。

○中島座長 おっしゃるとおりですね。そのほうが良いと思います。

ほかにごございますでしょうか。それでは、いただいた修正につきまして事務局で修正後、私の方で確認し、食品安全委員会に報告してパブリックコメント等の手続きに入りたいと思います。ありがとうございます。

続きまして、新規品目のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統のうち、食品についての審議を行いたいと思います。事務局から説明をお願いいたします。

○山口係長 申請書の説明に入ります前に、本日は申請者の日本モンサント株式会社をお呼びしております。先ほどと同様に申請書の御審議をいただいた後に、申請者に対する質問事項等がございましたら整理していただきたいと思います。その後説明者に入室していただき、質疑応答を行います。質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、申請者から提出されております申請書を説明させていただきます。

お手元にカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目害虫抵抗性ワタMON88702系統と記載されております紫色のファイルをお願いいたします。

まずこちらの1ページをお願いいたします。第1の1の項目でございますが、(1) 宿主はアオイ科ワタ属の *Gossypium hirsutum* L. の従来品種DP393でございます。

2ページ目に移りましてDNAの供与体ですが、導入された改変 *cry51Aa2* 遺伝子は、*B. thuringiensis* EG2934株に由来いたします。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、改変 *cry51Aa2* 遺伝子は改変Cry51Aa2タンパク質をコードし、カメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目に属する特定の昆虫に対して殺虫活性を示します。この遺伝子は、アグロバクテリウム法により導入されております。

続いて2から5までは記載のとおりでございます。

4ページに移りまして6、検討が必要とされる相違点でございますが、改変 *cry51Aa2* 遺伝子の導入により改変Cry51Aa2タンパク質が産生される点でございます。

5ページに移りまして第2、利用目的及び利用方法に関する事項です。

改変Cry51Aa2タンパク質を発現し、特定のカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目昆虫に対し抵抗性を示すワタを作出しております。このことにより、害虫による被害が深刻な地域において、効果的な害虫防除方法を農家に提供することが期待されるとしております。

第3、宿主に関する事項ですが、1及び2については記載のとおりでございます。

6ページに行きまして3、有害生理活性物質ですが、綿実にはゴシポール及びシクロプロペノイド脂肪酸を含むことが知られています。

4、アレルギー誘発性についてですが、高度に加工された綿実油は、アレルギー反応は報告されていないとしております。

5の項目としまして、ワタの病気で知られているものがございまして、それらの病原菌はヒトや家畜等への病原性を持たないことが知られております。

6及び7につきましては、記載のとおりです。

8ページ「第4 ベクターに関する事項」です。

まず1については、記載のとおりでございます。

2の性質ですが、(3) 導入用プラスミド中の外骨格領域の塩基配列、機能等は明らかであり、既知の有害タンパク質を産生する塩基配列は含まれていないということでございます。

(4) 薬剤耐性遺伝子の性質に関する事項でございますが、導入用プラスミドの外骨格領域には、ネオマイシンやカナマイシンに対する耐性を付与するトランスポゾンTn5由来の *npt II* 遺伝子が含まれており、選抜マーカーとして用いられております。

(5) 伝達については、伝達を可能とする配列は含まれていないということでございます。

10ページ「第5 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」が記載されております。

1 (1) といたしまして、挿入DNAの供与体ですが、改変 *cry51Aa2* 遺伝子は *B.*

thuringiensis EG2934株に由来します。

(2) 安全性ですが、*B. thuringiensis*にはヒトや家畜等への病原性やアレルギー性は報告されておりません。

続いて2(1) 挿入遺伝子のクローニング方法等について記載しております。*B. thuringiensis* EG2934株からコウチュウ目害虫への殺虫活性を指標に約35kDaのタンパク質を単離しております。改変*cry51Aa2*遺伝子は野生型*cry51Aa2*遺伝子配列をもとに合成されており、改変Cry51Aa2タンパク質は野生型Cry51Aa2タンパク質と比較して8カ所のアミノ酸置換、そして1か所が3アミノ酸が欠失されておりまして、いずれも殺虫活性を増強する目的で改変されたものでございます。

(2) 切断地図に関する事項については、記載のとおりでございます。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項です。改変*cry51Aa2*遺伝子がコードする改変Cry51Aa2タンパク質は、本申請品目種でプロトキシンとして産生され、一般的なCryタンパク質と同様に感受性のある昆虫種による摂食を通じて部分的に分解されることにより、活性を持つコアタンパク質へと変換されます。このタンパク質は、昆虫の中腸上皮上の特異的受容体に結合し、細胞膜に小孔を形成し、その結果として昆虫の消化プロセスを阻害して殺虫活性を示します。

なお、哺乳動物の消化器内では、コアタンパク質が消化されること。消化器官には特異的受容体が存在しないことから、Cryタンパク質が哺乳類に対して影響を及ぼすとは考えにくいとされております。

改変Cry51Aa2タンパク質は、カメムシ目、アザミウマ目、コウチュウ目の3つの目に属する特定の昆虫に限定して殺虫活性を示しますが、前者の2つに対しては高い活性を示すものの、遠縁のコウチュウ目に対しては弱い活性を示すことが報告されております。これらのことは13ページと14ページの表1にまとめられております。

15ページ、改変Cry51Aa2タンパク質と既知の毒性タンパク質との相同性について調べております。TOX_2017を用いて*E-score*が 10^{-5} 以下の相同性を示す配列を検索しましたところ、1つのアミノ酸配列が確認されております。これは細菌の一種であります*Francisella* sp. CA97-1460株のゲノム配列解析において推定された遺伝子でありまして、アエロリジントキシンプファミリータンパク質に分類されております。なお、このGI-1102943401には遺伝子の発現の有無及びその毒性に関する文献報告はございません。さらに、このアミノ酸配列をクエリー配列としてPRT_2017で検索したところ、既知のアエロリジンタンパク質の配列と相同性を示さない結果となりました。しかしながら、申請者はGI-1102943401がアエロリジンタンパク質に相当するものであると仮定し、タンパク質のドメインごとに検証しております。

その結果が、それ以下に書かれております。 β -PFPに属するアエロリジンタンパク質、改変Cry51Aa2タンパク質が属するETX_MTX2は、一般的に受容体結合ドメイン、オリゴマー化ドメイン、小孔形成ドメインの3つのドメインを有しております。改変Cry51Aa2

タンパク質を含むこれらのタンパク質は、 β ヘアピン等の共通した特性を有し、この構造を介して七量体からなる β バレルに基づく小孔を形成すると考えられております。

改変Cry51Aa2タンパク質は、部分的に分解されることにより二量体が活性を持つ一量体へと変換され、活性化された一量体が昆虫の中腸上皮細胞膜上の特異的受容体に結合、そしてオリゴマー化し、小孔を形成することで殺虫活性を發揮します。

毒性を発現する対象生物種の特異性は、3つのドメインのうち受容体結合ドメインにより決定されるとの報告があり、一方で β -PFPへの分類はオリゴマー化ドメイン、小孔形成ドメインにおけるアミノ酸配列の相同性に基づくため、ヒトに対して毒性を示すものと示さないものが同じ分類になっております。

そこでGI-1102943401と改変Cry51Aa2タンパク質についてアミノ酸配列をドメインごとに検証したところ、オリゴマー化ドメイン、小孔形成ドメインに相当する領域で相同性が高く、受容体結合ドメインの半分以上を占めるhead 1では、ほとんど類似性が認められない結果となりました。このことから、両者の受容体結合特異性は異なるものと考えられ、加えて結合特異性に寄与していると考えられる芳香族アミノ酸も、それぞれの受容体結合ドメインに含まれている残基数が異なることから、同じ受容体に結合することはないことを示唆すると考察しております。

以上のことから、改変Cry51Aa2タンパク質が哺乳類に対して毒性を示すことはないことを考察しております。

続いて(4)抗生物質耐性マーカー遺伝子に関してでございますが、導入用プラスミドにはスペクチノマイシン及びストレプトマイシン耐性を付与する*aadA*遺伝子が形質転換後の選抜マーカーとしてT-DNA II領域に含まれております。また、ネオマイシン及びカナマイシン耐性を付与する*npt II*遺伝子が外骨格領域に存在しております。なお、MON88702系統中には*aadA*遺伝子、*npt II*遺伝子ともに存在しないことが次世代シーケンス解析によって確認されてございます。

19ページ、挿入遺伝子の発現に係る(1)プロモーター、(2)ターミネーター、(3)その他の配列については記載のとおりでございます。

20ページ、4及び5(1)については記載のとおりでございます。

(2)導入用プラスミドの全塩基配列は明らかになっており、目的外のタンパク質を発現するORFは存在しないことが確認されていること。

(3)意図する発現領域は、右側境界領域から左側境界領域までのT-DNA I領域であること。

(4)としまして、抗生物質耐性マーカーによる選抜や塩基配列の解析により、発現ベクター内に目的外遺伝子の混入はないことを確認している旨、記載してございます。

続いて少し飛びまして26ページをお願いします。6、DNAの宿主への導入方法及び交配に関する事項についてでございます。導入方法はアグロバクテリウム法となっております。従来のワタの胚の茎頂組織を、導入用プラスミドを含むアグロバクテリウムと培養するこ

とにより形質転換を行っております。その後、抗生物質を添加した培地に移してアグロバクテリウム菌体を除去し、その後、選抜された茎頂組織から植物体を細分化させております。さらにT-DNA II領域を持たず、T-DNA I領域をホモで有する個体を定量PCRで選抜し、殺虫効果及び導入遺伝子の解析の結果に基づき、最終的な商品化系統を選抜しております。この申請範囲は28ページの図4に示されているとおりでございます。

29ページからは第6、組換え体に関する事項でございます。

1 (1) としましてコピー数等について、その結果や考察が41ページにかけて記載がございます。本項目ではT-DNA I領域の挿入箇所数、コピー数、T-DNA II領域及び外側骨格配列の有無並びに導入遺伝子及びその近傍配列確認のため、次世代シーケンス解析、導入遺伝子領域のPCR及び塩基配列解析を実施しております。さらにワタ内在性の既知の遺伝子の破壊についても確認しております。

これらの内容を要約いたしますと、T-DNA I領域がゲノム中の1カ所に1コピー導入されていることが確認され、T-DNA II領域及び外側骨格配列は存在しないことが確認される結果となりました。さらに導入遺伝子と導入用プラスミドのT-DNA I領域の各構成要素の塩基配列が同一であることも確認されております。また、導入遺伝子挿入部位を対象の非組換えワタの塩基配列と比較したところ、ワタゲノム内在性配列に244 bpの欠失が認められ、また、導入遺伝子の3'末端とワタゲノム内在性配列の間に4 bpの付加が認められておりますが、BLASTn及びBLASTxの検索による近傍配列の解析の結果から、導入遺伝子の挿入によりワタ内在性の既知の遺伝子が破壊されているとは考えにくいとしております。

それぞれの詳細については、次ページ以降に記載されております。

まず33ページですが、こちらでは導入遺伝子の挿入箇所数及びコピー数、T-DNA II領域及び外骨格配列の有無についてNGS解析を行っております。NGS解析では、フラグメント化した植物ゲノム配列の両端から約125 bpずつの塩基配列を冗長度75以上になるような条件で解析しております。組換え体から抽出したゲノムをNGS解析に供試したところ、2つの接合領域が特定され、これらは導入遺伝子の5'末端、3'末端を含む配列でありました。対照の非組換えワタでは接合領域は特定されない結果となりました。さらに組換え体から得られたリードについて、導入用プラスミドの配列との相同性を調べましたところ、T-DNA I領域では冗長度の中央値が79、最低冗長度が42で、全領域にわたってリードが検出されております。また、T-DNA II領域及び外骨格領域との相同性を示すリードが含まれていないことが確認されたことから、T-DNA I領域がゲノム中1カ所に1コピー組み込まれていることが確認されております。

解析手法ですとか冗長度については35ページ、そして36ページの図にそれぞれ記載されております。

38ページ、こちらでは導入遺伝子の近傍配列がワタゲノム由来であることについて確認してございまして、40ページでは内在性の既知の遺伝子に対する影響について相同性検索の結果が記載されております。

41ページ、下半分になりますが、(2) としましてORFの有無について記載をしております。導入遺伝子と5'及び3'末端近傍配列の境界領域において、既知のアレルゲン、毒性タンパク質、有害生理活性物質と相同性のある新規のORFが形成されていないことを確認するために、ストップコドンからストップコドンまでの配列を6フレーム全てについて検索した結果、ワタの内在性配列から本申請系統の導入遺伝子にかけて存在し、かつ、8以上の連続するアミノ酸を有するORFが10個確認されました。これらについて相同性検索を行っております。

この結果でございますが、データベース中の配列と *E*-scoreが 10^{-5} 以下で相同性を示す配列、連続する80アミノ酸以上で35%以上のアミノ酸相同性を示す配列、連続する8アミノ酸との相同性を示す配列というのはいずれも検出されず、仮に導入遺伝子の両末端近傍配列にまたがる塩基配列に由来する領域が翻訳されても、既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性タンパク質との相同性を有するとは考えにくいとしております。

さらに導入遺伝子につきましても、目的以外の新規のタンパク質が産生され、それらが既知のアレルゲン、毒性タンパク質及び有害生理活性タンパク質と構造相同性を有するか、相同性を調べましたところ、*E*-scoreが 10^{-5} 以下であるアミノ酸配列が1個確認される結果となりました。この結果は先ほど述べましたものと同様であり、改変Cry51Aa2タンパク質が毒性を有することを示唆する結果は認められなかったとしております。

続いて遺伝子産物の発現部位、発現時期、発現量等についてでございますが、こちらは44ページの表5にまとめられているとおりでございます。

45ページに移りまして、一日タンパク摂取量が記載されております。綿実から精製、脱色及び脱臭された油には、検出限界値未満のタンパク質しか含まれておらず、リンターは99%以上がセルロースということでございます。そのため、タンパク質は無視できる程度しか含まれておらず、食品を摂取した際の改変Cry51Aa2タンパク質の摂取量は、仮に残存したとしてもごくわずかであり、一日タンパク摂取量の有意な量を占めるとは考えにくいとしております。

4としましてアレルギー誘発性に関する事項ですが、(1) 及び (2) については記載のとおりでございます。

(3) といたしまして、物理化学的処理に対する感受性でございますが、人工胃腸液、加熱処理に関する分析を行っております。

まず人工胃液処理についてでございますが、46ページをお願いします。SDS-PAGEの結果、完全長の改変Cry51Aa2タンパク質は0.5分以内に検出限界値以下まで消化され、また、0.5分の時点で約31 kDaの断片が観察されましたが、これは2分後には観察されず、また、約4 kDaの断片は20分後には観察されない結果となりました。

ウェスタンブロット分析の結果ですが、0.5分以内に検出限界値未満まで消化され、0.5分の時点で見られました約31 kDaの断片は2分後には消失しております。この約4 kDaの断片について人工胃液処理後に人工腸液処理を行ったところ、0.5分以内に消化されること

が確認されております。

51ページ、こちらは人工腸液処理でございますが、ウェスタンブロット分析の結果、完全長の改変Cry51Aa2タンパク質は、人工腸液中で24時間後も残存する結果となりました。

53ページ、加熱処理についてでございますが、15分間、30分間の加熱処理では、ともに55℃以上で免疫反応性が定量限界値以下となりました。54ページの表6、表7に記載されているとおりでございます。

55ページ (4) 既知のアレルゲンとの構造相同性についての検索を行っております。その結果でございますが、*E*-scoreが 1×10^{-5} 以下を基準とした相同性検索を行った結果、改変Cry51Aa2タンパク質と相同性を示す配列はございませんでした。また、連続する80アミノ酸以上で35%以上一致する配列、連続する8アミノ酸が一致する配列はともに認められず、したがって、改変Cry51Aa2タンパク質は既知のアレルゲンと構造的、免疫学的に関連のある配列相同性は有していないとしております。

続いて5、遺伝子の安定性に関する事項でございます。

55ページから56ページをお願いします。種子から抽出しましたゲノムDNAを用いて次世代シーケンス解析を行っております。その結果ですが、供試した全ての世代において導入遺伝子に起因する2つの接合領域が検出されたことから、導入遺伝子が複数世代にわたり安定して遺伝していることが示されています。

次に、改変Cry51Aa2タンパク質の発現の安定性について、葉のウェスタンブロット分析を行いました結果、*B. thuringiensis*で調製したものと同一位置のバンドが供試した全ての世代において観察された一方で、対照の非組換えワタからは検出されず、安定して後代で発現していることが示されております。

58ページからは、複数世代にわたる分離比について統計処理を行いました結果、実測値と期待値との間に統計学的有意差は認められなかったことから、T-DNA I領域はワタゲノムの1カ所に存在し、メンデルの法則に従って後代に遺伝していると考察しております。

60ページ、6、代謝経路への影響でございますが、改変Cry51Aa2タンパク質が何らかの酵素活性を持つとの報告がないことから、新しい代謝経路または代謝産物をつくることは考えにくいとしております。

7、宿主との差異についてでございます。構成成分の差異を見るために、主要構成成分等について分析を行っております。

61ページにある項目について分析をしております。結果については73ページまで記載されております。こちらの内容をまとめますと、本系統と比較対象としたワタとの間では、分析を行ったラウリン酸を除く全ての成分について統計学的有意差はないか、あったとしてもILSIのデータベースの範囲内におさまっているという結果でございました。ラウリン酸については、Codexによって報告されている綿実油の範囲と比較したところ、この範囲に収まっておりました。

これらのことから、本系統の構成成分は、従来のワタ品種と同等であるとしております。

74ページに飛びまして、8、諸外国における認可の状況、9、栽培方法、10、種子の管理方法等は記載のとおりでございます。

75ページ以降の結論となりますが、食品の安全性は、従来のワタ品種に由来するものと同等であると結論づけられております。

申請資料の説明は以上でございます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして先生方から御意見をいただきたいと思っております。少々長いので、まずは1～9ページ、ベクターに関する事項までのところでございますたらお願いいたします。

それでは、申請書の10～28ページ、挿入DNA、遺伝子産物等に関する事項で、今回の申請品目で出てくるCry51Aa2は新規のもので、ここは慎重に御審議いただければと思います。特に15～17ページのところ、新規のCry51Aa2が哺乳動物に、ヒトに毒性を示さないことについて考察がございますが、この説明で安全性は担保できると考えてよいかどうかという点について御意見いただければと思います。

○児玉専門委員 毒性タンパク質との相同性が一部認められるということで、15～17ページについて記載がそれなりに詳しく書いてあるのですけれども、毒性タンパク質の情報がやや薄いので、ETX_MTX2タンパク質がウェルシュ菌の毒性タンパク質ということで、そこがどういうふうな哺乳類に対して毒性を示すかというところはもう少し記載していただいて、それと比べてどうかということがもう少しはっきりわかるような形で書いていただいたほうがよろしいかなと思えました。

○中島座長 やはりこのタンパク質がヒトに毒性を示さないということをどう確認するかという問題なので、確かに受容体の結合ドメインの形が違うところを重点的にディスカッションしているけれども、まずヒトに対して毒性を示すということがわかっているETX_MTX2の構造についてももう少しきちんと記述していただいて、その上でこの違いをはっきりさせていただく。私も同感です。

○小関専門委員 この添付資料にそのところが書いてあるのです。これを上手に入れてほしいです。

○中島座長 確かに彼らもかなり苦心してこのところを一生懸命ディスカッションしているのはわかりますので、おおむねこれで安全性は大丈夫なのかなと思うのですが、でも慎重の上にも慎重にいきたいと思っております。

○児玉専門委員 小関先生がおっしゃったように、机上配布資料には後で説明がきつとあるのだと思いますけれども、ETXタンパク質において毒性を示すためには標的細胞の、これは実際に哺乳類には標的細胞があって、そこに結合することで毒性が示されていることになっていきますので、その受容体のレセプターにどういう配列が、アミノ酸配列、アミノ酸残基が重要かというのものもある程度研究が進められていますので、そういう重要なアミノ酸残基、アミノ酸配列が実際に具体的に今回のCry51Aa2に対してあるのかないのかとい

う議論を、それは申請書のほうにも入れていただくことは重要ではないか。

○中島座長 私もその辺はきちんと書いていただければ、もう少しこちらも安心してと思いますので、申請者が来ておりますので、その辺のデータは持っていると思いますが、一応、質問はしてみたいと思いますが、そういうことでよろしいですか。ありがとうございます。

それでは、組換え体に関する事項なので、まず遺伝子導入に関する事項、申請書29ページから42ページまでで、今回NGSによる解析が36ページに載っておりまして、実際に次世代シーケンサーで配列を見ていって、それを重ねると36ページみたいな絵になるのかなというのがあったのですが、これはこれでわかりやすいなと思うのですが、この辺についてもコメントをいただけるとありがたいです。

鈴木先生、こういった示し方は今では一般的なのでしょうか。

○鈴木専門委員 いや、勉強になりました。いいと思います。

あと質問なのですが、15ページから書いてある *E*-score というのは正しい表現なのですか。E-valueと私は覚えていたので。

○中島座長 両方にかけますので、私はあまり違和感ないのですが、先生方がでしょうか。scoreで悪くないと思うのですが。

○児玉専門委員 多分この委員会では、かなりの申請書がscoreという形で書かれていると思います。

○中島座長 必要に応じて戻っていただいても結構なのですが、組換え体に関する事項、申請書42～55ページまででございましたらお願いします。

○児玉専門委員 過去のこの委員会の新規のCryタンパク質の議論のときにあったのは、*in vitro*で細胞毒性ぐらいいはあるかないかはやってみましょうみたいな議論が実はありまして、それを求めたこともあるのですが、*in vitro*での細胞毒性の試験はほとんど意味がないので、一応、過去のことは覚えているので確認ということだけなのですが、新規のCryタンパク質であってもウェート・オブ・エビデンスである程度の安全性が担保されると判断された場合には、そういうことは必要ないという判断でよろしいかどうかということだけをお伺いしたい。

○中島座長 最近のものでありますか。

○内海課長補佐 最近の新規のCryタンパク質で必ずしも今おっしゃられたような、例えばヒトの細胞を当ててみたいような試験を要求しているかということ、必ずしもそうではないと思っています。

あと、後ほど机上配布の中で申請者からも説明があると思うのですが、動物試験をやっておりまして、細胞を使った試験はなかなか結果の解釈が難しい部分もあると思うのですが、仮にそれで疑わしい結果が出た場合に動物試験が必要という流れになるのであれば、既に動物試験の結果があるということが大きな担保になり得るのではないかと思います。

○山川専門委員 それは今回これではないのですけれども、家畜の飼料でも気になっていたのです。動物試験を行ったとしか書いていないのですが、その動物試験がどういう動物試験で、どういう家畜に対して食べさせようとしているか。これによると反芻動物には少量まぜても大丈夫。中には単胃動物の中でも大丈夫なものにはかすを食べさせるんだと書いてあります。家畜というか魚類だとかそういうものに対してはどうなのかというのも実は後で広がってくるといけないので、その辺はきちんと最初だからやっておいたほうがいいのではないかと思います。

○中島座長 その辺については申請者にきょう来てもらっていますので、申請者とディスカッションをしたいと思います。それでよろしいでしょうか。

○山川専門委員 はい。

○児玉専門委員 少しだけ補足すると、Cryタンパク質はほとんどのものが腸液で安定なので、その分の性質はむしろCryタンパク質に共通な性質かなと私は一応見ました。

それから、家畜に関しては●●●、そもそもワタでしぼりかすですでどうしてもゴシポールの関係で投与量がある程度限られていますので、これをばかばか実際に食うということは、実はそのときに出たのですが、ウシはあまり好きではないという話になって話題になったのですけれども、混ざっていてそれが入っていると、鼻息で飛ばして食べないんだという話が出ていたのですが、どうしてもゴシポールの関係で投与量もある程度限られているということで、大丈夫ではないかと●●●なっています。参考までに。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書の最後まで、組換え体に関する事項まででございますでしょうか。

今回の申請書、遺伝子がどういうふうにかこの染色体が組み込まれているかの形とか、安全性の審査を行った世代、そういったものについてはきちんと書かれていまして、やはりポイントは今回新しく出てきたCryタンパク質の安全性についてどのように担保できるか、どのように考えているか、また、彼らがどのようなデータを持ってどういうつもりでいるのか。そういったことについて中心に話を聞いてみたいと思います。それでよろしいですね。

では、説明者に来ていただいでください。準備ができるまで少し休憩にいたします。

○山口係長 事務局から1点よろしいでしょうか。

今回、申請者から提出されております資料が机上配布資料2と3と2つございまして、先ほど御審議いただいたのが机上配布資料3になると思うのですけれども、今回2も出てきております。2は申請者がNGSの解析をするに当たって変更した点を整理したので、その部分についてももし先生方のほうがよろしければ、この場をかりて説明したいというようなお話だったのですけれども。

○中島座長 申請者からわかりやすい資料を用意していただいでおりますので、せっかくだからそちらも聞きたいと思いますが、それでよろしいですね。

○山口係長 ありがとうございます。

○中島座長 では、申請者を呼んでいただければと思います。

(休 憩)

○中島座長 御多忙中お越しいただきましてありがとうございます。

自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

○説明者 日本モンサント株式会社の谷村と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者 同じく柳川と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者 同じく高本と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者 同じく渋谷と申します。よろしくお願いいたします。

○中島座長 ありがとうございます。

今回は机上配布の資料も用意していただけたようなので、これに沿っていただければ。1つはNGS解析の新しい、視覚的に見やすいと思いますが、この辺について。もう一つは、新しいCry51Aa2の安全性についてということで、やはり我々が気にしておるのもその点なので、ではせっかく資料を用意していただいておりますので、まずNGS解析について説明いただければと思います。

○説明者 次世代シーケンサーNGSを用いた導入遺伝子の解析につきまして、これまでの申請案件からの変更を御説明いたします。

配付資料の「NGSの更新について」というタイトルの資料の2ページをご覧ください。この図はNGS解析のフローを示しております。NGS解析の流れについては、これまでの申請と今回の申請で大きな違いはなく、今回は図中に青文字で記載した変更点1及び変更点2の部分のみを改良しております。図の左上のステップ1から順番に御説明いたします。

まずNGS解析では植物ゲノムをランダムに切断し、図中の①に記載のとおり、両端の塩基配列を解析いたします。解析された塩基配列をそれぞれリードと呼びます。このリードはこれまで100塩基程度でしたが、解析可能な塩基数がふえまして約125塩基になったというのが1つ目の変更でございます。

次に図中の①に進みまして、リードのうち導入用プラスミドの配列と相同性を示すものを集め、さらに図中③で導入遺伝子と宿主ゲノムの接合領域を持つリードのみを選抜いたします。こうして得られた接合領域のリードを並べ、図中の赤塗りの丸のように共通する配列をまとめることで接合領域の数を判断いたします。

例えば導入遺伝子1カ所1コピーで存在する場合、接合領域は2つ特定されます。また、導入遺伝子の全領域について、1塩基ごとに冗長度を示したチャートを毎回提出しております。このデータについて海外の規制担当省庁から御要望がありまして、追加データとして図中の青色の枠内で示しておりますようなデータ、つまりプラスミド配列上にリードを直接マッピングした図があれば、視覚的にわかりやすいということで、このマッピングデータを今回、追加させていただきました。

この追加データについて、次のスライドで御説明いたします。3ページをご覧ください。右側に示しておりますデータのうち、一番下のパネルCは1塩基ごとに冗長性を示したチャートであり、こちらはこまでも提出しているデータになります。その上に示しましたパネルAとBが今回追加したマッピングデータになります。また、その左側の模式図ではNGS解析で見られるフラグメントの分類1~5と、導入遺伝子領域の対応関係を示しております。

1~5のフラグメントのそれぞれについて、プラスミド配列とフィットした部分を黒塗り、フィットしなかった部分を白塗りで示しております。例えば1のフラグメントの場合は両端のリードがプラスミド配列とフィットしなかったもので、このような場合はマッピングデータにカウントされません。一方、2や3のフラグメントは両端のリードがプラスミド配列とフィットしたものであり、パネルBにマッピングされます。また、4、5のフラグメントは両端のリードのうち、片方のみがフィットしたものであり、これらはパネルAにマッピングされます。さらに3と4のフラグメントのうち、赤色の丸で囲まれた部分はリードの一部のみがフィットした場合であり、これは導入遺伝子と宿主ゲノムの接合領域をあらわしております。この接合領域を持つリードはマッピングデータでは赤色のバーで示されており、T-DNA Iの両側に発生していることがわかります。つまり、マッピングデータにおいてT-DNAにリードがマッピングされており、T-DNAの両端に赤色の接合領域が存在することから、このデータを見ることで1コピーのT-DNA Iが導入されていることがわかります。

ここで左の模式図の4、5のフラグメントに着目いたしますと、これらは一方のリードのみがヒットしているものであり、理論的には接合領域、つまりT-DNAの両端だけにマッピングされるものです。しかし、パネルAではT-DNA Iの両端だけでなく、その内側にもマッピングされております。こうしたことが起こる理由について、次のスライドで御説明いたします。

スライド4を見ていただきますと、そのパネルAにおきましてT-DNA Iの内側にマッピングされているリードは、本来であれば下の模式図におけるフラグメントの2や3、つまり両端のリードがヒットすべきものであると思われます。しかし、こうしたフラグメントにおいて片側のリードにシーケンスエラーが生じてT-DNAとヒットしなくなった場合、ヒットしているのはもう片方のリードだけとなってしまい、5のフラグメントであるかのようには判定されたものであると考えられます。

なお、このようにT-DNA Iの内側にマッピングが見られたからといって、非意図的なT-DNAが導入されているわけではないと考えております。仮にこれらのマッピングが非意図的なDNAの導入によって生じている場合、これらのリードにおいて接合領域が生じるはずであり、マッピングにおいて赤色のバーで表示されます。つまりT-DNA Iの内側のリードに赤色のバーがないということが、これらが非意図的な配列の導入によるものではないことを示しております。

以上がNGSの更新についての御説明になります。

○中島座長 ありがとうございます。

視覚的には見やすいかなと思いますけれども、それでもT-DNAの2番、3番であるべきものがあって、普通に考えるとパネルAの内部にこれだけあるのはおかしいことはおかしい。

○説明者 そうですね。理論上では起こり得ないということにはなります。

○中島座長 なるほど。それでも相同性で張りつけることができれば、こういう形でマップされてくると考えてよろしいわけですか。

○説明者 はい。

○中島座長 染色体上の組み換えられた位置が、たまたま繰り返しのあるような領域だった場合は、それも確実に検出できますでしょうか。

○説明者 そういった場合でもこの領域がT-DNA領域及びプラスミドを含めて、その領域の100%を読めることが、0.1ゲノミックのプラスミドをスパイクした場合でも検出できておりますので、そういった場合にも検出できると考えております。

○中島座長 挿入領域がタンデムに2コピーなり3コピーなり入っていた場合は、どのようになりますでしょうか。

○説明者 そうしました場合には、T-DNAで平均冗長度というものをとっておりますので、その値がそれとは別にとっている内在性の1コピーで存在することがわかっている遺伝子の平均冗長度と比べて、約2倍ぐらいに跳ね上がるということになります。今回、見てみますとそういうことではなく、ほぼ同じぐらいの平均冗長度であることが確認されておりますので、そういった結果をもちまして2コピー、3コピーのものが入っているものではないということとは言えると考えております。

○中島座長 今回のデータは、それはそれでいいのですけれども、この新しいマッピングの方法ということは、これ以降もこういう形でデータを出していただけると、そういうことですよね。

○説明者 はい。

○中島座長 そうしたら、そのような場合に2コピーなり3コピーなり入っていて、これが素直にタンデムリピートできれいに入っていればいいのですが、そのうち1コピーくらいは途中でちぎれているとか、そのような異常が起こっている場合も検出できるものでしょうか。

○説明者 そのような場合でも十分なリードが確保できるということ、それから、その中で接合領域が変わってきますので、つまりT-DNAの真ん中から切れた断片が入る場合には、このT-DNA Iの真ん中に赤いバーがあらわれてきて、接合領域が検出されますので、そういった情報から見てT-DNA Iの断片が入っているわけでもないということが確認できます。

○中島座長 この赤いやつは端っこだから、これが端っこ以外のところから出てきた場合は、これは変なことが起こっていると判断せざるを得ないということですね。

先生方ほかにございますでしょうか。大体今の説明でよろしいですか。ありがとうございます。

それでは、こちらが本命なのですが、改変Cry51Aa2タンパク質と既知の毒性タンパク質。先に御説明を聞かせていただこうと思っておりますけれども、今回の申請はこの安全性が確実に担保されているかどうかという点にかかっておりますので、配付資料がございますので、まずはこちらから説明をお願いいたします。

○説明者 この資料につきまして、要旨に記載のない内容を中心に御説明させていただきます。

まずスライド2ですが、こちらは基本的に要旨に書かれている内容になります。ここでは改変Cry51Aa2タンパク質は、既知の毒性タンパク質とは相同性は認められなかったこと。唯一、相同性が認められたものは推定タンパク質であったこと。そして、それはアエロリジタンパク質であるとアノテーションされていたことが書かれております。

スライド3、まず右側の図で御説明いたしますと、下から改変Cry51Aa2タンパク質でございますが、これはETX_MTX2タンパク質ファミリー、そして、その上のアエロリジタンパク質ファミリーに分類されると考えられております。これらのファミリーにはウェルシュ菌由来のETXタンパク質など、ヒトや家畜に毒性を示すものも含まれておりますが、一方でこれまでヒトや家畜が安全に摂取してきたり、あるいは使用してきたタンパク質も複数含まれております。

スライド4をご覧ください。アエロリジタンパク質の作用機作について御説明いたします。図aはアエロリジンのプロトキシンでありまして、この赤いペプチドが切断されて活性化されます。続いてbに示しますように、活性化した単量体が標的細胞へ結合し、オリゴマー化いたします。その後、cのようにβバレルからなる小孔を形成することで生理作用を発揮いたします。なお、このCry51Aa2も同様の作用機作を持つことが既に文献によって示されております。

スライド5及びスライド6は要旨に書かれている内容なので割愛いたしますが、ここではアエロリジタンパク質では受容体結合ドメインが受容体との結合において重要であること、なおかつ、受容体結合ドメインの中でも機能上、重要なアミノ酸が同定されていることが説明されております。

スライド7、ここで事前に御質問をいただいております毒性タンパク質ETXとの比較結果について御説明させていただきたいと思っております。

まず、そもそも毒性タンパク質データベースを用いた結果、改変Cry51Aa2タンパク質とETXの間で相同性は認められておりません。その上で比較を行った結果が左の図になります。アラインメント、上側の配列がETXで、下が改変Cry51Aa2になります。まずドメインごとに比較したところ、両方で相同性の高い領域は黒字のオリゴマー化ドメイン及び緑の小孔形成ドメインに限られておりまして、赤色の受容体結合ドメインではほとんど相同性は認められませんでした。

さらに、その中でも受容体結合に重要なアミノ酸として、ETXにおいてはここで緑の円で示す特定のアミノ酸が重要であることが報告されております。これらのアミノ酸は改変

Cry51Aa2タンパク質には存在しておりませんでした。よって、受容体結合への関与が示唆される受容体結合ドメインの類似性の低さから、改変Cry51Aa2タンパク質とETXタンパク質は、異なる標的生物種特異性を持つことが推測されました。

最後にスライド8をご覧ください。ここで改変Cry51Aa2の安全性を示すその他の報告について御説明させていただきます。まず改変Cry51Aa2タンパク質の作用機作は解析されており、ほかのCryタンパク質と同様の作用機作を有しております。実際に昆虫の中腸上皮細胞と結合することが実験により確認されております。

また、改変Cry51Aa2タンパク質は人工消化液により速やかに分解されること、加熱処理により免疫反応性を失うことが要旨内でも示されております。

さらに、要旨には含めておりませんでした。マウスを用いた急性毒性試験の結果でも改変Cry51Aa2タンパク質の毒性を示唆するいかなる知見も認められませんでした。なお、この報告につきましては必要でございましたら、この文献を引用する形で要旨に追記させていただく予定でございます。

以上の検証結果及び試験結果は、いずれも改変Cry51Aa2タンパク質がヒトや家畜等の哺乳類に対する毒性を有さないことを示していると判断しております。

説明は以上になります。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、質問をお願いいたします。児玉先生、最初のヒトの件。私から聞いてもよろしいのですが、どうしますか。

この特異性のポイントなのですけれども、申請書の15ページから17ページまで詳細に説明がございまして、よくわかったのですが、ヒトに毒性を示すETX_MTX2の構造の特徴についてもう少し詳しく記述していただいて、今回のCryとの違い、ここが明らかに違うからとか、そのような形で、なので人にまず毒性を示すものがどういうものなのかという点について、その差が明確になるように御説明いただければと思います。その点については多分データをお持ちなのだと思いますが、コメントございますか。

○説明者 ETXにつきましては、様々な文献がございまして、それに従いまして要旨のほうに追記させていただければと思っております。

○中島座長 今回の改変Cry51Aa2の特異性が非常にシビアであることが証明できれば、かなり安全性を担保できると思うのですが、今回の申請書の範囲ではカメムシ目、アザミウマ目及びコウチュウ目とあります。では、それ以外の昆虫についてはどうであったのかとか、節足動物に限らず、哺乳動物についてはまた後でということ、昆虫に関する特異性の幅はどのようであったか、データはお持ちでしょうか。

○説明者 実験いたしましたここに示しております無脊椎動物群なのですけれども、13ページの表1になりますが、こちら基本的にワタが栽培されている状況に関与する機能群から代表的な種を選択してまいりましたので、基本的に影響を受け得る種を網羅しているのではないかと弊社としては考えております。

○中島座長 ここに出てくる、要するにこれまでに使われているCry1、2、3などの○×表と比べて、この特異性というのはほぼ同レベルなのでしょうか。

○説明者 過去のCryタンパク質に多かったのは、ある特定の目に属する昆虫に対する活性を持つものが多かったのですけれども、かといってそれらがその目だけに活性を持っていたかといえばそうではなく、ほかの目で試験をしていなかったという点もあるのですが、基本的にその目を中心に活性を持っていると考えている状況でございます。

また、今回示しているCry51タンパク質のように、複数の目に対して殺虫活性を持つCryタンパク質も既に報告がありまして、このタンパク質が特に特別なものではないと弊社としては考えております。

○中島座長 昆虫におけるこの分類学はまた別の観点から分類されておりますので、これが必ずしも目をまたがったらどうこうという問題ではないと考えますが、今回の申請範囲にありますカメムシ目、アザミウマ目、コウチュウ目、これらに共通する特徴とかそういったものについて判明していることはございますか。

○説明者 私のほうから回答させていただきます。

先ほど目に限らないとはおっしゃられたのですが、カメムシ目とアザミウマ目というのは分類上、少し近いところにおりまして、近いところにいるために酵素によって切られるとか、このように取り込まれるみたいな作用の部分が似ているとは考えられております。

コウチュウ目は少し離れているのですけれども、Cryタンパク質が働くのに必要なステップというのがある程度重なっていたのだらうと推測しております。

また、スペクトラムの試験なのですが、先ほど柳川が申しましたように、これまでのものは植物を食べる目を中心に試験がされておりました。ただ、こちらは複数目に効くということで初めてハチ目だったり、トビムシ目だったり、ナガミミズ目だったり、より広いところを見て、この3つにしか効かないということを確認しております。

○中島座長 たしかCry3はコウチュウ目にというものだったと思いますけれども、Cry3と今回のCry51Aa2と比べますと特異性の幅というのはどうでしょうか。ほぼ似たようなものなのか、それとも今回のほうが少し広いのか。

○説明者 そうですね。Cry51Aa2に比べますと、Cry3Bb1はコウチュウ目にしか効きませんので、今回のほうがより広いというのはあるのですけれども、複数目に効くCryタンパク質というのはまた別の特徴がありまして、12ページにも書かれているとおり、複数目に効くものに関しては主要殺虫活性範囲というものがありまして、今回もカメムシ目とアザミウマ目が主要殺虫活性になっておりまして、それが13ページの一番上の3.0 $\mu\text{g/mL}$ とLC₅₀の値でよりよく効くことがわかるのですが、コウチュウ目みたいになりますと200 $\mu\text{g/mL}$ だったりということでオーダーが変わってきます。このようにオーダーが変わると殺虫活性が低くなるというのがわかりますので、今回のものもより近いカメムシ目とアザミウマ目に対して、またそれの中の幾つかの種、同じ目でも全部に効くわけではないので、そういうことである程度特異性を持っているという意味では、Cry3も今回のCry51に関し

でも同じとなっております。

○中島座長 ありがとうございます。

○児玉専門委員 このCry51が結合するレセプターのほうは同定されているのですか。

○説明者 レセプターについては同定されておられません。

○児玉専門委員 先ほどの中腸上皮細胞にくっつくというのは、どういう実験ですか。

○説明者 まず昆虫の中腸上皮内にありますbrush border membrane細胞というものを取ってまいりまして、それに対する結合試験を行っております。

○中島座長 小関先生、よろしいですか。

○小関専門委員 多分、書きぶりというかロジックの整理がいま一つうまくできていないのではないかと、それで誤解を与えるのではないかと思う部分がある。例えば3ページのところで言ったときに、ヒトや哺乳類に対して毒性を示すものが存在すると書いてありますね。今回のお話ですと、この辺が曖昧というか、毒性がないということと、毒性があるということ両方、同じバランスで考えてみたときに、何があるから毒なんですよというところ、何がないから毒ではないんですよというところを整理していただかないと、ここの文章だけ読んでいたらあれ？という感じになってしまうのです。要するにレセプターサイドの話だと思うのですが、というのは次のところに作用機作と来たときに、これだけ見ると見事にみんな穴があくんだという感じに見えてしまうのではないですか。そういう意味でいくと、毒であることの必要十分条件、毒でないことの必要十分条件のことを整理していただいたほうがいいかなという気がするのです。

というのは、1つアラインメントで書かれているのですけれども、アラインメントの部分、これもある意味、突っ込むとロジックの破綻に来てしまう部分があるのですが、前のところで構造図を出していた、次のところでアラインメントという要するに一次構造の上での話をしているのではないですか。一次構造の上でこうだから、三次構造はと言われたときに、これは要するにそれを補強するものではなくて、否定するケースだってあり得るのではないですか。ですからこれもロジックの上で何かいま一歩かなとすごく思ってしまったのです。

結論の4のところで異なる標的生物特異性を持つと書かれていて、マウスには特異性は標的にならないけれども、ヒトは標的になるかもしれないという、これは裏を返せばそう読めてしまうのではないかと思ってしまうのです。すなわちこれは必要十分条件の上でどういう形で論を整理していくかというところが、いま一歩、非常に振れている感じがして、わかりにくいなと思ったのですが、そこを整理していただければよりわかりやすい申請書になるのではないかと思います。

○説明者 ありがとうございます。文につきましては検討させていただきたいと思います。

○中島座長 こちらもどのようにお話しすれば真意が伝わるか、言葉を一生懸命選んでいっているつもりなのですが、つまりは哺乳類に効く毒性を持っているものについての構造なり何なりを整理していただいて、こういう特徴を持つものが哺乳類の毒性を持つことを

明らかにしていただければ、そうしたらそれでこれは違うんだよと言っていただければ、もう少しわかりやすい文になりますので、そうでないと一見しますと近縁のETXは毒があるんだよ。だけれども、ここは違うということをお願いののだと思うのですが、最初に近縁のところに毒があると言われると、では毒になるかもしれない。やはりそういうふうに読めますので、そうではないということを示すためには哺乳類に毒性を示す条件としては、今のところこのようなことが知られているということを整理していただけると、もう少しわかりやすいかなと思いますので、少し整理をお願いできればと思います。

山川先生、いかがですか。

○山川専門委員 そちらの日本モンサントさん、申請者としては、今はヒトのものですがけれども、飼料にも使うとなると、その飼料というのはどういうスコープで、ここに反芻動物と単胃動物でも使うんだと書いてあるのですが、それだけなのでしょう。それとも、もっとほかにも広く使うことを考えていらっしゃるのでしょうか。というのは後の検討するときの参考になるので、もしわかっていたら。

○説明者 基本的に今までのワタと同じく、綿実かすを家畜に利用する予定でございます。

○山川専門委員 心配したのは魚類だとか、そういうものに使うことはないだろうかというのを考えたのです。というのは、畜肉だと可食部は肉ですがけれども、魚なんかを使うと魚はそのまま全部食べちゃったりするので、蓄積していないかということも心配になりますけれども、そういうものを考えていなくて、今までと同じような家畜でそういう食べ方をするのだったら、あまり心配ないと思いました。

○説明者 そうですね。加えまして加工の過程におきまして高度に加工されますので、もちろん加熱処理も含めまして、そのため、最終的な家畜あるいはヒトが摂食する部分にはほとんどタンパク質は残っていないと考えております。加えまして、例えば家畜あるいはヒトが摂取した場合にタンパク質ですので当然、胃腸内で分解されますので、そのままの形で例えば何らかの化学物質のように毒性を発揮するようなことはない弊社としては考えております。

○山川専門委員 ありがとうございます。

○中島座長 ほかに先生方、どうぞ。

○山添委員 16ページのところに先ほど委員の先生方もおっしゃっていたのですが、ウェルシュ菌などではヒトに影響するようなもののコアタンパクがあるという話が記載されているのです。これらのもののタンパクと今回のCry51Aa2の相同性ということは、既にどこかに記載があるのですか。というのは、今回のときに、受容体部分のところが問題なんだという議論をなさっているのです。もしそのところにもヒトに影響するものが受容体なのか、全く関係なければヒトにこういうものとも、従来知られているものとは関係がありません、関連性がないと記載していただくとわかりやすいかなと思います。

○説明者 その部分の論理につきましては、ここで引用しておりますMoarの論文でも議論させていただいております。

○山添委員 議論は書いてあるのですけれども、この文章の中から見ると、このウェルシュ菌のタンパクが本当にそのところも違っているのかどうかという記載はないのです。

○説明者 そちらでも同じくドメインベースのアプローチをしております、アエロリジンタンパク質、広いファミリーとしては3つのドメインを持つということは書いてありまして、その中で受容体結合特異性の決定に重要な受容体結合ドメインの構造が大きく異なるということまで、この論文では引用しております。

○山添委員 このウェルシュ菌のタンパクがということですか。ヒトに影響のあるタンパクが、その部分が非常に今回のタンパクと違うということ、つまりCryとの間で結びつけないと、中間のこのところのアエロリジンタンパクの部分での議論にしかなくなっていないと思うので、そのところをきちんと明快にしていきたい。

○説明者 ETXの比較につきましても、追記させていただければと思います。

○中島座長 恐らくはここにも10個の芳香族アミノ酸の指摘もございますので、そういったところを整理していただければいいと思うのですけれども、ほかに先生方よろしいですか。ありがとうございました。これで終わります。

(説明者退室)

○中島座長 それでは、審議に戻ります。

ただいまの回答を踏まえた上で御意見、コメント等ありましたらお願いいたします。

大きく2つありまして、1つはNGSの新しいデータの示し方についてですが、これについてNGS解析の追加データについてですが、こちらはいかがでしょうか。

○児玉専門委員 実際にNGSをやると断片同士のキメラになったりするものも結構出てきたりして、こういう結果になるのは十分あり得る話ですので、私は別にこの波形でいいのですけれども、海外から相当強く言われているらしくて、どうしても読んだものを目に見える形で重複しているのをちゃんと見せろということで、今回このようになったと一応伺ってはいますが、これはこれで全然構わないと思います。

○中島座長 私も、ここまでやっていただけると確かに非常に視覚的でいいかなと思いますので、この点についてはそういうことです。

もう一つ、改変Cry51Aa2タンパク質の相同性と毒性に関する議論についてはいかがでしょうか。

○児玉専門委員 皆さんが共通して思っているのは、ETXタンパク質がどういうタンパク質で、それはどういうふうに哺乳類に対して作用するのかというところの記載がないところが一番大きいと思いますので、そこをきちんと記載していただいて、それに対して今回のタンパク質はどう違うのかというのをはつきり申請書の中で議論していただく。我々はそれをもう一度見て、そういうことであれば大丈夫だねという確認をすることが必要なのではないかと思います。

○中島座長 もっともだと思えますけれども、先生方いかがでしょうか。このタンパク質は初出ですので慎重を期したいと思えますし、彼らの説明はそれなりに論理的で納得のい

くものではあったと思いますが、形に残る申請書では哺乳類またヒトに毒性を示すものかどうか。今回の申請のものとはここが明らかに違うからということも彼らも論理を組み立てると言っておりましたので、そのようにしていただいて、後でまた見させていただきたいと思います。それでよろしいでしょうか。

○山川専門委員 私が思うのは、児玉先生がおっしゃったように見てわかりやすいというのがすごく重要で、初めて出てくるので、いろいろな人が見てぱっとわかりやすいように論理的に、長く組み立てるのではなくて、ぱっと見てわかりやすいというのが重要なのだと思います。だから諸外国で赤いのが絵でわかるようにしろと言ったのも、何かあったときに、次世代シークエンサーのあれがわからなくても、そこを見れば違うんだというのがピンと来るようにしろという意味だと思うので、それがわかりやすいことが重要だと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

ほかに特に指摘すべき点はございますでしょうか。

○内海課長補佐 1点よろしいでしょうか。先ほど申請者の説明の中でマウスを用いた急性毒性試験に関して、もし必要ならば要旨に記載するということがあったのですけれども、その点に関してはいかがでしょうか。

○中島座長 この点に関しては、普通の90日試験ではなくて2週間の亜急性ではなくて急性の試験でしょうか。橘田先生いかがですか。

○橘田専門委員 それ以前のところで特に問題がなければ、あえてこれは入れなくてもいいのかなと思っております。

○中島座長 いかがでしょうか。

○児玉専門委員 今回のものは論文になっているのです。なので我々が要求して出てきたデータというわけではなくて、論文を引用するというスタイルであれば、私は載せていただいたほうがいいかなと思ったのです。

○中島座長 私も実はそのように感じていて、必ずしもこのデータがなければ通せないというわけではないと思うのですけれども、今回は論文になっているということで、いつでも載せる用意はあると言っているから、載せるように言っただけませんか。

○内海課長補佐 承知いたしました。では先ほどの件とあわせて指摘あるいは要求事項ということで、申請者に伝えたいと思います。

○中島座長 ほかにございますでしょうか。では、その2点、伝達をお願いいたします。

ただいまの意見、確認事項を取りまとめまして、各先生に御確認をいただいた上で、また、私のほうでも確認いたしますが、厚生労働省を通じて申請者に対して指摘したいと思います。

飼料はいいですね。

○内海課長補佐 はい、また次回。

○中島座長 それでは、議題1についてはこれで終わりたいと思います。

議題2のその他ですが、事務局からございますでしょうか。

○内海課長補佐 特にはございません。

○中島座長 ありがとうございます。

本日の議題については、これで終了いたしました。

今後の予定等について。

○山川専門委員 これはやらないのですか。

○中島座長 今日はやらないということで。どうしてもやりたければと思うけれども、でも食品の片がついて整理された申請書が出てくるわけですから、それを踏まえた上で審議したほうが効率がいいと思いますので、今日無理する必要はないかと思います。

では、以上をもちまして第174回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。
お疲れさまでした。