

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第175回) 議事録

1. 日時 平成30年5月25日(金) 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

- ・JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
- ・JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ・CIN株を利用して生産されたキモシン

(2) その他

### 4. 出席者

(専門委員)

中島座長、岡田専門委員、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、手島専門委員、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

- ①JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
- ②JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ
- ③CIN株を利用して生産されたキモシン

### 6. 議事内容

○中島座長 それでは、皆さん、定刻になりましたので、ただいまから第175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基づいて、非公開で行います。

本日、所用により、樋口専門委員は御欠席です。

本日の議題ですが、継続品目である「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」「JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ」及び新規品目である「CIN株を利用して生産されたキモシン」の安全性についての審議です。

それでは、お手元の資料の確認からいたします。

事務局からお願いいたします。

○内海課長補佐 それでは、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です。

机上配付資料としまして、資料①「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」の申請書の差し替え。

資料②「JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ」の申請書の差し替えとなっております。

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、専門委員の皆様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、次回、また配付いたします。

不足等がございましたら、事務局までお知らせください。

また、本日ですが、新規品目であります「CIN株を利用して生産されたキモシン」の申請者であります、DSM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、質疑応答に対応していただくことを予定しております。

○中島座長 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御提出いただい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 提出いただいております確認書について、その後、相違等はありませんでしょうか。

（「はい」と声あり）

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、継続審議品目であります「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」について、審議を行いたいと思います。

本品目は、今年1月の専門調査会において、審議を行ったものです。

事務局から説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、申請者から提出されております、回答書について、御説明いたします。

本件につきましては、今年1月の専門調査会で御審議いただいた際に、申請者に対し、先生方から幾つか御質問や御指摘をいただいたところですが、今回、その内容を踏まえて、申請資料の修正がなされておりますので、該当部分を御説明いたします。

お手元に「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」と書かれました、緑色のプラスチックファイルの御準備をお願いいたします。

それでは、御説明いたします。

回答書の1ページをお願いいたします。指摘事項1といたしまして、第4-2- (3) 挿入遺伝子の機能に関する事項についての御指摘についてでございます。

本件につきましては、要旨の24ページから、こちらの項目が記載されていますが、人工胃液では、処理開始後30秒内に検出限界以下のレベルまで完全に分解されることが示された。人工腸液では、消化開始後6時間経過しても、残存することが示された。

26ページでは「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」のところで、アレルゲンがヒットして得られたという結果でございます。

これにつきまして、指摘事項の①でございますが、既知のアレルゲンとの構造相同性からAMG-GTがアレルギー誘発性を有する可能性を否定し得ないことから、人工胃液、腸液に対する感受性に加えて、加熱処理に対する安定性についても、検討して追記すること。

②タンパク質の三次構造も考慮すれば、AMG-GTのアミノ酸配列の情報のみをもとに得られたシミュレーション解析の結果をもって、*in vitro*での人工腸液に対する感受性の試験結果を否定することは合理性に欠けることから、「生体内腸液における消化の可能性」の記載は削除すること、という2つを御指摘いただいております。

① に対しましては、社内文書11が提出されまして、そのデータとして、図14を回答書の1ページに示しております。pHが4.3、30分の条件では、75～80℃で完全に活性が失われたとしております。

デンプン糖の精製工程における加熱濃縮処理工程は、85℃以上、45分以上で行われるため、本品目におきましても、製造工程において失活するとしております。

②でございますが、こちらは、回答書の2ページの上に記載をしてございまして、該当箇所を削除した旨、記載がされております。

指摘事項2でございます。第4-5- (2) オープンリーディングフレームの検索におきまして、●●●のORF検索は、社内文書19、●●●の模式図で示された構成による領域で行うことということでございましたが、今回、ORFの再検索を行って、その結果が示されてお

ります。

●●●となりました。

なお、こちらの数は、前回のORF検索のときと比較しますと、数は減っておりますが、そのときと異なる新たなORFが検出されなかったことから、要旨本文の考察に変更はございません。

指摘事項3でございます。第5-2-（1）制限酵素による切断地図に関する事項におきまして、①シーケンス解析手法の概要を追記すること、また、社内文書20についても、シーケンス解析結果を反映させた内容に修正すること。

②「抗生物質耐性遺伝子等、懸念のある遺伝子が存在しないことは、サザンブロット解析により確認している」として、社内文書21を引用しておりますが、*amp*遺伝子とインテグラーゼ遺伝子のみのサザンブロット分析であることから、事実に基づく記載に修正することという2つの御指摘でございます。

①についてでございますが、回答書の5ページの上に、次世代シーケンスによるゲノム解析の結果を記載しており、下線を引いておりますが、冗長度などの情報を記載しております。

こちらは、申請書の要旨では、56ページに該当いたします。

要旨の58ページ、59ページの箇所での修正でございますが、●●●につきましては、*amgGT*遺伝子が●●●挿入されている表に修正がされております。

②につきましては、実際に存在しないことを確認した遺伝子のみを記載するように修正がされております。

要旨で申し上げますと、56ページの下から8行目に該当します。「なお」のところで始まる文章でございますが「なお、生産菌を構築する際に用いた抗生物質耐性遺伝子●●●、マーカー遺伝子●●●及びインテグラーゼ遺伝子が存在しないことは、サザンブロット解析で確認している（社内文書21）。」と修正しております。

最後に、回答書の5ページですが、指摘事項4.でございます。こちらは、社内文書19におきまして、Figureの修正になるのですけれども、4.Dと4.Eの塩基対が対応するように、●●●の数が修正されております。

あわせて、同じ社内文書19なのですけれども、3ページの遺伝子座のバンドサイズにも誤記があったということで、こちらを修正しております。

回答書の説明は、以上でございます。

続いて、机上配付資料について、御説明いたします。

机上配付資料1をお願いいたします。要旨ですと、51ページに該当しまして、こちらは、事前に兎玉先生から御指摘をいただきまして、もともと事前にお送りしたファイルですと、この記載を見る限り、サンガー法ではないかという御指摘をいただいた部分について、申請者に確認をとりました。

その結果なのですけれども、こちらも56ページの記載と同様で、イルミナのシーケンス

を行っているということでありまして、リード長の書き方の部分を、56ページと平仄を合わせていただきまして「平均リード長は●●●という特性がある。」と修正をしております。

事務局からの説明は、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、申請書類の修正箇所につきまして、先生方から御意見をいただきたいと思えます。

指摘事項1は2つありまして、既知のアレルゲンとの構造相同性からAMG-GTのアレルギー誘発性を有する可能性を否定し得ないことから、人工胃液及び腸液の感受性に加えて、加熱処理に対する安定性についても、検討すること。

児玉先生と手島先生からいただいておりますが、児玉先生はいかがでしょう。

○児玉専門委員 データを追加していただきましたので、私はこれでよろしいのではないかと思います。

○中島座長 手島先生はいかがでしょう。

○手島専門委員 熱に対する感受性があるというデータですので、これでよろしいと思えます。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、次は、タンパク質の三次構造も考慮すれば、AMG-GTのアミノ酸配列の情報のみをもとに得られたシミュレーション解析の結果をもって、*in vitro*での人工腸液に対する感受性試験の結果を否定することは、合理性に欠けるというので「生体内腸液に関する消化の可能性」の記載は削除すること。

削除されておまして、これは私と小関先生、児玉先生からなのですが、よろしいですか。

○児玉専門委員 はい。

○中島座長 ありがとうございます。

指摘事項2の要旨36ページ、オープンリーディングフレームの検索で、●●●している根拠として、社内文書19のサザンプロットの分析結果がありますが、そのため、●●●のORF検索は、社内文書19の●●●の模式図に示された構成による領域で行うこと。サザンプロットについての御指摘です。

児玉先生、これはどうでしょうか。

○児玉専門委員 それで対応していただいているようですので、これでよろしいと思えます。

○中島座長 よろしいですか。ありがとうございます。

それでは、指摘事項3ですが、今度は、制限酵素に関する切断地図に関する記載でして、これも2つございまして、シーケンス解析手法の概要を追記すること。

2番目は、抗生物質耐性遺伝子等、懸念のある遺伝子が存在しないことについてござ

います。

どちらも児玉先生からですが、これはどうでしょうか。

○児玉専門委員 シークエンスに関しては、次世代シークエンスで求められるような冗長度等の情報等も記載していただいておりますので、これでよろしいと思います。

あと、もう一つでしたか。

○中島座長 もう一つもお願いいたします。サザンプロットです。

○児玉専門委員 サザンプロットは、それに対応して、記載を変えていただきましたので、それでよろしいと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

私も確認いたしましたけれども、丁寧に直して下さっていると思います。

最後、指摘事項4です。社内文書19で、これはFigureの記載を正しく対応させてくれということで、これも児玉先生からでしたが、どうでしょうか。

○児玉専門委員 こちらの思っていたとおりに修正していただいたので、これでよろしいと思います。

○中島座長 私も一応確認いたしました。丁寧に直して下さっていると思います。

先生方、ほかにございませんでしょうか。

全体を通じて、安全性懸念等に関する御質問等はございませんでしょうか。よろしいようですね。

それでは、本件については、特に安全上、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。

事務局、お願いいたします。

○山口係長 それでは、評価書案について、御説明いたします。

評価書案を束ねた冊子の1ページから18ページまでが、本品目の評価書案となっております。

6ページをお願いいたします。「Ⅰ．評価対象添加物の概要」でございますが、*Gloeophyllum trabeum* NN055575株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を、宿主であります *Aspergillus niger* BO-1株に導入いたしまして、JPAN001株を作製しております。

本添加物は、多糖類の $\alpha$ -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して、 $\beta$ -D-グルコースを生成する酵素でございます。

「Ⅱ．食品健康影響評価」以降には、食品健康影響評価に係る個別の項目を記載しております。

「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」の1. (1) (2) については、記載のとおりでございます。

「(3) 用途及び使用形態」でございますが、デンプン糖の製造において、デキストリンを糖化して、グルコースにまで分解することで、糖化効率を向上させることを目的とし

ているということでございます。

「(4) 摂取量」については、記載のとおりでございます。

2. (1) 宿主の種名等でございますが、宿主は、自然界から分離された菌株に突然変異誘導を行った *Aspergillus niger* BO-1株となっております。

(2) DNA供与体の種名でございますが、グルコアミラーゼ遺伝子である *amgGT* 遺伝子は、*Gloeophyllum trabeum* NN055575株、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、それぞれ *Aspergillus nidulans* Glasgow野生株、*Aspergillus nidulans* NRRL1092株に由来いたします。

(3) 挿入DNAの性質等でございますが、*amgGT* 遺伝子は、野生型グルコアミラーゼと同一のアミノ酸配列を持つAMG-GTをコードいたします。

*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子については、選択マーカーとして用いられており、両遺伝子を含む発現カセットは、インテグラーゼにより宿主ゲノムに導入されております。

なお、生産菌の作製に当たっては、7つの遺伝子を欠失させており、このうち4つの遺伝子では、セルフクローニングに該当するとしております。

3. 食経験、4. 宿主の構成成分、5. 組換え添加物の性質等については、記載のとおりでございます。

6. 相違点でございますが、従来の添加物との相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なること、さらにAMG-GTは、AMGと比較して、イソマルトース合成活性が低く、また、グルコアミラーゼ比活性が高いこととなっております。

宿主との相違点は、*amgGT* 遺伝子が複数コピーされ、グルコアミラーゼの高生産性を獲得している点、*amdS* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子を導入している点並びにグルコアミラーゼの生産性を高めるため、幾つかの遺伝子を欠失させたことが相違点でございます。

以上から、本品目と比較可能な既存の添加物があることを記載しております。

「第2. 宿主に関する事項」について、1は記載のとおりでございます。

2. 病原性等についてですが、宿主はバイオセーフティーレベル1に相当し、オクラトキシンA及びフモニシンB<sub>2</sub>を産生しない旨、記載をしております。

3及び4については、記載のとおりでございます。

5. 宿主の有害生理活性物質の生産に関してでございますが、*Aspergillus niger*の近縁種である *Aspergillus fumigatus*は、日和見感染及び気管支アレルギーの原因であること、*Aspergillus carbonarius*については、オクラトキシン産生能を有することが知られている旨、記載をしております。

「第3. ベクターに関する事項」については、記載のとおりでございます。

なお、第3の1のところ、下線部のところとして、由来を事前にお配りしたところから、追記させていただきました。

10ページをお願いいたします。192行目から「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」でございます。

1. (1) については、記載のとおりでございます。

(2) 安全性についてですが、*Gloeophyllum trabeum*は、食経験は知られておりませんが、自然界に広く存在しており、産業上有用な酵素を生産することが報告されております。

*Aspergillus nidulans*は、食経験は知られておりませんが、アセトアミダーゼをコードする*amdS*遺伝子は、長年利用されてきた実績がございます。

これらの2つの菌は、バイオセーフティーレベル1に該当する旨を記載しております。

2. (1) クローニングに関する事項でございますが、挿入遺伝子は、それぞれの供与体より、PCRによって得られた旨、記載をしております。

(2) 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」でございますが、*amgGT*遺伝子でございます。

aとしまして挿入遺伝子の供与体、bでは遺伝子産物について、それぞれアレルギー誘発性の可能性が低い、あるいはアレルギー誘発性を示唆する報告がなかった旨、記載をしております。

cでございますが、人工胃液試験の結果、開始後0.5分以内に分解されること、人工腸液試験では、開始後6時間を経過しても、残存することを記載しております。さらに加熱処理に対する感受性は、75～80℃、30分で失活することが確認された旨、記載をしております。

d. 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性ですが、こちらは、検索の結果、*Schizophyllum commune*由来のグルコアミラーゼであります、Sch c1と連続する80アミノ酸配列で35%以上の一致、そして、連続する8アミノ酸の一致が確認されました。

しかし、AMG-GTは、人工胃液中で速やかに分解されること、AMG-GTの摂取量は、AMGよりも低いと想定されることなどを考慮すると、アレルギー誘発性の可能性は低いと考察した旨を記載しております。

このほかの②③の遺伝子については、記載のとおりでございますが、これまで長年使用されてきた実績等により、問題ないという旨を記載しております。

3. (1) (2) プロモーター、ターミネーターについては、記載のとおりでございます。

隣のページに移りまして(3) その他の配列等でございますが、*amgGT*遺伝子の転写を安定化させる配列、そして、*amgGT*遺伝子の転写産物を安定化させ、遺伝子発現量を向上させる配列等を用いております。

4については、記載のとおりでございます。

5. 発現ベクターに関する事項ですが(1)は記載のとおりでございます。

(2) 目的外ORFの項目についてですが、こちらは各遺伝子座の挿入部位の上流及び下流領域を含む発現カセット配列について、6つの読み枠において、終止コドンから終止コドンで終結する、連続する30アミノ酸以上の条件で検索を行いましたところ、合計で1,074個のORFが確認されました。

これらについて、相同性検索を行いましたところ、相同性を示す既知のアレルゲンとし

て検索されたものがございましたが、結論といたしましては、安全性に影響を及ぼす可能性は低いと考えられております。

毒性タンパク質についても、6個確認されましたが、いずれのタンパク質も、それ単独では毒性を示す可能性が低いと考えられる旨、記載をしております。

14ページをお願いいたします。(3) (4)については、記載のとおりでございます。

6. DNAの導入方法でございますが、インテグラーゼ認識配列を導入した宿主に遺伝子導入用のベクターを導入し、ベクター上の*FLP*遺伝子が発現するインテグラーゼの作用により、発現カセットを宿主ゲノムに導入しております。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子に関しましては、宿主の染色体に含まれていない旨、記載をしております。

「第5. 組換え体に関する事項」ですが、1は記載のとおりでございます。

2. (1) ですが、設計どおり、全長の発現カセットが挿入された遺伝子座と、1つの*amgGT*遺伝子がループアウトした遺伝子座があることが確認されております。

(2) ORFの有無の項目でございますが、こちらは、*amgGT*遺伝子、*amdS*遺伝子を含む発現カセットの挿入領域及び隣接する配列のORFの検索は、第4-5-(2)に記載をしております。

また、欠失させる7つの遺伝子のうち、セルフクロニングを除く3か所の遺伝子座について、検索を行いましたところ、6つの読み枠で終止コドンから終止コドンで終結する、連続する30アミノ酸以上の条件において、合計289個のORFが確認されました。

これらについて、データベースを用いた検索を行いました結果、相同性を示す既知のアレルゲン、毒性タンパク質はなかった旨、記載をしております。

「第6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関連する事項」「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」の1については、記載のとおりでございます。

2. 組換え体の残存については、ドットプロット分析の結果、組換え体DNAは検出されない旨を確認しております。

3～5については、記載のとおりでございます。

「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」としまして、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旨、記載をしております。

評価書案の説明は、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、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。お気づきの点などはございますでしょうか。

どうぞ。

○手島専門委員 1点だけ、細かい点なのですが、13ページの321行目なのですが、アレルゲンデータベース「b」となっているのですが「c」だと思いますので、確認をお願い

いたします。

○中島座長 確認してください。

○山口係長 確認の上、修正させていただきます。

○中島座長 このような細かい字句等の修正につきましては、後ほど修正箇所を事務局までにお伝えいただいても結構でございます。

よろしいでしょうか。

よろしいようなので、いただいた修正につきましては、事務局で修正の後、私のほうでも確認いたしまして、食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。

それでは、グルコアミラーゼは終了です。

続いて、継続審議品目であります「JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼ」について、審議を行いたいと思います。

本品目は、今年2月の専門調査会において、審議を行ったものです。

事務局から、説明をお願いいたします。

○森山評価専門官 本件については、2月の専門調査会で御審議いただいた際、申請者に対して、先生方から幾つか質問や指摘をいただいているところですが、今般、その内容を踏まえ、申請資料の修正がなされていますので、該当部分を御説明いたします。

水色の紙ファイルを御用意ください。

1ページ目になりますが、指摘事項1としまして、要旨の第4-2-(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項についてです。

(1) としまして、人工腸液に対する感受性の試験により、観察された分子量●●●のバンドについての記載がされていますが、要旨の18ページに、腸液処理に関するSDS-PAGEとウェスタンブロットのデータが記載されています。

その中のSDS-PAGEで、●●●のところにはバンドが観察されていますが、ウェスタンブロットでは、●●●は抗体により検出がされておらず、そのことについて、社内文書の8、iPadだと②の8とありますが、その中で、LC-MS/MSにより、SP387というのが、今回のGM品になりますが、●●●は、SP387の一部であることが確認された旨の記述がされております。

一方で、後半の部分で、純度試験に係るところにおいては、●●●に対しては、不純物と推測されたとの記載がされて、矛盾があったところもありましたので、LC-MS/MSの報告書を提出の上、●●●に対するタンパク質の由来について、考察を加えることとの指摘になっております。

回答としましては、その下に(1)とありますが、LC-MS/MSの報告書は、回答書添付資料として、回答書添付資料1にデータが添付されております。この中にもありますが、SDS-PAGEによるタンパク質の分離後、分子量が●●●の範囲にあるバンドや、分子量が●●●の範囲にあるバンドなどのゲル断片を取り出して、LC-MS/MS分析にかけておりま

す。

その結果、いずれの場合も、得られたペプチド配列は、今回のGM品であるSP387特有のものであることが確認されている旨の記載がされております。よって、分子量が●●●の範囲にある●●●のバンドは、今回のGM品であるSP387の一部であると考えられております。

よって、要旨は、下の黄色いマーカー部分になりますが、●●●の部分について、これらのバンドは、LC-MS/MS分析により、今回のGMのSP387の一部であることが確認されている旨、記載がされております。

(2) になりますが、その後、GMのSP387と構造相同性を有するとして検出された既知のアレルゲンに関する考察の部分におきまして、ヒットしたアレルゲンの相同性スコアに関しては、SP387と既存品のPTNは、同等の値を示したとの記載がされておりますが、相同性スコアはともに低いため、それをもって安全だというロジックにはならないという指摘から、この部分については、削除をするように指摘をしております。該当箇所につきまして、12か所ほどありますが、要旨は削除されております。

(3) の指摘内容ですが、既知のアレルゲンとの構造相同性から、SP387がアレルギー誘発性を有する可能性を完全に否定できないことから記載されています。胃液処理では、2分で分解されていますが、腸液処理では、6時間後でもバンドが残ること、ヒットしたアレルゲンが11個ほどあるというところからも、加熱に対する感受性に関するデータを提出するように、指摘をしております。

実際のデータは、回答書添付資料2と回答書添付資料3に、それぞれ既存品とGM品のデータが記載されてありますが、2ページ目に比較された図があります。

この中で、それぞれ30分処理をしたところ、今回のSP387は60℃、既存品は70℃で完全に失活すると記載がされております。

今回のGM品は、使用を想定されているのは、ホエイやカゼインの製造プロセスなのですが、この段階で、酵素処理後に85℃、15分の処理や、限外濾過処理が行われるため、基本的にその工程で酵素は失活すると考えられる旨の記載がされております。

指摘事項2になりますが、第4-5-(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ORFが含まれていないことについてですが、(1) としまして、構造相同性を有するとして検出された、既知の毒性タンパク質に対する考察として「複数の構造モチーフを充足するレベルではない」との記載がされておりますが、それについての言及がなされていないことから、該当部分の記述を削除することという指摘に対して、適切に削除がされております。

(2) になりますが、欠失導入用ベクターの宿主ゲノムの挿入DNA領域についても、ORF検索の結果を示すこと、あるいは第5-2-(2) で、当該領域も含めた検証をしているため、後述する旨の説明をつけること、という指摘に対しまして、第5-2-(2) で記載をしているという旨が、要旨で修正をされております。

3ページになりますが、指摘事項3ですが、先ほどお話しした内容と重複しますが、●●●の部分をもともと不純物と想定し、●●●という純度ですということで記載がされていたのですが、不純物と仮定した考察を削除の上、適切に記載をすることとなっております。

繰り返しになりますが、指摘事項の最初に申しあげましたように、LC-MS/MS分析の結果から得られたバンドは、いずれも今回のGMのSP387特有のペプチド配列を有することが示されております。

それを踏まえ、要旨が修正されておりますが、黄色いマーカーの部分になります。●●●のタンパク質は、ウェスタンブロットで検出されていませんが、この理由としては、使用したポリクローナル抗体を作製する際、エピトープとして認識されなかった可能性が考えられる。また、一方で、LC-MS/MS分析により、SP387特有のペプチド配列を有することが確認をされております。

よって、タンパク質は、全てSP387、または、SP387の分解物であると考えられ、結果としては、製剤中のタンパク質は、全てSP387と推定されたという記載に修正がされております。

ほかの2か所は修正事項になりますが、1としまして、アレルゲンのところで「Can a ?」というところが「Cand a ?」が正しいというところでしたので、それに基づき、適切に修正がされております。要旨は、37ページで記載が修正されております。

2ですが、ドットプロット分析によって、残存するDNA解析の結果の図になりますが、検出限界を調べたものと、酵素サンプルからDNA検出結果をしたものと、プロセス、抽出過程が多少違うので、一緒の図にしてしまうとわかりづらいところで、AとBに分けて記載がされております。

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、修正箇所につきまして、先生方から御意見をいただきたいと思っております。

●●●の謎のバンドがあったところでひっかかっていたのですが、これが当該タンパク質のSP387の一部であることを突きとめてくれたおかげで、ほとんどの疑問は解消したように思います。

最初の問題は、●●●のバンドについて、考察を加えることということで、私と橋田先生、手島先生からですが、私は、これで突きとめてくれたのならいいと思っておりますが、橋田先生はいかがでしょう。

○橋田専門委員 提出されたMSのデータを拝見したのですけれども、●●●ゲルの切り出しを行いMSにかけております。●●●バンド、●●●を一緒にかけています。そして、●●●に切り取られているのは、バックグラウンドに当たるもっと小さなところですが、データ●●●がどの切り出しゲルに対応しているか明示していないので正確にはわかりませんが、出てきているパターンからすると、データ●●●が●●●を含むものだと思うのですけれども、●●●に由来する配列が確実に読めているかどうかというのは、このデ

ータからでは、絶対に正しいとは言えないかもしれませんが、ほかの配列が出ていないの  
でしたら、●●●からもペプチドが出てきて、それが読まれているのではないかとは思  
います。しかし、なぜバンドを1つずつ切り出してやってくれなかったのかというのは、疑  
問に思います。

あと、バックグラウンドのところ、こんなに小さなサイズをきれいに読めているとい  
うのは、単なる印象ですけれども、よく読めているな、という印象は持ちました。

以上です。

○中島座長 手島先生はいかがでしょうか。

○手島専門委員 私も、ペプチド解析から、●●●が、恐らくもとのタンパク質由来だろ  
うということがわかりましたので、これでよろしいと思います。

○中島座長 おおむねよろしいと思います。

それでは、2番目、既知のアレルゲンに関する考察についてなのですが、相同性スコア  
について、これについては、PTNの使用実績に基づいて、SP387の安全性を説明する根拠  
とはならないから、削除してくれということで、私と澤田先生の指摘なのですが、これは  
削除されておりますので、よろしいと思います。

既知のアレルゲンとの相同性解析で、加熱に関する感受性について、このデータを出し  
てくれということで、児玉先生、柘植先生、手島先生から、そろって御指摘があった問題  
です。

児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 特段、このデータで、安全性で問題になるようなところは見受けられま  
せんので、これでよろしいと思います。

○中島座長 柘植先生はどうでしょうか。

○柘植専門委員 結構です。

○中島座長 手島先生はどうでしょうか。

○手島専門委員 両方で同様の熱感受性を示すということで、問題ないと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

次は、指摘の2番目で、最終的に構築されたベクターで、ORFが含まれていないこと  
について、毒性タンパク質に関する考察としてなのですが、構造モチーフ領域との相同性  
について言及されていないので、当該記述は削除することと、これは児玉先生の御指摘  
ですが、削除されていますね。よろしいですか。

○児玉専門委員 はい。

○中島座長 ありがとうございます。

欠失導入用の宿主ベクターの挿入DNA領域について、ORF検索の結果を見てくれとい  
うことで、私が要求したのですが、第5-2-(2)のところを見てくださいっていて、記述が加え  
られておりますので、私はこれでいいと思います。

3番目、要旨の最後のほうですが、●●●に相当するタンパク質、初めは不純物と仮定

していた考察だったのですが、これを削除の上、適切な試算による製剤中のSP387の純度を示すこと、これは私と児玉先生からで、回答書が黄色い文章になっていて、この部分で、問題の●●●がSP387に由来するということが書いてあります。

回答の文章なのですが「CBB染色に基づいた製剤中のタンパク質はすべてSP387と推定された」とあります。最初の●●●のところは、橘田先生の御指摘のとおりで、なぜこれを1つだけきっちり切り出して見てくれなかったのか、そこに疑問があるので、これで「すべて」と言われてしまうと、少しだけひっかかります。「すべて」ではなくて「大部分」とか、「すべて」ではない記述にしていきたい。

私は気になるのですが、児玉先生、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 今、座長がおっしゃるとおりでございます。「すべて」ではないほうがよろしいのではないかと思います。

○中島座長 そのところですか。事務方はよろしいでしょうか。

○森山評価専門官 要旨は修正をするようにしてもらいます。

○松井技術参与 橘田先生の疑問に対して、申請者に聞いております。

SDSゲルの2番目のブロックは、●●●を一緒に含むので、出てきたペプチドが全部製剤由来の断片であるかどうかを確認しましたら、確認しているということです。検出された断片情報も提出されておまして、SP387由来のアミノ酸に全部合致しておりました。

○中島座長 確認はされているということなのです。それではあっても「全て」というのは、少し削っていただきたいと思います。

橘田先生、それでよろしいですか。

○橘田専門委員 はい。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、全体を通しまして、ほかの先生方から、御指摘等はございますでしょうか。

先生方、この件はよろしいでしょうか。

それでは、本件につきましても、特に安全上、問題がないということでありますので、評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局からよろしく願いいたします。

○森山評価専門官 それでは、評価書案の説明をいたします。

評価書案、束になったページの24ページをお願いします。

「I. 評価対象添加物の概要」としまして、名称はJPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼとなります。

本添加物は、*Fusarium venenatum* A3/5株を宿主とし、*Fusarium oxysporum* DSM2672株由来のプロテアーゼ遺伝子を導入して作製した、JPFV001株を利用して生産されたプロテアーゼである。

本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解して、ペプチドやアミノ酸を生成させる酵素であり、乳製品の製造において、乳由来タンパク質を適度に分解する

ことにより、低アレルゲン化させることを目的として、使用されます。

なお、選択マーカーとして、*Streptomyces hygroscopicus*由来のホスフィノスリシンアセチル基転移酵素遺伝子及び*Aspergillus nidulans*由来のアセトアミダーゼ遺伝子が導入されております。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」としまして「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」の「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) 名称としましては、トリプシン、基原はブタの膵臓と記載をしております。

「(2) 製造方法」ですが、PTN既存品のものは、ブタ膵臓の抽出物を精製して製造されます。

(3) 用途ですが、PTNは、乳製品の製造において、乳由来ホエイタンパク質及びカゼインタンパク質を適度に分解することにより、低アレルゲン化させることを目的として、使用されます。

タンパク質の加水分解効率が比較的低く、また、切断部位に苦みを呈しやすい疎水性アミノ酸残基ではなく、親水性アミノ酸残基を露出する傾向にあるため、ほかのプロテアーゼと比較して、苦みが出にくいものになっております。

「(4) 摂取量」については、記載のとおりです。

25ページ「2. 宿主及び導入DNA」ですが、(1) 宿主は、英国の土壌から単離された*Fusarium venenatum* A3/5株である。

(2) DNA供与体の種名になりますが、プロテアーゼ (*tlpSP387*) 遺伝子の供与体は、*Fusarium oxysporum* DSM2672株である。選択マーカーである遺伝子及び*amdS*遺伝子の供与体は、それぞれ*Streptomyces hygroscopicus* ATCC21705株及び*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株であると記載をしております。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」になりますが、*tlpSP387*は、遺伝子発現カセットをプロトプラスト法により、宿主である*Fusarium venenatum* A3/5株に導入したとなっております。なお、トリコテセン産生能を失わせるため、その合成経路における最初の酵素であるトリコジエン合成酵素をコードする遺伝子を、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させ、*amdS*遺伝子と置換しております。

3については、記載のとおりとなっております。

「4. 宿主の構成成分等に関する資料」になりますが、*Fusarium venenatum* A3/5株は、動物試験における毒性及びヒト喫食試験におけるアレルギー反応のいずれも認められておりません。*Fusarium*属は、A型トリコテセン及びフザリンC並びに動物への毒性が示唆されているブテナライド等のマイコトキシンを産生する可能性があるとしてされています。今回の宿主の株では、トリコジエン合成酵素遺伝子を欠失させた結果、いずれのマイコトキシンの産生も検出限界未満であることを確認している旨、記載をしております。

26ページ「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

名はSP387、有効成分はプロテアーゼとしております。

「(2) 製造方法」ですが、比較対象としている従来品は、動物組織からの抽出物になりますが、これと異なり、今回のJPFV001株を生産菌とし、培養工程、濾過等の製剤化工程を経て、製造されます。なお、2回の除菌濾過により、分離除去されております。

(3) (4) については、記載のとおりです。

「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」についてですが「(1) 組換え添加物と従来の添加物の相違点」は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なる点となっております。

「(2) 組換え体と宿主の相違点」としましては、今回のJPFV001株には、*tlpSP387*遺伝子が導入され、SP387の生産性を獲得している点、*bar*遺伝子及び*amdS*遺伝子が導入されている点並びにトリコジェン合成酵素遺伝子が欠失している点であると記載をしております。

以上の1~6から、本添加物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、以降の評価を行っております。

「第2. 宿主に関する事項」の1の宿主については、記載のとおりです。

27ページの「2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」ですが、*Fusarium venenatum*は、病原性であるという報告はなく、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。

3、4、5については、記載のとおりです。

「第3. ベクターに関する事項」ですが、遺伝子導入用ベクターpJPV005及び欠失導入用ベクターpLC31bの作製には、*E.coli*由来のプラスミドpUC19が用いられたと記載をしております。先ほど説明を忘れてしまいましたが、机上配付資料のところでも差し替えていますが、MV1184株はCompetent Cellsの由来の書きぶりをしていたので、そこを削除し、*E.coli*由来のプラスミドpUC19という記載をさせていただいております。

2. 性質に関する事項ですが (1) (2) (3) については、記載のとおりとなっております。

28ページ「(4) 薬剤耐性に関する事項」ですが、プラスミドpUC19には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれています。

(5) (6) については、記載のとおりです。

「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」ですが、1の(1) (2) については、記載のとおりとさせていただきます。

「2. 挿入DNA及び遺伝子産物の性質に関する事項」ですが、(1) 挿入遺伝子のクローニングに関する事項ですが、*tlpSP387*遺伝子は、*Fusarium oxysporum* DSM2672株のゲノムから、PCRにより得られております。

次のページにかかりますが、*bar*遺伝子及び*amdS*遺伝子においても、それぞれのゲノムから、PCRにより得られております。

29ページの(2)については、記載のとおりです。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」の「① *tlpSP387* 遺伝子」についてですが、a としまして、*Fusarium oxysporum* は、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

「b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見」ですが、SP387を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。*Fusarium oxysporum* のプロテアーゼにおけるアレルギー誘発性の可能性を調べるため、文献検索を行った結果、示唆する報告はなかったと記載をさせていただいています。

「c. 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」の「(a) 人工胃液に対する感受性」では、SDS-PAGE及びウエスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後2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」については、SDS-PAGE及びウエスタンブロット分析を行った結果、試験開始後6時間においても、分解されないことが示された。

「(c) 加熱処理に対する感受性」としまして、感受性についての確認をした結果、60℃、30分で失活することが確認されたと記載をさせていただいております。

「d. 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、構造相同性の有無を確認するために、データベースで相同性検索を行った結果、次のページにかかりますが、連続する80アミノ酸以上の配列に対して、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、それぞれ18個及び11個検出がされております。

これらは、ハウスダストに含まれるダニ及びゴキブリのセリンプロテアーゼなどであり、SP387のセリンプロテアーゼの活性中心として、高度に保存されている部位において、連続する8アミノ酸配列の一致が認められたが、当該部位は、既存添加物として使用されてきたブタ膵臓由来のトリプシンにおいても同一であり、構造相同性の比較の結果、アレルギー性の懸念は低いと考えられる旨、記載をさせていただいております。

「② *bar* 遺伝子」「③ *amdS* 遺伝子」については、記載のとおりですが、毒性を示す報告はないと記載をしております。

3. (1) (2) (3) については、記載のとおりです。

31ページになりますが、4. ベクターの組込み方法に関しても、記載のとおりとさせていただきます。

「5. 構築された発現ベクターに関する事項」ですが(1)は記載のとおりです。

(2) 最終的に構築された発現ベクターに、目的以外のORFが含まれていないことの確認なのですが、それぞれORF検索を行った結果、6つの読み枠において、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183個検出されました。

これらのORFと既知のアレルゲンの相同性の有無を確認するために、データベースで相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続した8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンが、2個の

ORFに対して、17個検出されました。

このうち「Cand a ?」以外の既知のアレルゲンは、SP387のコード配列で検出されたものと同一であった。「Cand a ?」については、侵入性カンジダ症患者抗体反応を示す接触性抗原として登録されているが、全長でのSP387との相同性は10%であった。

なお、これらのORFと毒性タンパク質との相同性の有無を確認するため、データベースの検索を行った結果、5個のORFが相同性を示したが、いずれのタンパク質も、機能から考えて、アレルギー誘発性、毒性を有する可能性は低いと考えられた旨の記載をさせていただきます。

32ページの(3)(4)については、記載のとおりです。

6. 導入方法に関する事項についても、記載のとおりとさせていただきます。

7. 抗生物質耐性マーカーについてですが、遺伝子導入用ベクターには、アンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されないことを、サザンブロット分析により確認をしております。

「第5. 組換え体に関する事項」ですが、1.は記載のとおりです。

「2. 遺伝子導入に関する事項」としまして(1)になりますが、全ゲノム解析を行った結果、任意の1か所に多コピーがタンデムに導入されていることが推察された。また、宿主の遺伝子の欠失の可能性は低いことが示された。さらに定量PCRを用いて、*t1pSP387/bar*遺伝子発現カセットのコピー数を解析した結果、多コピーの導入が確認された旨、記載をさせていただきます。

(2) ORFの有無に関する事項ですが、ORFの有無を確認するため、各挿入DNAの5'近傍配列を含む領域及び3'近傍配列を含む領域におけるORF検索を行った結果、連続する30アミノ酸以上のORFは、合計で104個検出されております。

33ページになりますが、これらについて、相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸残基で35%以上が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。また、連続して8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンとして、hemocyaninが検出された。しかしながら、IgEとの結合には、かなり高濃度のhemocyaninが必要であることが報告されていること、その主要なエピトープが高次構造レベルで免疫原性を示す可能性及び糖鎖等の修飾分子により、覆われている可能性が示唆されていることなどから、仮にORFが生産菌内で翻訳された場合であっても、アレルギー性の懸念は低いと考えられたと記載をさせていただきます。

なお、毒性タンパク質との相同性の有無の確認のために、データベースで検索を行った結果、3個のORFが相同性を示したが、いずれのタンパク質も機能から考えて、それ自体がアレルギー誘発性及び毒性を有する可能性は低いと考えられたと記載をさせていただきます。

「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」の1と2については、記載のとおりです。

「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」の1. 諸外国における認可状況としまして、フランスでは、食品用加工助剤のポジティブリストに収載され、アメリカでは、GRASとして認証されている。

「2. 組換え体の残存に関する事項」としましては、ドットプロット分析により、SP387製剤中には、組換えDNAが残存しないことが確認された。

3については、記載のとおりです。

34ページの「4. 精製方法及びその効果に関する事項」ですが、今回のSP387は、生産菌の培養物を濾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ことは考えにくい。

5. 含有量については、記載のとおりです。

「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」としまして、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記載をさせていただきます。

なお、参考としまして、除菌濾過後の培養液を濃縮したものを被験物質に用いた変異原性試験及び13週間の反復投与毒性試験のデータを参考として、記載をさせていただきます。

評価書の説明は、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が、先生方、何かございますでしょうか。

34ページの441行目、細菌を用いた復帰突然変異試験で、サルモネラは株なので「*Salmonella typhimurium*」は斜字体ではなくていいのではないかと思います。確認していただければと思います。

○森山評価専門官 修正します。

○中島座長 先生方、いかがでしょうか。よろしいでしょうか。

よろしいようなので、修正につきましては、事務局で修正後、私のほうで確認し、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に進みたいと思います。ありがとうございました。

それでは、本日の本命ですが「CIN株を利用して生産されたキモシン」新規品目ですが、審議を行いたいと思います。

それでは、事務局から説明をお願いいたします。

○内海課長補佐 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。

冒頭でも御紹介いたしましたが、本日は、申請者のDSM株式会社の方をお呼びしておりますので、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。

が、整理をいただきたいと思います。その後に、説明者に入室をいただきまして、質疑応答を行い、終了後、説明者には退室いただいて、審議を再開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ですけれども、緑の紙ファイルになります。資料③「CIN株を利用して生産されたキモシン」に沿って、御説明をいたします。

要旨の部分の1ページ「はじめに」の部分をご参照ください。本酵素ですけれども、凝乳活性の向上を目的として、ウシ由来のプロキモシン遺伝子を酵母である *Kluyveromyces lactis* に挿入して、得られた *K.lactis* CIN株を利用して、生産されるキモシンとなっております。

キモシンは、自然界では、哺乳中のウシ、ヤギ、ラクダなどの反すう動物の第四胃に存在し、乳のκ-カゼインを加水分解して乳を固まらせ、母乳の消化を助ける酵素の混合物であります、レンネット中に存在する主要な凝乳酵素です。何世紀にもわたりまして、チーズ等の製品に利用されているものです。

生産菌の作製の概要は、2ページの図Aに記載がございますので、冒頭に簡単に御説明をしておきます。最初の野生株、●●●株にウシ由来のプロキモシン (*CHYB*) 遺伝子を導入したものが既に厚生労働省で安全性審査を経ておりまして、この生産菌が●●●株となっております。

この生産菌株から、●●●DS30216株となっております、今回、申請書において宿主として位置づけているのが、この株になります。

この宿主株に凝乳活性を向上させるために、アミノ酸置換を生じる変異を導入したプロキモシン遺伝子と、キモシンタンパク質のジスルフィド結合の形成を促進するプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子の●●●を導入し、さらに●●●したものが、最終的に得られている生産菌CIN株となっております。

3ページをご覧くださいまして、第1の「1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料」です。

(1) 名称ですが、レンネットです。別名としまして、キモシン、レンニン等々あります。

基原は、哺乳中の反すう動物の第四胃です。

有効成分はキモシンです。

「(2) 製造方法」は記載のとおりですが、動物由来のものに関しては、若い家畜を屠畜して、胃を摘出し、室温、あるいは微温の水、もしくは酸性水溶液で抽出して得られます。

微生物由来のものもございまして、酵母菌、糸状菌、担子菌、細菌の培養液より、室温、あるいは微温の水、または酸性水溶液、冷時エタノール、含水エタノールで抽出するとあります。

「(3) 用途及び使用形態」ですが、チーズや発酵乳製品を製造する際に、凝乳酵素として加えて利用するものです。

4ページ「(4) 摂取量」になります。平成27年の国民健康・栄養調査報告に基づきまして、国民一人当たりの1日のチーズ及びヨーグルトを含む発酵乳・乳酸菌飲料の消費量は、平均でそれぞれ3.3 g/人/日及び36.3 g/人/日となっております。

キモシンがこれらの食品を製造する際に、推奨使用量の最大量が添加されることを仮定して、キモシンの推定最大摂取量が算出されております。表1にまとめがございまして、チーズに関しては、0.126 mg TOS/人/日、発酵乳・乳酸菌飲料においては、100%がヨーグルトを含む発酵乳と仮定して算出した結果、0.008 mg TOS/人/日、合計としまして、0.134 mg TOS/人/日と推定されております。

5ページ「2 宿主及び導入DNA」です。(1)ですが、宿主は、*Kluyveromyces lactis* DS30216株で、チーズから単離された*K.lactis* ●●●株由来のものです。先ほど御説明したとおり、安全性審査を経た遺伝子組換えのキモシンの生産菌●●●株から、ウシ由来のプロキモシン遺伝子を含む挿入DNA断片を除去することにより、構築されております。

なお、既に安全性審査済みのウシ由来プロキモシンと、今回、導入しているプロキモシン遺伝子は、異なるものという説明になっております。

DS30216株の宿主と野生株との主たる差異ですが、●●●が組換えの操作、導入遺伝子の除去の過程で欠失している点が差異となっております。

6ページの(2) DNA供与体ですが、表に挿入DNAとその供与体の一覧がございまして、プロモーターとターミネーターは、それぞれ4種類記載がございまして、詳細については、後ほど御説明をいたします。プロキモシン遺伝子、ターミネーターのうちの1つ、3' UTRターミネーターは、ウシ由来です。それ以外は、全て*K.lactis*のNRRL Y-1140株由来となっております。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」ですが、表3に記載がございまして。

7ページに移っていただいて、構造遺伝子の部分ですけれども、まず $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド、これはプロキモシントタンパク質を菌体外に分泌させるために、プロキモシン遺伝子に連結をしております。●●●が同部位に作用することを利用して、シグナルペプチドとプロキモシンを正確に分離するものです。

プロキモシン遺伝子は、プロキモシントタンパク質をコードするもので、生産されたプロキモシンは、低pH処理を行うことにより、自己触媒的にプロ領域が切断され、成熟型のキモシンとなります。

プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子は、キモシントタンパク質のシステイン残基のジスルフィド結合形成を触媒し、キモシンが正常に機能することを助ける目的で導入されております。

表の下段になりますけれども、これらの遺伝子を含む各コンストラクトは、宿主ゲノムの3つの遺伝子座に相同組換えにより、導入をされております。宿主への導入方法への詳細は、後述いたします。

8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、記載のとおりです。

「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)の製品名はMaxiren XDS、有効成分はキモシンです。

「(2) 製造方法」は、従来の食品酵素の製造方法と同様であるとしております。

10ページですが、製造工程のフローチャートが記載されてございます。

「(3) 用途及び使用形態」は、従来の添加物と相違はありません。

「(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」ですが、本キモシンは、ウシ由来のプロキモシタンパク質のアミノ酸配列●●●を置換させており、従来のキモシンと比較して、凝乳活性が向上しております。

6の「(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点」ですけれども、CIN株が生産するキモシンは、凝乳活性向上を目的として、ウシ由来のプロキモシタンパク質のアミノ酸配列のうち、●●●アミノ酸が置換されている。先ほど御説明をしたとおりです。

実際に、図3にプロキモシタンパク質のアミノ酸配列、それから、アミノ酸の置換部位を示してございます。

12ページの「(2) 組換え体と宿主の相違点」ですが、CIN株と宿主の相違点は、 $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域を結合したプロキモシン遺伝子と、MPD2遺伝子が複数コピー導入されたことにより、高いキモシン産生性を獲得している点です。

相同組換えの際に、CIN株では、●●●遺伝子が欠損している点が相違となっております。

「第2 宿主に関する事項」ですが、1の分類学上の位置づけですけれども、宿主は、*Kluyveromyces lactis* DS30216株で、詳細は記載のとおりでございます。

13ページ「2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項」「3 寄生性及び定着性に関する事項」「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については、記載のとおりです。

「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」です。*Kluyveromyces*属真菌が病原真菌となる事例がごくまれに報告されているが、これらのうち、*K.lactis*のケースはわずかであり、多くは、*K.marxianus*に由縁するものである。そのほとんどの患者は、免疫不全状態やカテーテル処置を受けた状態の両方、または、いずれか一方であり、単離された*Kluyveromyces*属真菌は、抗真菌剤に対して感受性があることが示されていることから、これらは、非常にまれな日和見感染症であり、*Kluyveromyces*属真菌が病原体に含まれることを示すものではない旨が記載されてございます。

14ページ「第3 ベクターに関する事項」です。挿入DNAの組込み方法でも後述をしますが、目的遺伝子の発現カセットライブラリーの作製のために、RAVベクターが構築され、さらにコンカテマー作製の外骨格ベクターの作製のために、pFAVベクターが構築されております。さらに最終的にコンカテマーベクターとして、pCAVベクターが構築されておりますが、いずれもpUC18を基本骨格として、構築されております。

名称等については、記載のとおりでございます。

17ページをおめぐりいただきまして、第4の「1 挿入DNAの供与体に関する事項」です。先ほど申し上げましたとおりですが（1）*CHY*遺伝子はウシ由来、*MPD2*遺伝子、 $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域は、酵母菌の*K.lactis*由来です。

「（2）安全性に関する事項」ですが、*CHY*遺伝子の供与体であるウシは、食品添加物のキモシンの基原の1つとして、既に用いられております。

*MPD2*遺伝子及び $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域の供与体であります*K.lactis*は、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティーレベル1に相当するものです。

18ページになりますが、2の「（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」です。*CHY*遺伝子は、●●●アミノ酸置換が導入されるように、化学合成によって得られております。

$\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域も同様に化学合成です。

*MPD2*遺伝子は、*K.lactis*のゲノムDNAを鋳型として、PCRによりクローニングされております。

「（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」については、起債のとおりです。

「（3）挿入遺伝子の機能に関する事項」ですが、*CHY*遺伝子の機能は、記載のとおりです。

19ページに移りまして「B）アレルギー性の有無」ですけれども、*CHY*遺伝子が発現します本キモシンの既知のアレルゲンとの相同性検索を行いました結果、80アミノ酸以上の枠で35%以上の相同性を示すアレルゲンとして、ここに記載がございます4つのアレルゲンが検出されております。連続する8アミノ酸配列が一致する検索では、ペプシンAが検出されております。

しかしながら、下に記載がございますが、Bla g 2及びAsp f 10は、WHO-IUISが指定するアレルゲンのデータベースに含まれるが、食物アレルゲンでなく、環境アレルゲンである。また、ペプシンA及びCPA63は、WHO-IUISのアレルゲンデータベースには含まれていない。ペプシンAは、幾つかの職業性アレルギー喘息や鼻炎に関連しており、また、CPA63は、季節性の花粉症を引き起こすアレルゲンとして単離されていると説明しております。

その下段、一方ですが、天然型のウシ由来のキモシンを用いた同様の相同性検索を実施しましたところ、上記の全てのアレルゲンとの相同性が認められておりまして、本プロキモシンの●●●アミノ酸変異がアレルゲン性に及ぼす影響はないと考えられたと考察しております。

さらにキモシンの物理化学的処理に対する感受性を調べるために、人工胃液、人工腸液、熱に対する感受性を試験しております。

20ページになりますが、図5に人工胃液、人工腸液処理をしたキモシンのSDS-PAGEの

結果を記載してございます。人工胃液の感受性試験では、反応開始後15分から60分間のどの反応時間においても、消化されなかったとなっております。これはキモシンが本来、哺乳中のウシの第四胃に分泌されて、乳の消化を助けることから、ペプシン存在下の低pHの環境下では、安定であるためと考えられるとしております。

一方ですが、人工腸液感受性試験では、反応開始後15分でキモシンのバンドは検出されず、消化されることは確認されております。

また、熱に対する感受性ですが、図6に試験結果が示されております。キモシンの活性は、55℃から下がり始め、65℃では活性はほとんどなくなることが確認されたとしております。

21ページに結論が記載してございますが、本キモシンは、既知アレルゲンとの相同性が認められたが、これら既知のアレルゲンに対しては、天然型のウシ由来のキモシンも同様に相同性が認められたこと。それから、人工腸液や熱に対して感受性を持つこと。これらのことから、本キモシンがアレルギーや経口摂取による感作を引き起こすことは考えにくいと考察しております。

α接合因子分泌シグナルペプチド領域、22ページのMPD2遺伝子の機能については、記載のとおりです。

3の「(1) プロモーターに関する事項」、23ページ「(2) ターミネーターに関する事項」、(3) その他については、記載のとおりです。

「4 ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」です。

概要を御説明させていただきますが、適宜、25ページの図7を御参照いただければ幸いです。

3つの遺伝子発現カセットで構成されたコンストラクトをコンカテマーとしておりますが、これが挿入DNA断片になります。各遺伝子発現カセットは、目的の挿入遺伝子であり、α接合因子分泌シグナルペプチド領域を結合させたCHY遺伝子とMPD2遺伝子には、4種類のプロモーターのうち1種及び4種類のターミネーターのうち1種をランダムに結合させたライブラリーとして構築してしております。

下段の注釈に詳細の記載がございましたが、挿入DNA断片は、●●●CHY遺伝子発現カセットを連結したコンカテマー、それから、MPD2遺伝子発現カセットが●●●及びCHY遺伝子発現カセットが●●●連結したコンカテマー、この2種類がございまして、それぞれプロモーターとターミネーターの組合せが異なるコンストラクトの混合物となっております。

24ページになりますけれども、遺伝子発現カセットを構成する各DNA断片をRAVベクターに組み込みまして、遺伝子発現カセットライブラリーを構築してしております。●●●ございますけれども、これは最終的に構築されるコンカテマー、要は●●●遺伝子発現カセットを連結したのようになりますが、コンカテマーにおける遺伝子発現カセットの連結順を指定する配列が組み込まれています。これによって、コンカテマー中では、必ずN末端側か

ら数えて●●●に並ぶことになっております。

次にコンカテマーを構築するための外骨格として、宿主ゲノムとの相同領域と選抜マーカー遺伝子を有するpFAVxベクターを構築しております。

最終的に●●●ライブラリーから切り出した遺伝子発現カセットを、pFAVxベクターに組み込んで、●●●遺伝子発現カセットが連結したコンカテマーを含むpCAVxベクターライブラリーを構築しております。

詳細は、26ページから29ページの間で説明をされておるのですが、一旦、25ページの図7にお戻りいただきまして、下のコンカテマーベクターライブラリーの構築のところで、最終的に宿主ゲノムに導入する際の遺伝子導入用ベクターが構築されておりますが、●●●とあります。●●●と3種類あるのが、宿主ゲノムの3種類の遺伝子座の相同領域を持っているもので、pCAV●●●が●●●遺伝子座、pCAV●●●が●●●遺伝子座、pCAV●●●が●●●遺伝子座に対応しております。

それから、それぞれのベクターで選抜マーカーも異なっておりまして、pCAV●●●がハイグロマイシンB、pCAV●●●がノーセオスリシン、pCAV●●●がジェネティシン耐性となっております。

かつ、pCAV●●●には、*CHY*遺伝子を●●●連結したものと、*MPD2*遺伝子●●●と*CHY*遺伝子●●●を連結した2種類のコンカテマーが入るように設計されており、pCAV●●●とpCAV●●●には、いずれも*CHY*遺伝子を●●●連結したものしか入らないようになっております。

30ページになりますが「5 構築された発現ベクターに関する事項」です。

「(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」については、記載のとおりです。

一番下のパラグラフですが、最終的にCIN株に挿入されたDNA断片、コンカテマー中の*CHY*遺伝子、*MPD2*遺伝子並びに結合しているプロモーター、ターミネーターの想定される組合せとその制限酵素地図というのは、31ページ、図10に記載がございます。

(2) オープンリーディングフレームの検索に関しましては、後段の宿主ゲノム上での検索のところ、まとめて御説明をいたします。

(3) 意図する挿入領域ですが、それぞれのコンカテマーベクターから、制限酵素●●●で処理を行って切り出した、*CHY*遺伝子発現カセット、*MPD2*遺伝子発現カセット及びマーカー遺伝子を含む領域ということで、27ページの図8に記載がされてございます。

32ページ「6 DNAの宿主への導入方法に関する事項」です。

先ほど御説明したpCAV●●●の3種類のベクターをおのおの制限酵素●●●で処理し、切り出した断片を●●●により、宿主*K.lactis*に形質転換しております。宿主の染色体上の3つの遺伝子座の隣接領域で相同組換えが起こり、目的遺伝子が染色体上に挿入されております。各断片に含まれる遺伝子が付与する抗生物質耐性、高いキモシン生産性を指標に酵母を選抜しました。

次のパラですけれども、pSH65プラスミドを用いたCreリコンビナーゼの働きにより、抗生物質耐性遺伝子を除去して、一旦、●●●株を得ております。ここで、NGS解析によりまして、目的遺伝子のコピー数等を確認しておりますが、一部の抗生物質耐性遺伝子が除去されていないことが確認されたため、再度、pSH65プラスミドを用いて、これらの除去が行われ、最終的にCIN株が得られております。

次のパラですけれども、最終的なCIN株ではなくて、前段階の●●●株でNGS解析が行われておりまして、*CHY*遺伝子発現カセットが●●●、*MPD2*遺伝子発現カセットが●●●導入されていると推定されております。

それから、遺伝子導入の標的の1つである●●●遺伝子ですが、相同組換えの結果として、●●●が欠失されていることが確認されております。

なお、CIN株は、NGS解析を行った●●●株から、抗生物質耐性遺伝子除去の1工程のみを経て得られたものであることから、この点を除きまして、●●●株と同様の遺伝子構成を持つと推定されると記載がございます。

「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。

3種類のコンカテマーベクターには、その外骨格領域にクロラムフェニコール耐性遺伝子を持ってありますが、生産菌であるCIN株には導入されておられません。

また、形質転換された酵母の選抜のために、各コンカテマーベクターにそれぞれ●●●抗生物質耐性遺伝子が含まれていて、これが挿入DNA断片に含まれているのですけれども、最終的には、pSH65プラスミドを用いて除去がされております。

以上のことから、本CIN株には、抗生物質耐性遺伝子は存在しないとしております。

34ページ「第5 組換え体に関する事項」になります。

「1 宿主との差異に関する事項」ですが、組換え体でありますCIN株と宿主との相違点は、 $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域を結合した*CHY*遺伝子及び*MPD2*遺伝子が複数コピー導入されたことにより、高いキモシン生産性を獲得している点です。

それから、●●●が欠損している点が相違点です。

先ほど申し上げましたとおり、CIN株には、*CHY*遺伝子発現カセットが●●●、*MPD2*遺伝子発現カセットが●●●導入されております。

「2 遺伝子導入に関する事項」です。

「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」は、記載のとおりです。

35ページ「(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」です。

挿入DNA断片の配列には、複数の組合せが設計されているため、宿主ゲノムの相同領域との接合部位を含めて、●●●接合部位で、合わせて●●●の組合せが推定されるとしております。表6に記載がございますが、繰り返し配列が多いため、NGS等を用いた接合部位のシーケンスは困難であることから、実施はしておりません。そこで、これらの想定される組合せを全て網羅する●●●の想定配列を構築し、連続する30アミノ酸以上のORF検

索を行ったとしております。

表6と36ページの図11に、想定される接合領域の説明がなされております。

表6ですけれども、例えば宿主の3つの遺伝子座に挿入をされておりますので、●●●の配列が想定されます。それぞれプロモーターであったり、構造遺伝子であったり、想定される組合せを足し合わせた結果、●●●ということになっております。

36ページになりますが、ORF検索の結果、重複を除いて、合計440個見出されております。

これらORFと既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果ですけれども、先ほどCHY遺伝子の部分で御説明をしました、●●●相同性を示したアレルゲンを除きますと、2種類が新たに見出されております。

表7に記載がございますが、網かけになっていない、アスパラギン酸エンドペプチダーゼとPer a 2というものになりますが、これらはWHO-IUISが指定するアレルゲンデータベースに含まれているが、食物アレルゲンではなく、環境アレルゲンであると考察しております。

37ページ、表7の下段ですけれども、440個のORFを用いて、既知の毒性タンパク質との相同性を調べた結果、類似性を示すものは見出されなかったとなっております。

38ページ「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」は、記載のとおり、従来から広く使用されている、あるいは長期間にわたって安全に使用されてきた実績を有するとの記載がございます。

39ページ「第7 遺伝子組換え添加物に関する事項」です。

「1 諸外国における認可、食用等に関する事項」ですが、ここに記載がございますとおり、オランダ、フランス、ロシア、アルゼンチン、デンマーク、カナダ等で許可がされております。

「2 組換え体の残存に関する事項」ですが、生産酵母由来の組換えDNAが製品中に含まれるか否かを定量PCRにより確認したところ、検出限界以下であったとされております。

「3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」ですが、*K.lactis*が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、キモシンの製剤前のサンプルは、JECFAの食品用酵素の規格値に適合していることを定期的に確認されております。

40ページ「4 精製方法及びその効果に関する事項」ですが、こちらに記載がございますとおり、キモシンの回収工程において、濃縮精製が繰り返され、キモシンを含む溶液から酵母や固形物が完全に除去されているため、本製品には、生産菌及び有害物質等が残存することはないと考えられると考察しております。

5ですけれども、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よって、安全性に問題が生じることは考えられないとしております。

41ページ、第8ですけれども、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おり、次に示されるような試験は必要ないと考えられるとなっております。

申請資料の説明は、以上です。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、申請書について、先生方から御意見をいただきたいと思います。

本申請は、生産量を確保するために、この遺伝子を多コピーで得るために、コンカテマーというものまで作って、かなり手の込んだことをしておりますので、それに伴うことなどもあろうかと思いますが、よろしく願いいたします。

まずは、第1、安全性と宿主、ベクターに関するところまで、3ページから16ページまでのところまでございましたら、お願いいたします。

5ページ、宿主にしている DS30216 株ですが、既に日本で安全性審査が済んでいるキモシンの生産株は、もともと●●●で、ウシ由来のキモシンの遺伝子を入れたもの、●●●について、今度はこの株から挿入 DNA を除去したものになっています。これに伴って、もともと●●●が欠失している点が、野生株との相違点といえば、相違点です。こういうふうに、一度、組換え体になったものが、外来の遺伝子を除いて宿主にした例なのですが、これは組換え工程をこういうふうには経てはいますけれども、組換えによる挿入 DNA 変異が除かれていたものについては、宿主として認めた前例がございます。

また、相同組換え等による単なる遺伝子欠失は、これまで問題にしていない点がございますので、これは通常の宿主でいいと思うのですけれども、先生方、これについては、御意見よろしいでしょうか。問題ないでしょうか。

この点については、異論がないようですので、この株を宿主ということで、いきたいと思えます。

ほかにもございますでしょうか。どうぞ。

○児玉専門委員 同じく5ページのところで、●●●が欠失しているということで、次世代シーケンスの結果から出ているということなのですけれども、次世代シーケンスの冗長度の波形グラフがあって、●●●という議論のようです。これは申請者に確認すればいいのかもしれませんが、●●●ないと、その論理が成立しないと思ったのですけれども、そこら辺の情報がわかっていないので、確認させていただければと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

*Kluyveromyces lactis*の株は、もしかすると、2倍体だと思うのですけれども、違うのでしょうか。いずれにしろ、申請者が来ておりますので、直接聞けば、そういう点は、即答いただけるだろうと思いますので、聞いてみたいと思います。

ほかにもございますでしょうか。どうぞ。

○橋田専門委員 アミノ酸置換が●●●されていることについてなのですが、凝乳活性向上の根拠がよくわからないので、それについての説明が記入されているといいと思えました。

○中島座長 これも直接聞いてみるということで、よろしいでしょうか。

○橋田専門委員 はい。

○中島座長 ありがとうございます。

いつでもどこでも聞いていただいて結構なのですが、申請書17ページから37ページまで、「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」のところまでございましたら、お願いいたします。

かなり凝った作り方をしております、しかも、最終的にどういう形になっているのか、よくわからないところがありまして、これでよろしいかどうかというところです。いずれにしても、この辺は、少し聞いてみようと思います。

どうぞ。

○児玉専門委員 20ページの人工胃液と人工腸液のところなのですが、人工腸液のところは、きれいになくなってしまいますので、よろしいかと思うのですが、人工胃液のところは、ペプシンとかなりバンドがかぶるようです。キモシンなので、食経験もあるので、ウエスタンをやれとまでは、言わなくていいと思うのですが、本当に切れているのかというのは、厳密に言うと、わかりにくいと思ったということです。どうしろということは、ありません。

○中島座長 これはキモシンなので、そもそもペプシンでは切れないものなので、そういうことなのではないかと思います。今まで人工胃液では切れるけれども、腸液では切れないというものは、結構ありましたけれども、これは珍しく逆のパターンで、なぜ切れないかという、もともと胃にあるものだという説明です。聞いてみるのはいいと思うのですが、多分そのような返事が返ってくると思います。キモシンですから、そういうものだとは私は思っています。

いつでも結構ですが、申請書、組換え体に関すること、製造原料、製造器材、遺伝子添加物に関する事項、一番最後のところ、41ページまででございましたら、お願いいたします。

この株は、少々手の込んだことをしております、4種類ずつのプロモーターとターミネーターを目的遺伝子にランダムに結合させた、発現カセットライブラリーを作製、ライブラリーから切り出した発現カセットを●●●連結したコンカテマーのライブラリーを作製しています。コンカテマーというのは、あまり出てこない言葉で、例えばプラスミドDNAが二重、三重になったようなものは、コンカテマーと言いますので、似たようなものが、二重、三重に重なったようなものが、コンカテマーだと思っているのですが、この場合、コンカテマーは、こういうものをコンカテマーと言うと、ここでは定義しておりますので、言葉についてはいいと思います。

最終的にこれらのコンカテマーを宿主の3つの遺伝子座に挿入しています。できているCIN株というのは、特定の1株になっているのですが、この株にコンカテマーがどういうふうに挿入されて、どういう形になっているのかというのは、わかっていません。次世代シーケンサーを使って一生懸命やっているのですが、次世代シーケンサーの弱点は、繰り返し配列なので、そこまでは突きとめられていないということで、どうや

ってORF検索をやるのかということ、各遺伝子座、プロモーター、ターミネーター、目的遺伝子、その組合せで、考えられる組合せを全部考えて、それぞれについて、ORFの検索をやって、アレルゲンの検索をやっている。そういう方法でこの申請書ができております。これでよろしいか、その点について、御意見いただければ、ありがたいと思います。

ここでは●●●調べられていまして、これまでも、植物などの系統では、どういう形が入ってくるか、要求してきましたし、微生物で酵素を作るような場合で、コピー数がわからないケースもこれまでございましたが、それでもやれる限りのことで、今まで認可になってきておりますし、また、この場合も、●●●、考えられる限り、全部やっていて、やれることはやっていて、宿主、*Kluyveromyces lactis*は食経験がありますし、また、入れている遺伝子についても、ウシのキモシンは、今まで何通りも試験がされておりますので、その菌に関しては、いいのではないかと思うのですけれども、先生方、いかがでしょうか。

近藤先生、いかがですか。これはもうちょっとやりようがあるとか、指摘はございますか。

かなり凝ったやり方ですが、鈴木先生はいかがですか。

○鈴木専門委員 技術的には、PacBioのロングシーケンスをすれば、ある程度の配列リダントなもの、繰り返し配列は見られるのですけれども、あまり安全性の本質には意味もないと思っていて、私はこれでいいと思っています。

○中島座長 ロングシーケンスでは、デプスが稼げないし、要求しなくてもいいと思いましたが。ありがとうございます。

どうぞ。

○内海課長補佐 座長、1点、よろしいでしょうか。今のコピー数の関係なのですからけれども、澤田先生から1点コメントをいただいております、実際、推定ですが、*CHY*遺伝子発現カセットが●●●、*MPD2*遺伝子発現カセットが●●●ということで、恐らく*MPD2*が●●●と*CHY*が●●●連結したコンカテマーが●●●で、*CHY*が●●●連結したコンカテマーが●●●という形で入っているのだと推定されるのですが、せめてどこの遺伝子座に何個入ったかぐらいは、推定できるのではないかと、それぐらい教えてもらってもいいのではないかとコメントをいただいております。

○中島座長 わかりました。これはつなぎ目が出てくれば、わかるのかもしれないけれども、入っているものもコンカテマーなので、結局、リードが短いと、難しいのかもしれないです。これについては、実際、申請者が見えているようですし、私も少々気になりますので、私から聞いてみようかと思えます。

どうぞ。

○小関専門委員 評価基準があります。評価基準に書いてある言葉のとおりでいくと「第5 組換え体に関する事項」の「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」以下のところについては、次世代シーケンサー等の情報によって、担保されるということで、よしとするというのが、この専門調査会としての今後の考

え方だということで、考え方をきちんとしておいたほうが良いと思います。今まではそんなことは言ってこなかったのですけれども、これはどういう形で入っているか、わからないというか、逆に言うと、制限酵素サイトを外す格好の方法です。入れない方法です。そこがこの方法の一番のポイントになっているわけです。

要するに制限酵素のサイトが外側に来ると格好で、繰り返していくということは、リンカーサイトをなくしている。逆に言うと、評価基準のところでは求めていたものは、リンカーサイトがあるはずだから、そこで切って見られるという前提の考え方で、評価基準が書かれている。けれども、それは時代とともに、サザンブロット解析パターンが明らかにされているという言葉として、あるいは次世代シーケンサーにより入れられている組換え体に関する事項として、入っている配列が明確化されていることということで、ここの専門調査会では、これから認めていくと、整理しておきませんか。そうすれば、すぐわかりやすいと思います。

今までの方法と今回の方法の一番の違いは、サイトが入らないようにするという事です。すなわち、サザンブロットできない方法、できないということはないです、やろうと思えばできます、サイトを狙ってやれば、きれいなサザンのプロファイルが出てくると思うのですけれども、ここに入っているキモシンのDNAの内部サイズを使ったサザンをやれというのか、そうではなくて、今回のようなことで、入っている形が、次世代で明確化されている、担保されている、認めるというふうに、そこは皆さんの御意見をきちんと集約しておいたほうが良いような気がします。

○中島座長 ありがとうございます。

この基準ができたときに比べますと、現在は、技術が大分進んでいまして、クローニングするときも、制限酵素サイトを探して、カット・アンド・ライゲーションをやっていたけれども、今ではシームレスクローニング、制限酵素で関係なくつなげてやる時代になっていますので、少しずつ従来のやり方が時代おくれになりつつあるかと思います。かわりに、次世代シーケンサーで丸ごとゲノムを解析するということが、簡単にできるようになっておりまして、当然審査する側も、新しい技術には新しい技術で審査対応をするという流れが自然だと考えます。

次世代シーケンサーのデータをもって、遺伝子構成として認めるというのは、植物のほうではもう認められていて、実際に事例が積み重なっている状況でもありますので、私も流れに沿いまして、微生物の場合でも、次世代シーケンサー等で、構成の情報が得られているのであれば、それでよしと考えたいと思いますけれども、先生方、これについて、御意見はございますか。

今、ここで議論して、共通の認識という形にしておけば、次からは迷わず、こういうデータがちゃんとそろっていれば、オーケーという形にできますし、また、その辺が曖昧な場合は、次世代なり何なりで、染色体上の構成についてのデータをとってくださいと要求することもできるようになりますので、ここで議論しておきたいと思います。ここでは若

干時間がありそうですので、議論したいと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。  
どうぞ。

○小関専門委員 今の座長の御意見でいったときに、植物の場合には、サザンのプロファイルとともに、今のところ、全部出ているのです。ここでは、サザンのプロファイルはなしで実施されてきている格好なので、植物の場合にも、次世代だけでよしとするのかどうかというのは、また議論があるかと思います。

そこは置いておくとしても、微生物の場合でしたら、ある意味シンプルで、狙ったとおりにできるということから、サザンと次世代、今、併記しています。サザン部分は求める必要がないというか、求めなくても、安全性評価の上では、問題がないというところにフォーカスして議論したほうが、やりやすいと思うのですけれども、いかがでしょうか。

○中島座長 おっしゃるとおりです。確かに植物の場合は、サザンのデータが出てきます。微生物の場合は、ゲノムが小さいので、繰り返し配列も限られておりますので、次世代でゲノムの全容を把握するのは、現在では可能になっています。まさしくメタゲノムで、もとの微生物もないのに、ゲノムを構成してというのも、可能な時代になっておりますので、少なくとも微生物のレベルであれば、次世代のデータをもって、遺伝子の構成について、担保できたと考えてもいいように思うのですけれども、この点については、先生方から、御意見をいただきたいと思います。

鈴木先生は、いかがでしょうか。

○鈴木専門委員 正直、答える時間が欲しいです。今、考えた意見が、後ほど変わることもあります。確かに微生物と植物の次世代解析の手法を分けて考えたほうがいいし、ガイドダンスというか、どういうデータのとり方が一番いいのかということを決めないと、難しいと思います。

○中島座長 この場合、次世代にかわる技術が、次から次へと出てくるとは思いますけれども、デプスという基準がありますので、数十デプス以上、例えば50とか、100とか、そのくらいの数字があれば、おおむねゲノムが把握できたと考えていいように思います。なので、デプスの目安くらいの基準があれば、いいという気もするのですが、先生方、いかがでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 ガイドラインによれば、サザンで解析パターンが明らかにされていることと書かれていて、次世代である程度の基準を作って、そこをよしにしましょうということになるのですけれども、逆に言うと、イルミナのシークエンスには弱点があって、タンデムリピートとか、要するにそういうものは、逆にわからなくなってしまうということがあって、今回、その例なのですが、その点でいくと、むしろサザンプロットのほうが得られる情報があって、こういうサイトにこのぐらいに入っているというのは、わかるケースもなくはないということになります。ですから、次世代のほうが、情報量が多いということは、この場合、必ずしもないということは、認識した上で、議論をしなければいけない

と思っています。

もともと微生物の場合、特に添加物の場合は、食べるものの性質が非常にクリアにわかっていて、タンパク質なり、そういうものは、目で見てわかるような形になっていますので、そういうものに関しては、今までの例でいっても、挿入位置は相同組換えでいくので、大体ここら辺に入りますというのがわかりますし、ただ、そこはタンデムに入ってしまうので、数がわかりませんということが、これまでも多かったと思います。そこら辺、次世代では、意図しない断片が変なところに入っていないということが、ある程度担保できていて、微生物の場合、そういうことはほとんど起きないのですけれども、それはないということと、あとは、何コピー入っているかは、場合によってはわからないということは、添加物に関しては、それでもいい。これまでの事例もそういうことになっていますので、そういう考えであれば、よろしいと思います。

先ほどの植物の場合は、サザンにくっついていていますという話だったのですけれども、●●●のほうは、くっついていないので、あれはNGS、ジャンクションの部分がきちっと同定されていて、構造が把握されているところまで、読み込んでいます。サザンプロットは、今、省略している状態になっておりますので、植物の場合は、そういう形でクリアしているということだと思います。

○中島座長 そう考えますと、微生物のほうも、植物で組み換えた位置の情報ができていることと、たしかデプス75ぐらいが基準だったと思いますが、あと、全体的にデプスの薄いところが出ていない。そのぐらいの基準をもってオーケーにしていたと思います。微生物も大体同じぐらいの基準でクリアできるようにも思います。

それから、もちろん意図していない断片が出ていないというのは、次世代でもわかるはずですので、そういうデータを要求すれば、微生物の場合は、おおむね安全性がわかるかと思いますが、ただし、微生物を直接食べるようなケースが出てくると、もうちょっと慎重に考えるべきだと思うのですが、添加物の場合は、これぐらいの基準でいいのではないかと思うのですが、先生方、いかがでしょうか。

山川先生、いかがですか。

○山川専門委員 作物化した場合、いろいろなものが出てくるから、わからない状態です。時と場合によると思います。

○中島座長 添加物に限った議論ということだったら、いかがですか。

○山川専門委員 それは大丈夫です。

○中島座長 わかりました。

微生物そのものをプロバイオティクスみたいなもので食べるようなケースが出てきたときは、また別に考えるということで、添加物については、今ぐらいの基準で、安全性を見るという形で、この部分はやっていきたいと考えますので、事務局でわかりやすく、メモ書きでまとめていただけるとありがたいのですが、よろしいでしょうか。

ほかにございますでしょうか。

今回は、申請者が来ておりますので、せっかくですから、この際、疑問のところとか、聞けるものは、聞いておければいいと思います。

どうぞ。

○児玉専門委員 これは記載整備的な話なので、申請者にどうこうはないのですが、32ページと33ページ、次世代の話が書かれているところで、先ほどから出ています、冗長度の情報が書かれていないので、冗長度は幾つぐらいでシーケンスをして、こういう結果でしたということを入れていただくのと、33ページの上から5行目の添付資料28というのは、添付資料30の間違えだと思いますので、ここは記載整備で直していただければと思います。

○中島座長 私も同じようなことを考えていたのですけれども、これは直接聞かなくても、デプスについて、問い合わせていただけますか。彼らは当然データを持っていると思います。

どうぞ。

○内海課長補佐 19ページの*CHY*遺伝子のアレルギー性の有無の確認のところ、先ほど申請書類の説明の際に、説明が漏れていたのですけれども、記載上では、キモシンの配列を用いたのか、プロキモシンの配列を用いたのかがよくわからなかったため、念のため、申請者に確認をしましたところ、11ページの図3にある●●●で相同性検索をやっているということでした。

以上、補足です。

○中島座長 ありがとうございます。

一応プロキモシンで見ているのですね。たしか天然のキモシンそのものにも、多少のアレルギーはあったようにも思いますので、これを超えていなければという話になろうかと思えます。

ほかに専門委員の先生方、ございますでしょうか。

それでは、申請者に聞いてみようということなのですが、●●●は欠失している。●●●の前後の配列については、どうなっているのかが1点。

橘田先生からございました、●●●の置換とその凝乳活性との関連、●●●の置換で、どのように凝乳活性が上がっているか。

それから、人工胃液で切れていないように見えるのですが、この点については、私から聞いてみようと思います。

コピー数の推定で、*CHY*が●●●、*MPD2*が●●●、構成はともかく、これがそれぞれの●●●3か所の遺伝子座に入っているわけですが、挿入遺伝子座ぐらいはわからないものか。

このくらいだったと思いますが、よろしいでしょうか。

それでは、申請者をお呼びしてください。

準備が整うまで、5分くらいあろうかと思いますが、少し休憩にいたします。

(休 憩)

○中島座長 そろそろ始めましょうか。

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、説明者の方々、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。

○渡辺説明者 DSM株式会社の渡辺と申します。よろしくお願いいたします。

○星野説明者 同じくDSM株式会社の星野と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者 コンサルティングをしております、●●●と申します。よろしくお願いいたします。

○説明者 同じく●●●と申します。よろしくお願いいたします。

○中島座長 それでは、幾つか質問させていただきます。

宿主の株なのですけれども、もともとはキモシンを作るのに使っていた株から、外来の遺伝子を除いて、この宿主にしている。そのときに、ついでに●●●ようなのですが、欠けたのは、素直に●●●だけなのか、それとも隣接の遺伝子とか、そういったところにORFの変化なり、何なりが起っていないのかということは、わかっておりますでしょうか。

○渡辺説明者 資料として、本部から得ておりますのは、添付資料2のアネックス1でお示ししているものだけなのですけれども、この中で報告されている限りでは、●●●の欠失だけになっております。

○中島座長 この株は2倍体の株で、そのうち、染色体上の片方が欠けたということでもよろしいわけですか。

○渡辺説明者 そう理解しております。

○中島座長 ありがとうございます。

それでは、ここに組み込んでいる*CHY*遺伝子なのですが、これはオリジナルのものに対して、アミノ酸を●●●置換していると、記載にはあったと思います。アミノ酸の●●●の置換と凝乳活性の向上とか、記載があったと思いますが、どのような関係になっているのか、もう少し説明いただけると、ありがたいです。

○渡辺説明者 今まで得ている申請資料、本部から出ているものの中では、特に言及されておられません。もしかしたら、何か報告があって、そのサイトを選んでいるのかもしれないし、または、社内での開発研究の中で、特定して、そこを改変している可能性もございます。

○中島座長 ●●●の置換は、●●●にということ、部位特異的ですので、偶然ということはないと思います。組換えとか、そういうものの都合ということ、考えにくくて、意図的に変換されたのではないかと思うわけなので、それでお聞きしています。

○渡辺説明者 持ち帰りまして、社内を確認して、後ほど文書で回答させていただいてもよろしいでしょうか。

○中島座長 橘田先生、この際に、もう少しあります。今ぐらいのことでよろしいですか。

○橘田専門委員 なぜここをとということがわかる資料があれば、それで結構です。よろしくをお願いします。

○中島座長 後ほどでよろしいので、よろしくお願いいたします。

これは書いてあるから、それでいいと思うのですが、いろんなタンパク質というのは、人工胃液だとすぐに分解して、人工腸液だと、物によっては抵抗性を示すものがありますが、これはむしろ逆でして、人工腸液ではすぐに溶けるけれども、人工胃液では抵抗性を示しているように見えます。その理由は、これがキモシンだからということなのでしょう。

○渡辺説明者 そのように考察しておりまして、もともと胃からとれてきているものなので、胃では分解されにくいと考えております。

○中島座長 そもそも胃で働くものだから、胃で分解しているようには、使えないだろうということですね。そういうふうにお答えいただければ、よろしいです。

これはコピー数を確保するために、かなり手の込んだことをされておられまして、こちらから読んで理解するのに手間がかかりましたけれども、コピー数としては、推定として、*CHY*が●●●、*MPD2*が●●●で、3つの遺伝子座●●●に入っている。コンカテマーとしては、2通り作っておるようなのですが、せめてどの遺伝子座にどのコンカテマーが入っているかぐらいは、わからないものでしょうか。

○渡辺説明者 すみません。これも本部に確認させていただきたいと思います。後ほど文書で回答させていただきます。

○中島座長 わかりました。

これは細かいことで、多分データをお持ちだと思いますが、実際、シーケンサーで、この株のゲノムの情報を得ておられますが、その場合は、データの信頼性のためにも、デプスの情報等々が欲しいのですが、これもよろしくお願いいたします。すぐにわかりますか。データがないということは、ないと思いますので、後ほど文書で結構ですが、信頼性にかかわりますので、デプスの情報は、ぜひいただきたいと思います。

○渡辺説明者 承知しました。

○中島座長 先生方、申請者が見えておりますので、お聞きしたいこと等はございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 申請書の21ページ目のところに、熱感受性の試験が載っていますけれども、アミノ酸を●●●置換しているものになっていますので、置換していないネイティブなキモシンと比べて、熱感受性というのは、変わっているのか、変わっていないのかというのは、何か情報をお持ちでしょうか。

○渡辺説明者 本部では持っていると思いますので、後ほどお示ししたいと思います。

○中島座長 たしかキモシンの熱感受性は、でき上がるチーズに苦味が出るかどうかとか、

そういうところを左右するはずなので、もしかすると、アミノ酸の変異というのは、そういうところをいじっているのではないかと思います。児玉先生も同じことをお考えになって、質問されているのだと思います。これはどう見ても、意図的に変異を入れていると思われるので、この情報は、調べ直さなくても、情報をお持ちだと思いますので、よろしくお願いたします。

先生方、ほかにございますか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。お疲れさまでした。

(説明者退室)

○中島座長 それでは、審議に戻りたいと思います。

こちらの要求しているデータは、しっかり理解いただけたと思いますので、この点については、文書で回答が来ると思います。恐らくむちゃなことは要求していないはずですので、文書で答えはいただけるだろうと考えます。

それでは、説明者からの回答を踏まえた上で、御意見、コメント等はございますでしょうか。

○手島専門委員 先ほど申し上げなかったのですが、19ページなのですが、5段目の下から3行目「ペプシンAはいくつかの職業性アレルギー喘息や鼻炎に関連しており（添付資料26）、またCPA63は季節性の花粉症を引き起こすアレルゲンとして単離されている」とあるのですが、ここは相同性を見るときに、食物アレルギーか、吸入アレルゲンかということは考慮していませんので、ここの部分はカットしていただきたいか、従来のウシ由来プロキモシンの相同性検索でも検出されている旨追記いただきたいと思います。

また、ペプシンAで、8アミノ酸が一致するところが、たしか●●●あると、添付資料23ではあったのですが、8アミノ酸の部分というのは、従来のキモシンとアミノ酸が変わっているところではないのかというデータを出していただいたほうがいいと思います。

○中島座長 こう見る限り、●●●のアミノ酸の変異が、アレルゲン性に及ぼす影響はない。これは同じところで相同性が検出されておりと書いてあるので、そういうことだと思います。そこを確認するということですね。

○手島専門委員 そうです。

○中島座長 多分データを持っていると思うので、そこが確認できれば、よろしいということでしょうか。

○手島専門委員 はい。添付資料23には、数だけしか書かれていなくて、配列等は書かれていないので、データがあれば、出していただきたいと思います。

○中島座長 当然持っているはずだと思いますし、もともとのウシのキモシンにもアレルゲンがあって、●●●のアミノ酸の変異で、それが増えていないということが確認できればよろしいわけですね。

○手島専門委員 そうです。

○中島座長 読む限り、そのように読めるのですが、そこがわかるようなデータは

要求してください。すぐに出てくるはずですが、少なくとも、こう書いてある以上、●●●の変異で、アレルゲンは増えていないというデータはあるはずですが。

どうぞ。

○児玉専門委員 今のところで、手島先生にお伺いすればいいのだと思いますが、アレルゲンの最終検索日が2013年なのです。

○手島専門委員 そうなのです。

○児玉専門委員 これはキモシンなので、2013年でもいいという気もしないでもないのですけれどもね。

○手島専門委員 そうなのです。NCBIのほうは、2017年です。36ページのFASTAの相同性検索は、2017年です。なので、新しいデータを持っているかと思えます。もし新しいほうでもデータを出しているとすれば、新しいものを書いてもらったほうがいいかもしれないです。

○中島座長 持っていないと言われたら、いいですか。

○手島専門委員 構いません。

○中島座長 新しいデータベースで検索していたのであれば、それと差しかえていただくように、なければならないで、キモシンなので、それならそれでいいだろうということで、その場合、増えているものがあっても、いわゆる天然の食品アレルギーではなくて、天然アレルギーだと思われれます。天然アレルゲンのデータベースが増えています。なので、多分問題ないと思えます。もし新しいもので、あるのであれば、それと差しかえていただくように、お願いしてください。

ほかによろしいでしょうか。

多少の宿題は残りましたが、本件については、特段、安全性に問題があるような点はないと思うのですが、先生方、よろしいでしょうか。

それでは、本件については、安全性上は、特段の問題がないということでありますので、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局からお願いいたします。

○内海課長補佐 それでは、44ページを御参照ください。

「Ⅰ. 評価対象添加物の概要」です。

名称、用途等は、記載のとおりです。

本添加物は、*Kluyveromyces lactis* DS30216株を宿主として、ウシ由来の改変プロキモシン遺伝子を導入して作製したCIN株を利用して生産されたキモシンである。本添加物は、乳のκ-カゼインを加水分解する凝乳酵素であり、主にチーズ製造に使用される。

なお、本生産菌には、プロキモシンを菌体外に分泌させる目的で、α接合因子分泌シグナルペプチド領域が、タンパク質のシステイン残基のジスルフィド結合形成を触媒することにより、キモシンが正常に機能することを助ける目的で、プロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子が、それぞれ導入されているとしています。

「Ⅱ. 食品健康影響評価」ですけれども、第1の「1. 従来の添加物の性質及び用途等に

関する資料」。

(1) 名称はレンネット、基原はウシの第4胃、有効成分はキモシンとしております。

「(2) 製造方法」「(3) 用途及び使用形態」「(4) 摂取量」は、記載のとおりです。

45ページ「2. 宿主及び導入DNA」ですけれども、(1) 宿主は、*K.lactis* DS30216株である。本株は、チーズから単離された*K.lactis*野生株に由来し、遺伝子組換え添加物として安全性審査が終了しているキモシンの生産菌株に、突然変異導入及び導入遺伝子の欠失を行った株である。

(2) DNAの供与体ですが、改変プロキモシン遺伝子の供与体はウシ、 $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域及びプロテインジスルフィドイソメラーゼ遺伝子の供与体は、いずれも*K.lactis* NRRL Y-1140株であるとしています。

「(3) 挿入DNAの性質及び導入方法」です。

*CHY*遺伝子は、ウシ由来プロキモシンの複数アミノ酸を置換することにより、凝乳活性が向上したプロキモシンをコードする。プロキモシンは、低pH処理により、自己触媒的にプロ領域が切断されて、成熟型キモシンとなる。

$\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域は、 $\alpha$  接合因子分泌シグナル及びリーダー配列をコードし、プロキモシンを菌体外に分泌させる目的で、*CHY*遺伝子に連結させた。

*MPD2*遺伝子は、プロテインジスルフィドイソメラーゼをコードし、キモシンのシステイン残基のジスルフィド結合形成を触媒する。

これらの遺伝子に、4種類のプロモーター及び4種類のターミネーターのうち、それぞれ任意の1つを結合した発現カセットを複数連結したコンカテマーを作製し、相同組換えにより宿主ゲノムの3つの遺伝子座に導入した。その際、1つの遺伝子座において、遺伝子欠失が確認されたとしております。

「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」は、記載のとおりです。

「5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料」ですけれども、46ページ(1) 製品名はMaxiren XDS、有効成分はキモシンとしております。

「(2) 製造方法」ですが、従来のキモシンと同様に、培養工程、回収・精製工程等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、不活性化した後、ろ過により除去される。

「(3) 用途及び使用形態」ですが、従来のキモシンと同様に、凝乳酵素として、チーズ及び発酵乳製品の製造に使用される。

「(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較」ですが、従来のキモシンと同様に、乳に含まれるカゼインの $\kappa$ 鎖を切断する酵素であるが、従来のキモシンと比較して、凝乳活性が向上しているとしております。

「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) ですが、Maxiren XDSと従来のキモシンとの相違点は、Maxiren XDSが複数箇所

のアミノ酸を置換することにより、凝乳活性が向上している点である。

(2) CIN株と宿主との相違点は、CIN株には $\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域を結合させた*CHY*遺伝子及び*MPD2*遺伝子が複数コピー導入されている点、並びに遺伝子導入に伴い、一部遺伝子が欠失している点であるとしております。

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、第2以下の各事項について、評価を行ったとしています。

「第2. 宿主に関する事項」は、記載のとおりです。

47ページですけれども、中ほど「第3. ベクターに関する事項」です。

「1. 名称及び由来に関する事項」ですが、プラスミドpUCの由来を*E.coil*由来と追記してございます。

「2. 性質に関する事項」は、記載のとおりです。

48ページ、第4ですけれども「1. 挿入DNAの供与体に関する事項」は、記載のとおりです。

「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」ですが「(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」及び「(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」は、記載のとおりです。

「(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項」ですが、*CHY*遺伝子の機能は、記載のとおりです。

「a. 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」は、Maxiren XDSの人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE分析を行った結果、試験開始後60分においても消化されなかった。

「(b) 人工腸液に対する感受性」ですが、こちらは、試験開始後15分で消化された。

「(c) 熱に対する感受性」ですが、45℃から70℃にて10分間処理した後、キモシン活性を測定した結果、65℃で消失することが示されたとしております。

「b. 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。

Maxiren XDS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を用いて検索を行った結果、プロキモシンの連続する80アミノ酸以上の配列に対して、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、4個のタンパク質が、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、ペプシンAが検出された。それらは、いずれも食物アレルゲンではなく、また、従来のウシ由来プロキモシンの相同性検索でも検出されていることから、アミノ酸変異がアレルギー誘発性に影響を及ぼすことはないと考えられたとしております。

「②  *$\alpha$ -MF\_cpo1*領域」と「③ *MPD2*遺伝子」の機能に関しては、記載のとおりです。

50ページ、3「(1) プロモーターに関する事項」「(2) ターミネーターに関する事項」「(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」については、記載のとおりです。

「4. ベクターへの挿入DNAの組込方法に関する事項」です。

$\alpha$  接合因子分泌シグナルペプチド領域と *CHY* 遺伝子を連結させた遺伝子、または *MPD2* 遺伝子に、4種類のプロモーターのうち1及び4種類のターミネーターのうち1つをランダムに結合させるようにRAVベクターに組み込み、遺伝子発現カセットライブラリーを構築した。このライブラリーから切り出した遺伝子発現カセットを、指定の順序で●●●連結したコンカテマーとして、宿主ゲノムの相同組換え領域の配列と選抜マーカーが異なる3種のpFAVベクターに組込み、pCAVベクターライブラリーを作製した。

「5. 構築された発現ベクターに関する事項」については、記載のとおりです。

51ページ「6. DNAの宿主への導入方法に関する事項」です。

宿主ゲノムの3つの遺伝子座に、相同組換えによりpCAVベクター上の目的とする領域を挿入した。各挿入領域に含まれるマーカー遺伝子が付与する抗生物質耐性及び高キモシン生産性を指標に形質転換体を選抜した後、pSH65プラスミドを用いてマーカー遺伝子を除去し、CIN株を得た。全ゲノム解析により、*CHY* 遺伝子発現カセット及び*MPD2* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入されていることが推定された。また、遺伝子導入に伴い、1つの遺伝子座で一部遺伝子が欠失していることが確認された。

「7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項」です。

遺伝子導入用ベクターpCAVは、クロラムフェニコール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、形質転換体の選抜のために、各挿入領域には、ハイグロマイシンB耐性遺伝子、ノーセオスリシン耐性遺伝子、またはジェネティシン耐性遺伝子が含まれているが、pSH65プラスミドを用いて除去されている。pSH65プラスミドは、ブレオマイシン非存在下での培養により脱落した。なお、生産菌は、これらの抗生物質に対して、感受性を有することが確認されているとしております。

「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」ですが、CIN株は、*CHY* 遺伝子発現カセット及び*MPD2* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入され、高キモシン生産性を獲得している点、並びに遺伝子導入した1つの遺伝子座で一部遺伝子が欠失している点で、宿主と異なるとしております。

「2. 遺伝子導入に関する事項」ですが、(1) CIN株の遺伝子挿入領域の制限酵素切断地図は、明らかになっている。

「(2) オープンリーディングフレームの有無並びその転写及び発現の可能性に関する事項」です。

挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレームの有無を調べるために、挿入DNAの5'近傍配列を含む領域、3'近傍配列を含む領域及び各構成要素間の接合部位で生じ得る想定配列におけるORF検索を行った。その結果、6つの読み枠において、終止コドンから終止コドンで連結する連続する30アミノ酸以上のORFが、合計440

個検出された。

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を用いて相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸以上の配列に対して、35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン、または連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンが6種類検出されたが、いずれも食物アレルゲンではなかった。

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、タンパク質データベースを用いてblast検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかった。

「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」は、記載のとおりです。

「第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項」です。

「1. 諸外国における認可、食用等に関する事項」ですが、Maxiren XDSは、オランダ、フランス、ロシア、アルゼンチン、デンマーク、カナダ等において認可されている。

「2. 組換え体の残存に関する事項」ですが、定量PCR法により、Maxiren XDS中に組換え体のDNAが検出されないことが確認された。

「3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項」は、Maxiren XDS製剤前の酵素サンプルは、JECFAの食品用酵素の規格値を満たしている。したがって、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としております。

「4. 精製方法及びその効果に関する事項」「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」は、記載のとおりです。

第8として、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しております。

評価書案の説明は、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、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。

どうぞ。

○小関専門委員 先ほど私が指摘したところを受ける形で、51ページの329行目「(1) 制限酵素による切断地図に関する事項」ですが、ここでは「CIN株の」と書いてあるのですが、これは正確ではないと思います。申請者側は、CHY遺伝子のことについて言っているわけです。

○中島座長 まだやっていないからね。

○小関専門委員 ここの書きぶりは、今後も含めて、どうしたらいいのか。後で要相談なのですけれども、工夫したほうがいいと思いました。

○中島座長 そうでないと、先ほどの議論と整合性がとれなくなります。これについては、事務局に作文していただいて、私と先生で確認したいと思います。

ほかにございますでしょうか。

○内海課長補佐 組換えの工程が若干複雑で、表現として、これで適当かどうかという観

点でも、コメントをいただけると幸いです。

○中島座長 私も先にこれを言われていたので、これだけを見て、何をやって、この株を作ったということがわかるかという、わからないでしょうという気がするのですが、それが完璧にわかるように、これだけ読めば、これと同じような構成が作れるように、きっちり書く必要があるかという、そこまではないように思いまして、また、実際、書こうと思えますと、ここだけで3ページぐらい書かなければいけない。今回はそのぐらい複雑なことをしているので、事務局の苦心の作文だと思うのですが、これはこれでよくできていると思っているのですが、先生方はいかがでしょう。

これではわからぬ、けしからぬとおっしゃる方がいれば、事務局の方々に、もう一汗かいていただくこととなりますが、今のうちに御意見があれば、お願いいたします。

○小関専門委員 ずるい方法かもしれませんが、『PLos One』に発表された方法として、Golden Gate法によって作製されたとか、細かく書いたら、大変なことになると思います。方法論としては、この方法を使って作製されたものぐらいにしないと、すごく長くなります。この辺は、よく書かれているとは思いますが、入れるとしたら、それぐらいしか手がないと思います。そうでないと、大変なこととなります。

○中島座長 私もそう思います。一般的なGolden Gate法とは、どういうものなのか、それほど一般化しているかどうかという、またそこはあって、この場合、コンカテマーを作っているけれども、コンカテマーという言葉を入れれば、こういうものがちゃんと想像できるかという、そこはまた違うわけです。この株について、割と特異的に手の込んだことをしておりますので、それを説明しようと思うと、評価書として、説明すべき事項の範囲を超えているようにも思いますので、結局、これぐらいがいいのではないかと思います。先生方、いかがでしょう。

○山川専門委員 評価書は、ちゃんと評価して、大丈夫だったということを報告するもので、その根拠がどうということまで、全部書かなくてもいいのではないかと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

事務局の皆さん、これぐらいでよろしいということなので、お疲れさまでした。

ほかにございますでしょうか。

それでは、先ほどの1点、評価書案についていただいた修正は、事務局と私と小関先生で確認して、食品安全委員会に報告し、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、議題（1）については、終わりたいと思います。

議題「（2）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した。

それでは、本日の議題については、これで終了いたしました。

以上をもちまして、第175回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。皆様、お疲れさまでした。