

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第180回) 議事録

1. 日時 平成30年11月30日(金) 14:00～15:42

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

・JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼ

(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
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)

川西委員

(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、飯塚課長補佐、
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

①JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼ

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180回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、開催いたします。

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

本日、所用により、近藤専門委員、手島専門委員、樋口専門委員が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼの

安全性についての審議です。

それでは、お手元の資料を確認いたします。事務局のほうからお願いいたします。

○飯塚課長補佐 それでは、議事次第に基づき、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となっております。

なお、これら以外の参考資料については、ファイルにとじまして、委員の皆様の上机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ください。

また、本日は新規品目でありますJPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼの申請者であるノボザイムズジャパン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、事務局のほうから「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。

○飯塚課長補佐 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 先生方、既に御提出いただいております確認書につきまして、その後、相違等ございませんでしょうか。

○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JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼについて審議を行いたいと思います。

それでは、事務局のほう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、審議の進め方について御説明いたします。

冒頭で御説明いたしましたが、本日は申請者のノボザイムズ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あれば整理して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おります申請書を説明させていただきます。

JPAN002株を利用して生産されたホスホリパーゼと記載されております黄色の紙ファイルの準備をお願いいたします。

まず、今回の品目なのですが、宿主ですとか遺伝子の供与体あるいは遺伝子の挿入方法などは、今年の5月に審議を行っていただきましたグルコアミラーゼですとか6月の

キシラナーゼとかなり共通する部分がございます。

まず1ページ目をお願いいたします。第1-1といたしまして従来の添加物の性質等に関する記載でございます。従来の添加物といたしましては、(1) ホスホリパーゼでございますが、反応特異性として、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解いたします。

(2) 製造方法についてですが、基原が微生物の場合は培養液からの抽出、除菌等の工程を経て精製、製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、*Aspergillus oryzae*を基原とするものとしまして、ホスホリパーゼA1がございまして、食品用途として植物油の精製及び製パンに使用されております。

2ページに行きまして、(4) 摂取量については記載のとおりでございます。

続いて、第1-2といたしまして、本申請品目における宿主等の項目になります。

(1) 宿主の由来等ですが、宿主は*Aspergillus niger* BO-1株でありまして、本株は自然界からグルコアミラーゼ生産菌として分離された*A.niger* C40-1株の突然変異株であり、グルコアミラーゼ生産性が向上したものでございます。また、夾雑酵素である α -1,6トランスグルコシダーゼ生産能を欠失しております。

(2) DNA供与体等の由来ですが、まず*pla1/amdS*遺伝子発現カセットについては、挿入遺伝子として*pla1*遺伝子、*amdS*遺伝子があり、それぞれの供与体は*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68株、*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株でございます。その他、プロモーター等の情報については表1に記載されているとおりです。また、DNAの欠失には*pyrG*遺伝子発現カセットを用いており、それぞれの供与体は*A. nidulans* NRRL 1092株でございます。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法ですが、生産菌であるJPAN002株の作製に当たり、BO-1株染色体の●●●か所の遺伝子座に遺伝子発現カセットを挿入しております。その際に、挿入領域でDNA置換が起こり、●●●つの遺伝子が欠失しております。

さらに、欠失導入用ベクターを用いて9つの遺伝子を欠失させております。

なお、これらのことについては、生産菌の作製は図1に、●●●か所の遺伝子座に挿入した遺伝子発現カセットは図2に記載されているとおりでございます。

6ページをお願いいたします。ここでは表3といたしまして、生産菌を構築する過程において一度は染色体に挿入されたものの、最終的に染色体から脱落したDNAについて示しております。

7ページ目からのDNAの挿入方法、欠失方法でございますが、4か所の遺伝子座に表3に記載しております●●●遺伝子発現カセットを相同組換えによりBO-1株の染色体に挿入しております。一方で、遺伝子導入用ベクターに組み込まれた*FLP*遺伝子がコードするFlpインテグラーゼの発現により、Flpインテグラーゼがベクター及び染色体上のFRT-F/FRT-F3配列を認識することで、挟まれた領域を組換え、*pla1/amdS*遺伝子発現カセットを宿主の染色体に導入しております。概要については、次のページの図3に示され

ております。

8ページ目の下をお願いいたします。ここからはDNAの欠失方法について記載されております。

1) DNA挿入時に起こる欠失については先ほど御説明したとおりです。

2) 欠失導入用ベクターを用いたことによるDNAの欠失ですが、*pyrG*遺伝子発現カセットを使用した相同組換えにより、9つの遺伝子を欠損させております。この欠失させた遺伝子は9ページ目の表6に示してあるとおりでございます。

10ページをお願いいたします。第1-3、利用経験や食経験に関する事項ですが、*A.niger*は食品用酵素や有機酸の生産菌として、長年安全に使用されてきた実績がございます。

第1-4、宿主の構成成分等についてですが、*A.niger*は自然界に広く存在しており、他の糸状菌と比べて特にアレルギー性や病原性で問題となる菌種ではないとされております。*A.niger*のマイコトキシン産生能については、アフラトキシン類産生能を有していないことは明らかにされておりますが、オクラトキシンAを産生するという報告はあり、*A.niger*を生産菌として食品添加物等を生産する場合には、その産生性を確認すべきだと指摘されております。申請者によりますと、BO-1株がこれらのマイコトキシンを産生しないことは確認されているということでございます。

第1-5ですが、当該GM添加物の性質等について記載されております。

(1) 有効成分等はホスホリパーゼで、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解します。

(2) 製造方法の詳細ですが、11ページ、図5にあるとおりでございますが、生産菌は除菌ろ過により、生産物である酵素から除去されているということでございます。

(3) 用途につきましては、植物油の精製に使用されるということです。具体的にはPLA1製剤は脱ガム工程に使用されますが、添加することによりリン脂質が水和性の高いリゾリン脂質に変換され、不純物の水和除去の効率を高めることができる。加えて、PLA1の活性の至適pHが4.0であり、70℃でも活性を示すことから、従来工程で酵素活性を担保するために必要とされた水酸化ナトリウム添加による中和と70℃から55℃への温調を割愛することができるというものです。

PLA1が全ての植物精製に用いられ、さらに100%残存すると仮定して、日本におけるヒト体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行ったところ、0.06 ng TOS/日/kg体重という計算結果になりましたが、PLA1は酵素反応により分離されたリン脂質とともに、水溶液画分にとどまるため、不純物として脱ガム油から分離除去されることから、PLA1が最終植物油製品に残存するとは考えがたいとしております。

(4) 有効成分等の比較についてでございますが、ホスホリパーゼには加水分解する箇所の違いに応じて幾つかございまして、今回のPLA1はこの中の1つであるホスホリパーゼA1であり、従来添加物と同様リン脂質に反応し、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解いたします。

次のページをお願いいたします。第1-6といたしまして、従来品との比較についてござ

います。(1) 従来の添加物との比較についてですが、相違点は表8に示したとおりでございます。PLA1の基質特異性及び70℃でも活性を保つことができる点は従来の添加物と同様であります。至適温度及び至適pHが異なります。

また、アミノ酸残基数、分子量は、申請品目のほうは277と29.6kDaということですが、従来品のほうは不明ということでございます。

16ページ(2)といたしまして、組換え体と宿主との相違点につきましては、表9に記載のとおりでございますが、挿入DNAとして*pla1*遺伝子が●●●コピー挿入されております。

続いて、第2の項目といたしまして宿主に関する事項について御説明いたします。

第2-1では、分類学上の位置づけについて記載しております。BO-1株の元株は*A.niger* C40-1株で、グルコアミラーゼ生産菌として1960年代にコペンハーゲン植物園の土壌より単離されております。今回の宿主でありますBO-1株は、C40-1株の突然変異株であり、グルコアミラーゼ生産性の向上及び夾雑酵素である α -1,6トランスグルコシダーゼ生産能を欠失しており、また、宿主としてさまざまな食品用酵素の生産菌の作製に用いられてきた経緯がございます。

第2-2、19ページをお願いいたします。BO-1株の病原性については、宿主であります*A.niger*は自然界に広く存在しており、他の糸状菌と比べて特に病原性で問題となる菌種ではないとされております。また、有害生理活性物質について*A.niger*のマイコトキシン産生能について、アフラトキシン類の産生能を有しないことは明らかにされておりますが、オクラトキシンAを産生するという報告がなされております。

さらに、同菌種にはフモニシンの合成遺伝子クラスターも発見されておりますが、申請者によれば、BO-1株はこれらのマイコトキシンを産生しないことを確認しております。

アレルギー性については、*A.niger*由来の酵素として3つの酵素がアレルゲンとしてデータベースに登録されております。この点について申請者は、*A.niger*由来のタンパク質として報告されたアレルギーは基本的に特定職種での高頻度暴露によりもたらされるものと考えており、適切な環境で使われている限り、BO-1株によるアレルギー誘発性の可能性は低いとしております。

続いて、第2-3、2-4については記載のとおりでございます。

第2-5といたしまして近縁種の病原性について、日和見感染により肺炎の病原菌となるものが知られております。

有害生理活性物質の生産についてですが、宿主の近縁種は有害生理活性物質であるオクラトキシンの産生能を有するものが知られておりますと記載がされておりますが、*A.niger*と同じ属種の中でアフラトキシン産生能を有するものは知られておりません。

22ページからベクターに関する事項が記載されておりますが、これは記載のとおりでございます。

24ページ、第4、挿入DNA等に関する事項について御説明いたします。

表11では、遺伝子発現カセットの挿入DNA及びその供与体がまとめられております。

1- (1) については記載のとおりでございます。

1-(2) 安全性に関する事項ですが、*pla1*遺伝子の供与体である *T.leycettanus* CBS 398.68 株に関してですが、*T.leycettanus*については特段の食経験は知られておりません。また、その特性から、産業上、有用と思われる酵素遺伝子がクローニングされ、研究されてきております。

*amdS*遺伝子の供与体である *A.nidulans*は、食経験のほうは特に知られておりません。*amdS*遺伝子は選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられております。

26ページをお願いいたします。第4-2- (1) といたしまして、挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法についてですが、*pla1*遺伝子、*amdS*遺伝子及び*pyrG*遺伝子はそれぞれ供与体からPCRによってクローニングされております。

(2) については記載のとおりでございます。

(3) 挿入遺伝子の機能の説明ですが、まず*pla1*遺伝子を説明させていただきます。

機能はリン脂質の1位のエステル結合を加水分解いたします。

安全性についてですが、1) 供与体のアレルギー誘発性については、*T.leycettanus*はアレルギー誘発性を示唆する報告はございません。

2) 遺伝子産物のアレルギー誘発性ですが、PLA1を有効成分とする酵素製剤のアレルギー誘発性については、それを示唆する報告はない旨が記載されております。

3) 遺伝子産物の物理化学的処理の項目でございます。まず、人工胃液処理についてはSDS-PAGE及びCBB染色で分析した結果、PLA1は30秒以内に消化される結果となりましたが、●●●で消化断片が生じております。これについても20分以内に完全に分解される結果となりました。

ウエスタンブロット分析においては、PLA1は30秒以内に全て分解され、消化断片は抗体が反応する部位が消化により消失したものと推測されるということから、断片が観察されない結果となりました。

人工腸液処理についてですが、28ページをお願いいたします。SDS-PAGE及びCBB染色で分析した結果、PLA1は6時間で全て消化されましたが、●●●で消化断片が生じ、これらのうち●●●は6時間でも消化されない結果となりました。

ウエスタンブロット分析においては、全長のPLA1は6時間以内に全て消化されましたが、●●●では抗体が反応する部位が消失したものと推測されたことから、この部分については観察されない結果となっております。

結論といたしまして、以上の消化性試験から、人工腸液では6時間の消化反応でも消失しない断片を生じておりますが、人工胃液において速やかに分解されることが示されたとしております。

4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関してです。PLA1と既知のアレルゲンとの相同性検索を①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②連続す

る8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索の2条件で行った結果、いずれの条件においても既知のアレルゲンは検出されない結果となりました。

続いて5) 熱処理に対する感受性としまして、ガム質との遠心分離工程における典型的な条件、85°C・pH3.8、10分間以上行うことで完全に熱失活すると考察をしております。

30ページをお願いいたします。*amdS*遺伝子、*pyrG*遺伝子についてですが、これまで長年使われてきた実績があり、アレルギー誘発性や毒性を示唆する報告はないことから、ともに問題はないと考えている旨、考察がされております。

第4-3、遺伝子の発現に関する事項でございます。

(1) プロモーター、(2) ターミネーターについては記載のとおりです。

(3) その他の配列についてですが、*pla1*遺伝子の転写を安定化させることを目的としまして、BO-1株由来の*payA*遺伝子の5'側非翻訳領域である*payA* 5'-UTR配列、また*pla1*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機能を持たせるためにTobacco mosaic virusのcoat protein遺伝子の3'側非翻訳領域のCP 3'UTR配列を用いております。

続いて、第4-4、第4-5-(1)については記載のとおりでございます。

35ページをお願いいたします。(2) といたしまして目的外のORFの有無についてでございますが、●●●つの遺伝子座に*pla1/amdS*遺伝子カセットを挿入しており、シーケンス解析により確認しております。詳細については後ほど第5のところでお説明いたします。

(3) (4)については記載のとおりです。

続いて、第4-6といたしましてDNAの宿主への導入方法についてでございますが、●●●●●つの遺伝子座に対しまして●●●●●遺伝子、●●●●●遺伝子を挿入しております。この形質転換体は、次に●●●●●遺伝子によるグルコアミラーゼ活性の測定により選抜を行っております。次に、*pla1/amdS*遺伝子カセットを持つ導入用ベクターを菌体内に挿入し、*amdS*遺伝子によるアセトアミドを唯一の窒素源とする最小培地の生育による選抜を行い、次にPLA1の産生量を指標として最も産生量の高い形質転換体を選択しております。

少し飛びまして40ページをお願いいたします。第4-7といたしまして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、導入用ベクターには抗生物質耐性マーカー遺伝子が含まれておりますが、宿主の染色体には導入されていないということをシーケンス解析により確認しております。

続いて、第5、組換え体に関する事項ですが、第5-1については記載のとおりです。

第5-2といたしまして遺伝子の導入に関してですが、まず(1) 遺伝子導入用ベクターの宿主への導入により、*pla1/amdS*遺伝子発現カセットを4つの遺伝子座に挿入しております。次世代シーケンスによる解析ですが、各領域について最低50の冗長度を担保するため、約1,000万のリードが生成され、平均リード長は100bp以上であったということでございます。

また、サザンブロット解析においてコピー数を確認したとしております。

飛びまして46ページをお願いいたします。第5-2- (2) といたしまして、遺伝子導入におけるORFの有無について記載がされております。●●●つの遺伝子座に対しまして6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義として検索を行った結果、●●●のORFが検出される結果となりました。これらの検出されたORFのアレルギー誘発性及び毒性の可能性を調べるために、既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性検索を行っており、その結果が47ページ以降に記載されております。

まず既知のアレルゲンとの相同性検索ですが、①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索では、一致するアレルゲンは検出されませんでした。

②連続した8アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンの検索では、各遺伝子座に共通のアレルゲンとして、Ara h 3が検出されまして、それに対する考察が同じページの15行目から記載されております。

このAra h 3はピーナッツアレルギーに関連するアレルゲンとして報告されているものであり、legumin様の種子貯蔵タンパク質でございます。IgEにより認識される配列の解析結果が得られておりますが、参考資料22とのアミノ酸配列を比較すると同一ではないため、これだけでは検出されたORFの配列と完全に一致する8アミノ酸配列がエピトープであるかどうかは明らかにできなかったということから、AFDSに登録されているアレルゲンエピトープと比較したところ、当該配列と一致するアレルゲンエピトープは認められず、したがって、万が一、これらのORFが翻訳されても当該翻訳産物がアレルギー性を示すことは考え難いとしております。

続いて、毒性タンパク質との相同性検索ですが、MvirDBデータベースを用いてE-value0.02未満を指標にして検索を行った結果が49ページに示されております。●●●検出される結果となりましたが、これらの重複をまとめると3個になります。

50ページに行きまして、それぞれをORFの1、2、3として、それ以降、考察を行っております。

まずORF1ですが、Hypothetical protein CE2154との相同性を示しております。これは*Corynebacterium efficiens* YS-314株由来の機能未知のタンパク質であり、*C. efficiens*内での発現が確認されたものではありません。申請者は、発現・機能ともに未知ではありますが、*C. efficiens*について知られている限りの情報から判断すると、ORF1が翻訳されたとしても毒性を有することは考え難いとしております。

続いて、ORF2ですが、Putative amidaseとの相同性を示しております。アミダーゼが毒性を持つという報告はないことから、ORF2がこのタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考え難いとしております。

最後に、ORF3ですが、TssMとの相同性を示しております。これは類鼻疽を引き起こす*Burkholderia pseudomallei*に由来いたします。TssMは感染細胞内で脱ユビキチン化活性

を示すことで何らかの抗炎症作用経路に関与するのみであり、単独での毒性は報告されておらず、したがって、ORF3がこのタンパク質と同じ機能を持ったとしても、毒性を有することは考え難いとしております。

さらに51ページ下からですが、DNAの欠失を行い、異種遺伝子断片が染色体上に残存する5つの遺伝子座について、ORFの検索、そして、アレルゲンデータベース、毒性タンパク質データベースを用いた相同性検索を行っております。検索の結果ですが、検出されたORFと相同性を示す既知のアレルゲンは検出されない結果となりました。

既知の毒性タンパク質との相同性検索ですが、53ページの●●●。

以上の結果から、アレルギー誘発性及び毒性を持つことは考え難いと記載されております。

54ページ、第6といたしまして、製造原料等に関する事項が記載されております。製造原料等は全て長年安全に使用された実績があるという旨、記載がされております。

55ページ、第7、遺伝子組換え食品添加物に関する事項ですが、第7-1として諸外国における認可等について記載されております。カナダでは承認を要せずに販売されております。また、米国ではGRAS認定されております。EUではPLA1のように加工助剤として用いられる食品用の酵素は、現在、規制の対象とはなっておりません。

第7-2、ドットプロット解析により、結果は56ページに行きますが、製剤中に組換え体由来のDNAが残存していないことを確認しております。

続いて、第7-3、非有効成分についてですが、表18にありますとおり、規格を満たすことを確認しております。

第7-4でございますが、ここでは純度について●●●と推定している旨、記載をしております。

第7-5については記載のとおりです。

第8ですが、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しております。

以上、60ページの結論でございますが、本品目については安全であると考えられる旨、記載がされております。

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、本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。

今回の申請品の宿主*A. niger* BO-1株、これは5月にグルコアミラーゼを審議いたしました。これと同じ宿主でございます。また、遺伝子の供与体であります*T. leycettanus*、これは6月にキシラナーゼを審議いたしましたが、この供与菌と同じものでございますので、本日は組換え体とホスホリパーゼそのものが審議の中心となろうかと存じますが、それでは、1ページから23ページまでのベクターに関する事項までのところで御質問等ございますでしょうか。

最初、「はじめに」のところの最初のパラグラフが終わるところ、リン脂質の1の位置

にあるエステル結合を分解し、グリセロリン酸と脂肪酸を生成する酵素であるという記述があるのですけれども、ホスホリパーゼA1ですから、2つついている脂肪酸のうち1つしか切断しませんので、こういうのはグリセロリン脂質ではなくてリゾリン脂質と言いますので、その辺、本文の中でも11ページの記載とか多少混乱があります。これはわざわざ申請者を呼んでどうこうという問題ではないと思うのですけれども、その辺、きちんと整理するように言っていただければと思うのです。

○山口係長 その箇所については、申請者に適切に修正をしてもらおうと思います。

○中島座長 どうぞ。

○児玉専門委員 10ページから11ページ目の製造方法のところなのですけれども、このホスホリパーゼは菌体内に分泌されるという理解でよろしいですか。

○山口係長 分泌シグナルはついていないので。

○児玉専門委員 ついていないのですけれども、その製造の概略を見ると分泌しているのかなみたいな感じに読み取れるのです。

○山口係長 もしよろしければ、今日、申請者が来ているので聞いていただければと思うのですが、よろしいでしょうか。

○中島座長 ホスホリパーゼですから分泌しているだろうと思うのですけれども、これについては、せっかく申請者が来ておられるようなので質問してみたいと思います。

○児玉専門委員 もう一点よろしいですか。これは修正だけしてもらえばいいのですけれども、16ページ目の下から3行目のところに●●●みたいなのが書いてあるのですが、●●●という話になりますので、●●●と思いますので、そこを修正していただければと思います。

○中島座長 もっともだと思いますので、そのように指摘してください。

どうぞ。

○川西委員 私、まだこの食品の遺伝子組換えでこういう書類に関しては相場観がわからないのでどうなのだろうということと言わせていただくと、10ページ目とか14ページに、このホスホリパーゼのものについて反応特異性という言葉を使っていて、この書き方はともかくとして、では、一体、これは何によって確認したのかということがこの中には書かれていない。実は社内資料のほうでこの活性をどういう方法ではかっているかというのを一応は記載されているのだけれども、反応特異性と書かれてしまうと、どこを見れば反応特異性が証明されているのだというのはわからないのですが、この辺は通常はどういうように記載するのかというのが私もこういうケースがわからないので、こんなものでいいのでしょうか。

○中島座長 これは概要書ですので、今まで大体このくらいの記述であればよろしいかと。それで特に異議とか変わった測り方とかそのようなものがあるときには、細かい添付の文書も参照して、それでもおかしければ質問するなりと、大体そういった手順であったと思います。私自身は、このくらいの記述でいいのかなという印象ではあるのです。

○川西委員 わかりました。

○中島座長 ただ、せっかくの御指摘でしたので、11ページに脂質からホスホリルコリンやホスホリルエタノールアミンといった水溶性のリンエステルを切り離すとPLA1についての記述があるのですけれども、これは一般論なのか、それとも、このホスホリパーゼについて、ホスホリルコリンやエタノールアミンなりホスファチジルセリンなりについて、どの程度見ているかの記述がこれは記載がありませんので、できれば申請者が来るなら聞いてみようかなとも思います。

ただ、実際のところ、ホスホリパーゼA1であれば、脂質成分については余り基質特異性が高くないのが一般的なので、特に測っていないとか、そういう答えでもよろしいのかなとは思うのですけれども、せっかくお呼びすることになりそうなので、そうしたら、私も実は聞いてみたいかなとも思います。

他に先生方、よろしいでしょうか。24ページから40ページまで、今度は挿入DNA遺伝子、遺伝子産物、発現ベクターの構築等についてまで、御意見ございましたらお願いいたします。

どうぞ。

○川西委員 18ページの表10のところで、ペクチナーゼの下にホスホリパーゼの項があって、さらに、本申請品というのが下のほうにあるのですけれども、宿主の欄が空欄になっている。10年以上前に海外のみで出ている上に記載のものとの違いがこの表からはわからないと思いました。小さいことです。

○中島座長 わかりました。せっかくですから聞いてみようかと思えます。ありがとうございます。

それでは、最後の組換え添加物に関する事項から第8までで、また全般を通して御質問等がございましたら、お願いいたします。

どうぞ。

○児玉専門委員 27ページ目と28ページ目に胃液、腸液の消化性試験のところのデータは出てくるのですけれども、これは申請者に聞いたほうが早いと思うのですが、●●●。一応、推定分子量は29.6kDaだというように解説書のほうには書いてあるのですけれども、●●●とは見えてしまうので聞いてみたいなと思えます。

○中島座長 やはり先生もそういうように見えませんか。私も少し気にはなりましたので、申請者をお呼びいたしますので、そのときに聞いてみましょう。ありがとうございます。

ほかにございますでしょうか。

どうぞ。

○川西委員 これは私、相場観がわからないので、こんなものでいいのかなと思わないわけでもないのですけれども、ただ、もう少し情報が聞きたいなと思っていることで、57ページの表18の試験バッチの分析値、社内規格値及び食品、添加物等の規格基準を定める規格値ということで、これは通常の食品添加物の基準で考えたら、これで何が悪いのかとい

うことになるのですが、実際にこの社内資料の24番目のものを読むと、活性をちゃんと測っているし、それ以外の酵素活性を幾つか、4通りか5通り、測っているのです。そのあたりが、この株での製造時には普通にあわせてチェックとしているものなのか。

これはノボぐらいの会社になるといろいろ考えてやっているはずなので、どういうストラテジーで検査しているのか。それから、ここは非有効成分の安全性というところになってしまいますけれども、製造管理という意味で言えば、活性ということに対してどういうように社内的に管理しているのかというあたりを聞いてみたいと思っています。

3つの代表的バッチが実は添付資料にありますけれども、●●●その辺、多分、今回のこの目的ではその程度でいいのだろうなと私は思わないわけではないのですが、だから、実際にどういうように考えてやっているかというあたりを時間があれば聞いてみたいと思います。

○中島座長 ありがとうございます。

この●●●とかこういうものの値は添加物の部会ですと、この表は必ず出てきてよくするのですが、ここは遺伝子組換えですので、この表までつけてあって、実は結構親切だなという。むしろ、この委員会ではそういう印象です。

できれば純度についてのデータは欲しいなというところなのですが、ここで●●●と記載がございますので、本委員会では今までは大体このくらいの資料で安全性の審査をしてみましたので、特にここに不足があるとか、そのような印象ではございません。ですが、お呼びいたしますので、お気の済むまでお聞きになっていただければと思います。

○川西委員 資料をプラスアルファするというとほかとのバランスがあるのだけれども、これは世界的に見てもトップメーカーですから、どういう感じでその辺をやられているか。私は●●●の製品は結構たくさん見ているのです。どういうように管理しているかを聞けたらいいです。

○中島座長 聞いてみるのが早いと思いますので。

先生方、ほかにいかがですか。

どうぞ。

○児玉専門委員 41ページ目のところですが、第5-2-(1)の制限酵素による切断地図に関する事項ですが、その2行目に挿入領域の塩基配列はシーケンズ解析で確認したとあるのですが、これは何コピーも入れているので、次世代シーケンサーはやりにくいはずで、多分PCRで増やしてサンガー法で読んでいるのではないかなと思うのですが、こういうときはサンガー法で読んだのか、次世代で読んでいるのか、シーケンズという言葉だけではなくて区別ができるように書いてもらえるとありがたいというのが1つあります。

もう一つ、その下のほうにサザンロットというのが出てくるのですが、実際に見てみると、このサザンロットは少し厳しいかなというのが、研究データとして提出された場合であればやり直してよと言うようなサザンロットなので、次世代シーケンサ

一をやっているのでやり直せとは言わなくてもいいのではないかと私も思っているのですが、厳しいなと思ったところだけは指摘しておきたい。

○中島座長 ありがとうございます。

今回は●●●カ所の遺伝子座に●●●というようになっておりますので、●●●次世代でショートリードのものでもよろしいかなと私は思ったのです。

このサザンで確かにこれは許しがたいと私も思いますけれども、だから、次世代シーケンサーでデータを補っているということなのかなと思っておりますので。でも、御指摘はしてみてくださいと思います。

他によろしいでしょうか。

それでは、申請者をお呼びしたいと思えますけれども、アミラーゼとホスホリパーゼ、これが分泌酵素であるかどうか。それから、これの基質特異性、反応特異性をどのようにはかっているのか。

18ページの表10の本申請品のそこの空欄のところ、これはどうなっておるのか。

27、28ページ、SDS-PAGEのデータですけれども、●●●点はどうなっているのか。

57ページ、規格基準のポリシーについて、これは先生のほうからお聞きいただければと思います。

最後、41ページ、切断地図とサザンとシーケンスの関係のあたり、この辺を聞いてみたいと思えます。

それでは、申請者をお呼びいただけますでしょうか。用意が整うまで一時休憩にいたします。

(休 憩)

(申請者入室)

○中島座長 本日、お忙しいところを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。

○ノボザイムズジャパン株式会社（橋田氏） ノボザイムズの橋田でございます。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 同じくノボザイムズの村戸でございます。

○ノボザイムズジャパン株式会社（高橋氏） 同じく高橋と申します。

○中島座長 それでは、早速なのですが、本申請品のホスホリパーゼA1についてなのですが、これは分泌酵素と考えてよろしいのでしょうか。本文の中では分かりにくくて、また、アミノ酸の配列からは分泌シグナルらしいものはないように見えるのです。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 分泌される仕組みにしているのですけれども、お示ししているアミノ酸配列は分泌シグナルを除いたものになっていますので、それで申請書をご覧になって分かりづらいという部分はそのあたりかと思えますので、シグナルシーケンスをお示しすることは可能です。

○中島座長 それはわかれば結構ですので。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） よろしいですか。ありがとうございます。

○中島座長 「はじめに」のところ、このホスホリパーゼA1の作用機作について書いてございますが、ここのリン脂質の1位にあるエステル結合を分解し、これでグリセロリン脂質と脂肪酸を生成する酵素であるとありますが、ホスホリパーゼA1であれば、これで生成するのはリゾリン脂質でして、ちゃんと書いてあるところもあれば、そうではないところもありますので、後ほど精査していただいて、その辺の記述を整理していただければと思います。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） はい。申しわけございません。

○中島座長 反応特性について11ページなどに書いてございますが、これは例えば基質特異性、このホスホリパーゼA1がホスホリルエタノールアミンに効くのか、ホスホリルコリンに効くのか、また、ホスファチジルセリンに効くのか、そういった点については特に調べてはいないのか、そういったことがわかれば結構なのですが、情報をお持ちでしょうか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 情報があるかどうかも含めまして、持ち帰って検討させていただきます。

○中島座長 一般にこの手の酵素は余り基質特異性が高くなかったりもするので、きちんと基質特異性が高くなければいけないとか、安全性が直接どうこうとか、そういう問題ではございませんが、情報があればお願いしたいといったことで、また、基質に、これは最後に反応させて分解させたときに切れ残りが出たりするのかとか、そういったことについて情報をお持ちならばお願いしたいと思います。

18ページ、表10になります。表が埋まっているのですが、1カ所、気になるところに空欄がございます、ホスホリパーゼ（本申請品）で宿主、供与体、ここのところが空欄になっているのですけれども、これは。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 大変失礼いたしました。これはBO-1でございます。

○中島座長 BO-1で、ということは、供与体は*niger*ではなくて本申請品であれば*Talaromyces*なのですが、そこは。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 申しわけございません。本申請品の供与体は御指摘のとおり、*Talaromyces*になっておりますので、ここは供与体が*A.niger*というのは間違いでございます。宿主がBO-1株となります。

○中島座長 では、ちゃんと直してください。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 申しわけございません。

○中島座長 27ページ、28ページ、電気泳動で人工胃液、人工腸液について見てございます。これは推定分子量の記載があるのですけれども、●●●という御指摘がございます、実は私にもそういうように見えるのですが、何か御説明はございますでしょうか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 詳しいことは帰って調べようと思うのですが、●●●によるものと考えております。

○中島座長 このアミノ酸の配列の中には、N糖鎖のつく配列というのはあるのですか。予想配列はございますか。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 確認させていただきます。

○中島座長 よろしく願いいたします。

それでは、57ページ、規格基準、こちらは先生のほうからお聞きいただけますか。

○川西委員 これは食品添加物ということですので、これでは情報が不足しているかということではなくて、御社がこの製品を製造するときにどのように管理しているかということ参考までにお尋ねしたいのです。

実は、この社内文書の24番目の文書を見ると、結構どう管理しているかということが英語で書かれている中で、酵素活性というのをもちろん有効成分としての酵素活性以外にも幾つか測定されている。これは、1つは常識的なことなのかもしれませんが、ということが目的で、それぞれ10項目ぐらい。1項目は有効成分をはかるためのpHと温度が違うところで恐らくベースで確認されていて、それ以外のものがどういう目的、不純物的な扱いでやっているのか、どういう考え方でやられていて、どういう扱いをしているのかと思っておりますけれども、今すぐわからなければ、また情報提供いただければと思うのです。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 詳細のほうは持ち帰ってまた書面で回答させていただきますので、1つには、今、まさに御指摘があったとおり、やはり最終的にある単一の活性を目指した製品にしますので、それに対する夾雑活性がどれぐらい入っているのかというのをあらかじめ確かめておくという意味で、品質の管理上の目的での夾雑活性の確認というのは間違いなく目的として入っております。それ以外のことにつきましてあるかどうかというのは、また改めまして御回答させていただきます。

○川西委員 そういうことだと恐らく幾つ以上だと何らかアクションを起こすという製造工程管理をしていると思いますけれども、その辺、概略を教えていただければ勉強になると思います。

もう一つ、今度、有効成分側の活性というのをどうのように数字を扱われているか。これで57ページの下のほうに純度を●●●と推定されるということで、通常、こういう文書としてはこれでいいのだろうと思うのですが、●●●。一方で、純度●●●と推定されると書いてあったり、その純度はどういう扱いで管理されているのかなというのに興味を持ちましたので。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 57ページに記載させていただいた純度というのは、あくまで電気泳動上確認できるタンパク質の純度で、かつ、これはある1つのバッチという形になりますので、実際のところは活性で管理をしております、もちろん、御指摘のようにバッチごとに差というものも出ますので、そのあたり、均質化した形で最終

的には社内の規格として品質管理を行っていくということをやっておりますので、ここに記載させていただいたタンパク質の純度と活性のばらつきというのは別のお話として御認識いただけたらと思うのですけれども、よろしいでしょうか。

○川西委員 わかりました。

○中島座長 ありがとうございます。

サザンのお話は児玉先生のほうから。

○児玉専門委員 41ページ目のところにシークエンスとサザンの話が出てくるのですけれども、これは同じ配列を●●●か所に入れているので、サザンと次世代シークエンサーをペアにするとこういう感じで入っていますと言える形になるのですが、サザンのみとかシークエンスのみだと厳しくなってしまうところがあるかと思うのです。

まずは確認ですけれども、41ページ目の5-2-(1)の上から2行目のシークエンス解析というのは、もう次世代だけでサンガー法はやっていませんよということでもいいのですか。

○ノボザイムズジャパン株式会社(村戸氏) はい。NGSだけを使っています。

○児玉専門委員 そうすると、多分サザンプロットとペアでないと厳密な意味ではあのマップがつかれないという形になるのではないかと思うのですけれども、そのサザンが社内文書12というのを見ると、マーカーがあって、その隣に●●●か所、ここに入っていますよというバンドがあるように見えるのですが、これはマーカーが漏れ出てもこうなってしまふよねというパターンになっていて、研究データとして提出された場合であればやり直してよと言うような図なのですが、その点はどうしろというわけでもないのですがね。

○ノボザイムズジャパン株式会社(村戸氏) 本件の場合ですと、各座で遺伝子の配列というのは●●●になっていないところもありますので、まずジャンクション、宿主側とプラスミドの配列側とどちらにもつくリードを探して、そこからこのマップに基づいてリードを組み合わせていくことで、ある程度、座の中での配列の検証というのはショートリードのものを使っていますけれども、できているというように考えておりますので、サザンは確かにデータとしてはお付けしておりますして御指摘の部分は品質に関してごもつもの部分もあるのですが、このサザンがなければ、この座の遺伝子の配列の確定ができないとは思っておりませんので、一応過渡期というか、徐々にNGSだけの解析に移行していつている途中もありますので、サザンのデータは参考のデータという形で私たちとしては考えたいところもあるのですが、いかがでしょうか。

○児玉専門委員 同じ配列をゲノムに●●●か所、相同組換えなので、早々、●●●は多分ないのだろうと理解しているのですけれども、厳密に言うと、NGSはややそこら辺は苦手にはしているはずですね。読み方の特性上、●●●その部分をきれいにNGSだけで決めるというのはやや苦手なはずです。

サザンと組み合わせれば、当然、それはそれでいいのですけれども、通常、他社さんとかですと、やはり隣接配列からPCRで増やして読むなり、その推定のちゃんとした長さが出てきますみたいなPCRの長さで導出して見せるなりして、その部分は担保します

よという形をとるケースが多いと思うのですが、今回はこれでいいと思うのですが、サザンのほうがこれだとやはり若干難しいかなと思うところもありますので、少しそこら辺、気をつけて次回以降、何かつくってきていただくとありがたいかなと思います。

○ノボザイムズジャパン株式会社（村戸氏） 承知しました。御指摘ありがとうございます。

○中島座長 先生方、他にどうぞ。

○川西委員 やはり社内資料を見ていると安定性のチェック、安定性の試験としてリザルトの5で5.2という表に●●●。これだけやっているのですけれども、これというのは今までの経験上、安全性の確認としてはこれで大丈夫と考えていいのですか。タンパクの安定性試験でこの程度で大丈夫だろうかと素朴に思うのです。

○ノボザイムズジャパン株式会社（橋田氏） バルクで使う産業用の酵素なので、いわゆる実験室で使うような冷蔵庫に保存してというのとはまたちょっと種類の違うものでして、逆に、このぐらい安定でないと実際には使えないというものです。

○川西委員 逆の意味です。もっと長い間とる。もちろん、目的からすると、実は私はそんなにうるさく言う必要はないと思うのです。この目的だから、活性がある程度あれば別に構わないのだけれども、酵素の組換えタンパクで世界一と言っていいぐらいのメーカーで、この程度のことしかしていないのかなという気がしました。

○ノボザイムズジャパン株式会社（橋田氏） 恐らく、これは決まったGLPで必ずやるタイプのレポートなので、実際にお客様に御紹介のときにはもう何か月、何年の単位での安定性もちゃんとお示ししておりますので、これはあくまでも品質上のデータというように御理解いただければ、実際、もっと安定に。

○川西委員 自主基準としてのGMP管理でしょう。

○ノボザイムズジャパン株式会社（橋田氏） はい。

○川西委員 いいや、これ以上はやめておきましょう。

○中島座長 ほかに先生方、ございますでしょうか。よろしいでしょうか。

お疲れさまでした。ありがとうございました。

（申請者退室）

○中島座長 それでは、再開したいと思います。

これはあくまでも、ここで審査に要るデータを要求しております、何でもかんでもになりますと毎回、その何でもかんでもがないと審査できないということになっても困りますので、大体標準的なデータかなと思って見させていただいておりました。

先生方、何かございますでしょうか。

どうぞ。

○児玉専門委員 非常に細かい話、細かくもないかもしれませんが、33ページのところにプラスミドの図が出てきて、図15、制限酵素切断地図と書いてあるのですが、どこにも制限酵素がない。それはガイドラインにそういうものを書けと書いてあるのからあれ

なのですけれども、だんだん次世代シーケンスを用いた解析が主流となってくると制限酵素の意味も余りないと言えないので、そこら辺もやがては考え方を整理してもいいかなとは思っていたりするのです。

○中島座長 ごもつともだと思しますので、確かにこれからの時代、制限酵素サイトをきちんと記載する必要があるかどうかという、そこからこの議論をする必要があるかと思いますが、これはこれでいいかと思うのです。特に制限酵素サイトを書き込んで提出しろというわけでもない。

○児玉専門委員 でも、制限酵素地図と書かれているのに酵素がないのは何とかしてくださいという。

○中島座長 多分、つけようと思えばすぐつくはずですので、これは要求していただけますか。やはりこういうタイトルでという要求事項には入っているはずですので、これは要求してください。

他にありますでしょうか。

細かいところを注文つけましたが、全体として、この安全性には懸念がないと考えられますので本件はよろしいかなと思うのですけれども、先生方、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、安全性については懸念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。

事務局のほうから説明をお願いいたします。

○山口係長 それでは、評価書案のほうについて御説明いたします。

食品健康影響評価に関する資料というホチキスどめされました資料をお願いいたします。

6ページをお願いいたします。I としまして、本申請品目の概要でございますが、*Talaromyces leycettanus* CBS 398.68株由来のホスホリパーゼA1遺伝子を宿主である *Aspergillus niger* BO-1株に導入いたしまして、JPAN002株を作製しております。

本添加物は、リン脂質の1位のエステル結合を加水分解し、グリセロリン脂質、こども修正する必要があるかと思いますが、グリセロリン脂質と脂肪酸を生成する酵素であり、植物油の精製工程において不純物除去を目的として使用される酵素ということでございます。

II以降については、食品健康影響評価に関する個別の項目を記載しております。

まず第1の1ですが、(1) (2)は記載のとおりでございます。

「(3)用途及び使用形態」ですが、植物油の精製工程における不純物除去及び製パンにおける小麦粉の物性改良を目的として使用されます。

(4)については記載のとおりでございます。

2の(1)宿主の種名等でございますが、宿主は、自然界からグルコアミラーゼの生産菌として分離された菌株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼの生産性を向上し、夾雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した *A.niger* BO-1株となって

おります。

(2) DNA供与体の種名等ですが、*pla1*遺伝子は*T.leycectanus* CBS 398.68株に、*amdS*遺伝子及び*pyrG*遺伝子は、それぞれ*A.nidulans* Glasgow野生株、*A.nidulans* NRRL 1092株に由来いたします。

(3) 挿入DNAの性質等ですが、*pla1*遺伝子は野生型のホスホリパーゼと同一のアミノ酸配列を持つPLA1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、*pla1*遺伝子及び*amdS*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幾つかの遺伝子を欠失させておまして、このうち4つの遺伝子座ではセルフクローニングに該当するとしております。

続いて、3、食経験については記載のとおりです。

4、宿主の構成成分ですが、*A.niger* BO-1株はオクラトキシンA及びフモニシンB₂を産生しないことは分析により確認されております。

5、組換え添加物等の性質については記載のとおりでございます。

6、相違点についてでございますが、従来の添加物との相違点は構造遺伝子の基原、至適温度及びpHが異なる点となっております。

宿主との相違点は、*pla1*遺伝子が複数コピー導入され、ホスホリパーゼA1の高産生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。並びにホスホリパーゼA1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して、以上から、本品目と比較可能な既存の添加物があると記載をしております。

第2、宿主に関する事項について、1については記載のとおりです。

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B₂を産生しないことが確認されている旨を記載しております。

また、*A.niger*由来の酵素として吸入性アレルゲンのものが知られておりますが、適切な環境で扱われている限り、宿主によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる旨を記載しております。

3及び4については記載のとおりです。

5、宿主の有害生理活性物質の生産についてですが、*A.niger*の近縁種である*A.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、*A.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す。

10ページをお願いいたします。第4、挿入DNA等に関する事項でございます。1の(1)については記載のとおりです。

(2) 安全性についてですが、*T.leycectanus*は、食経験は知られておりませんが、高い耐熱性を有することから産業上有用と考えられる酵素遺伝子がクローニングされ、研究されております。

*A.nidulans*は、食経験は知られておりませんが、長年利用された実績がございます。

これら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。

続いて、2の(1)クローニングに関する事項についてですが、挿入遺伝子はそれぞれの供与体によりPCRによって得られた旨を記載しております。

(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ですが、まず*pla1*遺伝子について御説明いたします。aでは、挿入遺伝子の供与体、bでは遺伝子産物のアレルギー誘発性について、それぞれ示唆する報告はなかった旨を記載しております。

cですが、(a)人工胃液ですが、下線部を引いたところが以前、先生方にお配りしたものからの修正点でございまして、ここは手島先生のほうから、こうしたほうが分かりやすくなるのではないかというようなコメントとともに修正案としていただいたものでございます。

文章のほうを御説明いたしますと、人工胃液の試験の結果ですが、SDS-PAGE分析及びウエスタンブロット分析を行った結果、SDS-PAGE後のCBB染色では試験開始後部分分解物は20分以内に、ウエスタンブロット分析では試験開始後完全長鎖は0.5分以内に分解されることが示されたとしております。

(b)人工腸液試験では、SDS-PAGE分析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6時間においても分解物が残存することが示された旨を記載しております。

また、加熱処理に対する感受性では、85℃10分で失活することが確認されたとしております。

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、PLA1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相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されなかった旨を記載しております。

このほか、②*amdS*遺伝子、12ページに行きまして③*pyrG*遺伝子については記載のとおり、これまで長年使用されてきた実績等により、問題ない旨を記載しております。

続いて、3ですが、(1)(2)については記載のとおりです。

(3)その他の配列ですが、*pla1*遺伝子の転写を安定化させる配列、また、転写物を安定化させ、遺伝子発現量を向上させる配列などを用いております。

4については記載のとおりでございます。

13ページに行きまして、5、発現ベクターについては記載のとおりです。

6、DNAの導入方法ですが、あらかじめ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ベクターを導入し、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、シーケンス解析により、宿主の染色体には含まれていない旨、記載をしております。

続いて「第5.組換え体に関する事項」ですが、1については記載のとおりでございます。

14ページをお願いいたします。2の(1)ですが、サザンブロット解析及びシーケンス解析を行った結果、各遺伝子座に1コピー導入されていることが確認されております。

続いて、(2) ORFの有無についての項目です。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の検索を行った結果、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が合計で725個、検出されております。

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は検出されませんでした。また、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Ara h 3が検出されましたが、一致する配列についてアレルゲンデータベースで検索した結果、エピトープとしては報告されておらず、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられております。

さらに、既知の毒性タンパク質との相同性検索、既知の毒性タンパク質の相同性の有無を確認するために、MvirDBデータベースを用いてE-value<0.02を指標として検索を行いました。その結果、3個のORFがデータベース中のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれのタンパク質も毒性を有するとの報告はございませんでした。

また、欠失させた9つの遺伝子のうち、セルフクロニングを除く5つの遺伝子座において検索を行ったところ、相同性を示す既知のアレルゲンはなかった旨、記載をしております。

毒性タンパク質の相同性についてですが、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見出されなかったとしております。

15ページをお願いいたします。第6、製造原料等に関する事項ですが、記載のとおりでございます。

第7の1ですが、PLA1は2017年以降、カナダで使用されているほか、米国では2016年にGRASとして認証されております。

第7の2、組換え体の残存についてはドットブロット解析の結果、組換え体DNAは検出されないことを確認しております。

3、非有効成分の安全性。

4、精製方法。

そして、5、常成分の変動の各項目については記載のとおりでございます。

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、コメントを賜りたいと思います。

どうぞ。

○山口係長 事務局のほうからよろしいでしょうか。

14ページの420行目なのですけれども、申請書をもとにこちらで案を作成したときはサザンプロット解析及びシークエンス解析を行った結果と書いているのですが、先ほど申請者の質疑を聞いている限りでは、シークエンス解析でも大丈夫で、サザンプロット解析はあくまでも参考だというような発言があったのですが、ここはこのままでもよろしいでしょうか。

○中島座長 申請者のほうの答弁は答弁として、評価書案は、私はこれでよろしいかと思うのですけれども、先生方、よろしいですね。申請者がああいうように言ったからと、それで合わせて評価書案を直す義理はないと考えますので、このままで。

今さらながら少々気になっているのですけれども、このもとの*Aspergillus niger*の宿主、これはB0-1株なのか、BO-1株なのか。申請者からのこれを見ますとB0のように見えるし、この評価書案では明らかにOになっていて、今さらなのですが、どちらなのでしょうね。

○山口係長 恐らくOだと思うのですが、申請者に確認したいと思います。

○中島座長 確認してみてください。私もOだと思うのです。

どうぞ。

○小関専門委員 そこは実は申請者もフォントを間違えているところがあって、16ページの2行目のところ、B0-1と書かれていると読める。その下の表はBO-1というように紛らわしいのです。

○中島座長 私も両方確かに迷った覚えがありますので、では、申請者にこの点も伝えて、フォントをきっちり区別してわかるようにしてくださいとお伝えください。

○小関専門委員 17ページのところ、さらにB0-95と書いてあるのです。だから、0のほう正しいのかもしれないです。

○中島座長 それでは、申請者に確認をお願いいたします。この点については万が一、0のほう正しいのであれば、評価書案のほうも直す必要がございますので、その点については私に預からせていただければ、責任を持って確認いたします。

○小関専門委員 お願いします。

○中島座長 ほかにありますか。

細かい字句等の修正につきましては、後ほど訂正箇所を事務局までお伝えいただければと思いますが、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、この修正について確認の上、事務局で修正後、私のほうでまた確認いたしまして、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、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、事務局のほうからございますでしょうか。

○飯塚課長補佐 特にございません。

○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。

以上をもちまして第180回「遺伝子組換え食品等専門調査会」、閉会いたします。