

# 食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

## (第197回) 議事録

1. 日時 令和2年1月24日(金) 14:00～16:02

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

・JPAo004株を利用して生産されたキシラナーゼ

・JPAo005株を利用して生産されたキシラナーゼ

(2) その他

### 4. 出席者

(専門委員)

中島座長、安達専門委員、岡田専門委員、小関専門委員、小野専門委員、  
橘田専門委員、児玉専門委員、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、川西委員

(事務局)

小平事務局次長、箆島評価第二課長、蛭田評価情報分析官、  
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

①JPAo004株を利用して生産されたキシラナーゼ

②JPAo005株を利用して生産されたキシラナーゼ

### 6. 議事内容

〇〇〇 皆さんおそろいのようなので、ただいまから第197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、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇が御欠席です。

本日の議題ですが、新規品目であるJPAo004株を利用して生産されたキシラナーゼ、JPAo005株を利用して生産されたキシラナーゼの安全性についての審議です。

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。

〇〇〇 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専門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ください。

また、本日は、新規品目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。

〇〇〇 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」に基づいて、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。

〇〇〇 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の(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。

〇〇〇 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。

ありがとうございます。

本日の2つの審議、酵素も同じ、申請者も同じ、宿主も同じ、どこが違うかということ、酵素の使い道が少々と基原の微生物が少々違うだけということですので、2件を並行して審議していただいて、事業者を呼ぶときも一遍に両方片づけるということで、事務局のほうからその違いをわかりやすく説明していただくということでやっただけかという提案をいただいております。先生方、よろしいでしょうか。

では、JPAo004株並びにJPAo005株を利用して生産されたキシラナーゼについて審議を行いたいと思います。事務局のほうからあわせて説明をお願いいたします。

〇〇〇 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。先ほど冒頭で御紹介いたしました、本日は、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。質疑応答終了後は説明者に退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、まず、緑色のファイル004株の申請書から御説明させていただきます。

緑色のファイルの2ページをお願いいたします。第1-1-(1)といたしまして、名称はキシラナーゼ、反応特異性はキシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断し、1,4-β-Dオリゴキシランを生ずる反応を触媒するものでございます。

(2) 製造方法ですが、生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製などの工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、デンプン製造には主にバレイショ及びトウモロコシが原料として用いられますが、価値が高いグルテンの製造及びデンプンの分級などが可能なことから、小麦を原料としたデンプンも製造されております。

小麦デンプンの製造は、基本的には小麦粉に水を加え、混練し、水洗などでデンプンとグルテンを分離させます。小麦デンプンの代表的な用途としては、その特性でやわらかな食感を付与することができるため、水産練り製品の原料が挙げられる。また小麦タンパク質は、その特性から、主に麩の原料として利用されております。

既存のキシラナーゼは、小麦デンプンの製造工程で、加水または混練の段階で添加されます。小麦粉中にはデンプン及びタンパク質のほかに、ヘミセルロースの一種であるキシランが含まれており、このキシランがタンパク質等と分子的に複雑なネットワークを形成しておりますが、*xylAA*がデンプンの原料となる小麦粉中のキシランを分解することにより、キシランと結合していたタンパク質が遊離され、グルテンが形成しやすくなり、その結果としてデンプンとタンパク質の分離が促進され、歩留まり及び品質の向上につながるとされております。

続いて、(4) 摂取量です。*xylAA*が全てのその他の小麦加工品の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定して、我が国におけるヒト体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行った結果、1.55 μg TOS/日/kg 体重と算出しております。

続いて、第1-2、宿主等の項目でございませう。

まず(1) 宿主の由来ですが、*Aspergillus oryzae* IFO4177株でございませう。

次のページをお願いいたします。DNA供与体の由来等でございませうが、こちらは5ページも御参照ください。表1に記載されているとおりでございませうけれども、*xylAA*遺伝子は*Aspergillus aculeatus* CBS101.43株、*amdS*遺伝子は*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株、*URA3*遺伝子は*Saccharomyces cerevisiae* FL100株由来でございませう。

いずれの2つも選択マーカーとして用いられております。また、そのほかにプロモーターやターミネーターについても性質とあわせて同じ表に記載しております。

6ページをお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質でございませう。こちらは図1に示したとおりでございませうが、宿主ゲノムに対して*xylAA*遺伝子発現カセットを挿入しております。また、欠失導入用ベクターで●●●の遺伝子を欠失させまして、ガンマ線照射で2

つの遺伝子クラスターを欠失させております。

7ページの9行目から(2)欠失DNAの性質でございますが、こちらは宿主染色体より欠失されたDNA、その性質を表2に示しておりますとおり、●●●の遺伝子が欠失導入用ベクターで欠失されております。

少し飛んで20行目からになりますけれども、(1)挿入方法です。遺伝子導入用ベクターpJPV015の構築後にプロトプラスト法で導入し、その結果、多コピーで●●●染色体に挿入されております。

8ページをお願いいたします。(2)DNAの欠失方法でございますが、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、●●●の遺伝子を欠失させております。このうち●●●の遺伝子のDNA欠失操作はセルフクロニングで、残りの*amyC*遺伝子については、欠失操作において異種由来*pyrG*遺伝子断片の挿入を伴い、当該断片の一部が生産株においても染色体上に残存するため、安全性に関する詳細な解析を行っております。

2)ガンマ線照射によるDNA欠失では、2つの遺伝子クラスターを破壊しておりますが、シクロピアゾン酸の産生経路において重要な遺伝子、そして、アフラトキシンの産生経路において重要な遺伝子の欠失がそれぞれサザンブロットにおいて確認されております。

続いて、1-3でございます。*A. oryzae*は食品用酵素の生産菌として、長年安全に使用されてきた実績があり、我が国でも、*A. oryzae*が生産するリパーゼやプロテアーゼ等の酵素は、既存添加物として食品に使用されております。この菌自身は、麴菌として味噌や醤油、醸造酒などの発酵食品の製造に広く用いられております。

1-4、宿主の構成成分等ですが、*A. oryzae*は*Aspergillus flavus*から家畜化された糸状菌であると考えられております。*A. flavus*は有害生理活性物質であるアフラトキシンを生産しますが、*A. oryzae*での産生は確認されておられません。また、*A. oryzae*の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸、 $\beta$ -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されております。

1-5は組換え添加物の性質等について記載されております。

(1)は記載のとおりです。

(2)製造方法ですが、こちらは10ページの図3に示したとおりでございます。培養液は数段階の工程を経て製品化され、生産菌も除菌ろ過により生産物から分離除去されます。

(3)用途等ですけれども、こちらは既存のものとは変わりはありません。

(4)有効成分等の比較につきましては、*A. aculeatus*は既存のキシラナーゼの基原生物であることから、それ由来のキシラナーゼには既に食品製造に使用されてきた実績があると考えられます。*xylAA*は既存のキシラナーゼと同様に、食品中のキシランを分解する酵素でございます。

11ページをお願いします。従来の添加物の相違点でございますが、まず(1)本品目ですけれども、販売実績は海外で22年、既存のものは日本を含む世界各国で30年以上でございます。そのほか性質として、至適pHや温度、反応特異性についても記載されております。

12ページをお願いいたします。組換え体と宿主の相違点ですけれども、JPAo004株では

*xyIAA*遺伝子、*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子が挿入されております。

13ページをお願いします。第2、宿主に関する事項ですけれども、2-1、宿主でございますが、*A. oryzae* IFO4177株でございます。IFO4177株とその派生株は宿主としてさまざまな食品や酵素の生産菌の作成に長年用いられてきており、食品用酵素としての利用実績はその下の表5に示されているとおりでございます。今回用いた宿主をバックグラウンドとする生産菌は、既に酵素製品の製造に広く利用されており、安全性に懸念を生じるような報告等はこれまでにされておられません。

14ページをお願いします。2-2、病原性ですけれども、*A. oryzae*がアスペルギルス症に関連する可能性がある事例がありますが、これは非常にまれな場合であり、*A. oryzae*は一般的に非病原性の微生物とされております。

また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程においては、バイオセーフティレベル2、3には分類されておらず、病原体等のリスク分類で1に分類されております。したがって、IFO4177株は非病原性であると考えられるとしております。

有害生理活性物質については、食品用酵素の生産菌として、国内外で長年安全に利用されてきた実績があり、*A. flavus*から家畜化された糸状菌であると考えられております。*A. flavus*は有害生理活性物質であるアフラトキシンを生産しますが、*A. oryzae*での産生は確認されておられません。また、*A. oryzae*の中にはシクロピアゾン酸、コウジ酸、 $\beta$ -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されていることから、*A. oryzae*が酵素生産に用いられる場合は、アフラトキシン、シクロピアゾン酸、コウジ酸、 $\beta$ -ニトロプロピオン酸の産生の有無も考慮されております。

本生産菌では、作成過程でアフラトキシン及びシクロピアゾン酸の産生に関する遺伝子が破壊されており、さらにJPAo004株でシクロピアゾン酸、コウジ酸、 $\beta$ -ニトロプロピオン酸、アフラトキシンが産生されていないかどうか確認したところ、いずれも検出限界未満であることが確認されております。

アレルギー性については、*A. oryzae*由来の酵素として、Asp o 13、Asp o 21の2つ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。Asp o 13はアルカリ性セリンプロテアーゼ、Asp o 21はTAKAアミラーゼで、これらは食物アレルギーとして登録されていないこと、呼吸器系感作が報告されていることから、基本的に吸入性アレルゲンとして整理可能でございます。それぞれ産業用酵素として使用され喘息等との関連性が報告されていることから、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言えるとしております。

こちらは*A. oryzae*由来の酵素の高頻度暴露による疾患事例であり、*A. oryzae*自体は少なくとも国内では味噌、醤油、醸造酒等の製造に安全に使用されてきた歴史的経緯があるため、これらのアレルゲンを原因とする職業アレルギーと当該酵素の由来となる*A. oryzae*自体のアレルギー性を単純に結びつけることは妥当ではないとしているものの、リスクを否定できないため、ほかの糸状菌同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分

に気をつける必要がある。すなわち、本菌を扱う職場においては、労働者の孢子に対する暴露を最小限に抑える環境を整えるべきであるとしております。

このように適切な環境で扱われている限り、IFO4177株によるアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるということでございます。

2-3から2-5については記載のとおりでございます。

16ページでございます。第3、ベクターに関する事項ですけれども、遺伝子導入用ベクターの構築には *Escherichia coli* 由来のプラスミドベクターである pUC19 が用いられています。

3-2、性質については記載のとおりでございます。

18ページをお願いいたします。第4、挿入DNA等の項目でございます。

1- (2) 安全性に関する事項ですけれども、*A. aculeatus* は *A. niger* と同じ *Nigri* 節に属し、*A. niger* の近縁種で、トマトの乾燥腐敗やブドウの灰色腐敗の原因となることが知られております。また、*A. aculeatus* は既存のキシラナーゼの基原生物であり、医薬品及び食品分野においてクエン酸またはコウジ酸といった有機物の生産菌として安全に使用されてきた経験があるため、十分な食経験があると言えるとしております。

続いて、*A. nidulans* の食経験は特に知られておりません。なお、アセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は選択マーカー遺伝子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。

続いて、*S. cerevisiae* ですが、有害生理活性物質を生産することは知られておりません。パン酵母やアルコール発酵用酵母として食品製造に昔から安全に使われてきた長い歴史があり、安全性には問題がないと考えられるということです。いずれも国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティレベル2、3には分類されておらず、リスク1に分類されます。

続いて、4-2- (1) 挿入遺伝子の合成方法に関する事項です。いずれも供与体のゲノムDNAを鋳型としまして、PCRによって増幅することで遺伝子断片を得ております。

(2) については記載のとおりです。

次のページをお願いいたします。挿入遺伝子の機能に関する説明でございますが、*xyIAA* 遺伝子からコードされる *xyIAA* はキシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断し、結合数に多様性のある(1→4)-β-D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒します。*xyIAA* のアミノ酸配列は図6に示したとおりでございます。既存のキシラナーゼの基原としても用いられる *A. aculeatus* ATCC 16872 株のキシラナーゼと●●●の相同性を示します。

21ページの下、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、PubMedの検索の結果、アレルギー誘発性を示唆する文献はございませんでした。

2) 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見ですけれども、遺伝子産物である *xyIAA* を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はないということでございます。

続いて、物理化学的処理に対する感受性に関する知見でございます。

①人工胃液ですけれども、**SDS-PAGE**、ウェスタンブロットで分析した結果、**xylAA**は反応開始後30秒以内に完全に消化されることが明らかになったということでございます。

次のページ、人工腸液でございます。**SDS-PAGE**、ウェスタンブロット分析で分析した結果、反応開始後、30分以内に完全に消化されることが明らかになったということです。なお、**SDS-PAGE**ではパンクレアチンを示すバンドが**xylAA**のバンドと重なっているため、**xylAA**の消化性を評価することができなかったということでございます。

続いて、加熱処理に対する感受性です。**pH6.0**、30分の条件で調べた結果、**80℃**の処理で完全に失活す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の構造相同性ですが、アレルギー誘発性の可能性を調べるために、既知のアレルゲンとの相同性検索を行っております。①80アミノ酸残基で35%以上一致するアレルゲンの検索、②連続した8アミノ酸が完全に一致するアレルゲンの検索という2つの条件で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ということです。

24ページ、**amdS**遺伝子ですけれども、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードするため、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中で、**amdS**遺伝子が挿入された菌株のみが選択的に生育することができます。アセトアミダーゼのアレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はなく、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遺伝子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いることから、アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を有するとは考えがたいとしております。

**URA3**遺伝子は、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、一般的にウリジン要求性を相補する選択マーカー遺伝子として用いられております。オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼのアレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はなく、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遺伝子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。よって、アレルギー誘発性及び毒性を有するとは考えがたいとしております。

続いて、4-3、4-4、4-5の(1)までは記載のとおりでございます。

少し飛びまして、29ページをお願いいたします。4-5-(2) 目的外のORFの有無についてでございます。遺伝子導入用ベクター**pJPV015**は、**xylAA**遺伝子、**amdS**遺伝子、**URA3**遺伝子を含み、これら以外のORFの有無を調べるために、**pJPV015**全体についてのORF検索を行いました。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と定義して検索を行った結果、147個のORFが検出されております。この検出された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の相同性検索を行っております。

まず、1) 既知アレルゲンとの相同性検索では、①の条件で検索を行ったところ、ORF

のpMT2155\_16とタバコの葉から同定されたvillin 2, partialで相同性が見られました。Villinタンパク質は、7つのドメイン、6つのgelsolin反復配列及び1つのheadpieceドメインから構成されるアクチン結合タンパク質でございます。villin 2, partialは、複数の植物に対してアレルギーを持つ患者の血清を用いてタバコの葉のcDNA発現ライブラリーからスクリーニングされたvillin相同性タンパク質で、精製された大腸菌組換えvillin 2, partialは、複数の植物アレルギーを持つ患者の血清と反応性を示しましたが、当該断片に対するエピトープの解析は現時点では報告がございません。pJPV015の発現タンパク質も含めた消化性の確認が行われ、その結果は良好であったことから、ORFのpMT2155\_16がタンパク質に翻訳されたとしても、安全性上の問題はないと考えられるとしております。

続いて、②の条件ですけれども、こちらはヒットする既知のアレルゲンはございませんでした。

既知の毒性タンパク質との相同性検索ですけれども、E-value<0.02を指標にして検索を行った結果、147個のORFのうち、ヒットしたORFは3個でございます。こちらについては隣の31ページにそれぞれ記載されているのですけれども、いずれも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がたいと結論づけており、これらのことからpJPV015にはアレルギー誘発性または毒性を有するタンパク質をコードするORFは含まれていないと考えられるとしております。

次のページをお願いいたします。32ページ、(3) 意図する挿入領域は、pJPV015全体でございます。

(4) については記載のとおりです。

第4-6、導入方法ですけれども、pJPV015をIFO4177株に導入する際にプロトプラスト形質転換法を用いております。この方法を用いることによって、pJPV015任意の配列を末端として、染色体上の任意の位置に1から複数コピーがタンデムに染色体に導入されると考えられるということです。

第4-7ですけれども、pJPV015には抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれず、遺伝子欠失ベクターに用いられたアンピシリン耐性遺伝子がJPAo004株のゲノム上に残存しないことをサザンブロット及びシーケンス解析により確認しております。

第5、組換え体に関する事項ですけれども、5-1は記載のとおりです。

2- (1) ですけれども、シーケンス解析について記載されております。

同じページの37行目にありますとおり、平均冗長度は200、結果として●●●染色体に挿入され、挿入により4,000塩基が欠失したことが明らかとなっております。この欠失領域には、データベース上のORFである●●●が含まれますが、これらは発現及び機能が検証された遺伝子ではなく、ゲノムの*in silico*解析で見出されたORFであり、その発現の有無または機能の詳細は不明ということです。

●●●のドメインを有することが示唆され、●●●は、既知の構造タンパク質や機能タンパク質と相同性が見られない機能未知のタンパク質をコードし得ることが示唆されまし



た。pJPV015の挿入により、●●●欠失がありましたが、これらのORFが仮に発現したとしても、その他の意図して行った遺伝子の欠失同様に安全性への影響はないものと考えられるとしております。

36ページ、ドットプロット解析による遺伝子コピー数の推定です。ショートリードによるゲノム解析の技術上の限界により、挿入断片と宿主ゲノムの境界領域より内側の挿入領域の全配列を決定することができず、挿入コピー数が多いことが示唆されました。xylAA遺伝子のコピー数を推定するために、ドットプロット解析が行われ、染色濃度の比較解析により、xylAA及びamdS遺伝子のコピー数は●●●であると推定されました。

続いて、隣のページの5-2-(2) 遺伝子導入におけるORFの有無について記載があります。6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンで挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFとして定義を行った結果、21行目からになりますけれども、●●●染色体の遺伝子挿入部位では●●●のORF、amyC遺伝子座では●●●のORFが検出されております。

その後、これらの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、毒性タンパク質との相同性検索を行っております。37から38ページにかけて記載されておりますが、ヒットしたものはなかったということです。

第6といたしまして、製造原料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旨が記載されております。

続いて、40ページ、第7、まず7-1、諸外国における認可等の状況ですけれども、xylAA製品は1996年に販売が開始され、以来、EU、北米を中心として加工助剤として使用されております。フランス、カナダではポジティブリストに収載されております。

7-2、組換え体の残存ですけれども、ドットプロット解析によりまして、xylAA製品にはJPAo004株の染色体DNAが残存しないことが確認されております。

7-3、非有効成分についての記載ですけれども、試験バッチの分析と我が国の食品添加物等の規格基準に定める規格値をそれぞれ表8に記載しております。いずれも我が国の規格基準を満たす結果となっております、●●●でございます。

7-4、5行目あたりからになりますけれども、酵素製品中におけるxylAAのタンパク質純度は高く、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色、ウェスタンブロットによる分析では、●●●、xylAAの純度は●●●であったということです。

7-5については記載のとおり。

第8ですけれども、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。

まず、004株の申請書の説明は以上でございます。

〇〇〇 続けて言っていた方がいいですね。005株を続けて、重複しているところは省いて結構です。

〇〇〇 それでは、続いて、黄色のファイル、005株のほうについて説明させていただきます。

まず、2ページをお願いいたします。1-1の(1)、(2)は、先ほどと同様です。

(3) 用途及び使用形態ですが、キシラナーゼは代表的な製パン用酵素の一つであり、パンの品質を向上するための改良剤として用いられております。一般的に、パン生地の原料である小麦粉にはアラビノキシランが数%程度含まれております。小麦粉中のペントサンは微量ではありますが、吸水性及び水分保持力が高いため、水分を吸収すると粘性物質となり、パンの品質に影響する成分でございます。パンの製造工程では、キシラナーゼをパン生地に添加し、ペントサンを分解することによって、パン生地のやわらかさ及びパンの膨張性を改善することができます。また、焼成後のパンの色または食感がよくなるとも言われております。

(4) 摂取量でございます。xlnTLが全てのパン類・菓子パン類の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定して、我が国におけるヒト体重1kg当たり1日最大摂取量の計算を行った結果、2.24  $\mu$ g TOS/日/kg 体重としております。

1-2、宿主に関する項目ですけれども、(1)は先ほどと同様です。

(2) 供与体についてでございますけれども、4ページをお願いいたします。表1の一番上の行になりますけれども、xlnTL遺伝子は*Thermomyces lanuginosus* CBS586.94株由来で、そのほかについては先ほどと同様です。

隣の5ページ(3)ですけれども、こちらは図1に示しておりますとおり、宿主ゲノムに対しましてxlnTL遺伝子発現カセットを挿入しております。また、欠失導入用ベクターで●●●の遺伝子を欠失させ、ガンマ線照射で2つの遺伝子クラスターを欠失させた点は同じでございます。

次のページをお願いいたします。6ページの下になりますけれども、挿入方法のところですが、先ほどとの相違点としまして、遺伝子導入用ベクターpJPV022の構築後にプロトプラスト法で宿主に導入し、その結果、多コピーで●●●染色体に挿入されております。

7ページに行きまして、(2) DNAの欠失方法ですが、こちらは004株と同様でございます。

8ページに行きまして、1-3、1-4、こちらも同じですので、割愛いたします。

1-5ですけれども、(1)、(2)は記載のとおりです。

(3) 用途及び使用形態ですが、パンの品質を向上させる目的で使用され、これは既存のものとは変わりはありません。

(4) 有効成分の比較ですけれども、既存のキシラナーゼには*T. lanuginosus* CBS586.94株由来のものはございません。xlnTLは既存のキシラナーゼと同様に、食品中のキシランを分解する酵素でございます。

続いて、10ページ、11ページは記載のとおりでございます。

12ページからが宿主に関する事項でして、少し飛んで15ページからが第3、ベクターに関する事項、こちらはどちらも先ほどと同様なので割愛いたします。

17ページ、第4の項目ですけれども、1-(2)安全性についてですが、まず、*T. lanuginosus*

は自然界に広く存在する高温菌であり、至適生育温度は50度付近でございます。食経験は特に知られておりませんが、ほかの糸状菌と比べて特に病原性で問題となる菌種ではなく、既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされたリパーゼの供与体でもあります。

その後の*A. nidulans*、18ページに行きまして、こちらも記載のとおりでございますので、省略いたします。

4-2- (1) 挿入遺伝子の合成方法等ですが、いずれも供与体のゲノムDNAを鋳型として、PCRによって増幅することによって得ております。

(2) については記載のとおりです。

19ページ、挿入遺伝子の機能に関する説明ですけれども、*xlnTL*遺伝子からコードされるxlnTLは、キシラン中の1,4-β-D結合を特異的に切断し、結合数に多様性のある(1→4)-β-D-オリゴキシランを生ずる反応を触媒します。アミノ酸配列は図6に示しているとおりでして、既存のキシラナーゼの基原としても用いられている*T. reesei*由来のキシラナーゼと●●●の相同性を示します。

20ページをお願いいたします。1) と2) については、記載のとおりでございます。

3) 物理化学的処理に対する感受性ですけれども、まず人工胃液ですが、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで分析した結果、反応開始後10分以内に完全に消化されることが明らかになったということです。

続いて、人工腸液ですが、SDS-PAGE、ウェスタンブロットで分析した結果、人工腸液では、6時間の処理ではほとんど消化されないことが示されております。

加熱処理では、pH6.0、30分の条件で調べた結果、85℃で完全に失活することが示されております。

22ページ、4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンの構造相同性ですけれども、①、②の2つの条件で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ということです。

23ページですけれども、*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子についての記載は、いずれも先ほどと同様なので割愛いたします。

4-3、4-4、4-5の(1) についても、記載のとおりでございます。

少し飛びまして、28ページをお願いします。4-5- (2) 目的外のORFの有無についてでございます。pJPV022全体についてORFの検索を行っておりまして、6通りの読み枠で終止コドンと終止コドンで挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義して検索を行った結果、147個のORFが検出されております。この検出された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の相同性検索を行っております。

1) では、①、②の条件でヒットする既知のアレルゲンはございませんでした。

毒性タンパク質についてですけれども、E-value<0.02を指標して検索を行った結果、データベースとヒットしたものは2つございまして、それが表7に記載されております。

いずれも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がたい

と結論づけており、これらのことからpJPV022にはアレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質をコードするORFは含まれていないと考えられるとしております。

(3) 意図する挿入領域は、pJPV022全体でございます。

30ページ、4-6、4-7は記載のとおりです。

31ページをお願いいたします。2-(1) シークエンス解析の結果ですけれども、37行目にありますとおり、平均冗長度は23.8、結果として●●●染色体に挿入され、挿入により1塩基が欠失したことが明らかとなっております。挿入部位には●●●の遺伝子が存在していることが明らかになりましたが、これは●●●と考えられております。発現及び機能が検証された遺伝子ではなく、ゲノムの*in silico*解析で見出された配列でありまして、仮に当該遺伝子から発現するタンパク質の生産能が欠損したとしても、安全性への影響はないものと考えられております。

続いて、定量PCR解析による遺伝子コピー数の推定です。ショートリードによるゲノム解析の技術上の限界により、挿入断片と宿主ゲノムの境界領域より内側の挿入領域の全配列を決定することができず、挿入コピー数が多いことが示唆されました。コピー数の推定のために定量PCR解析が行われ、解析では、*xlnTL*遺伝子に隣接して挿入された*amg*ターミネーターの部分配列を標的とするプローブが用いられております。その結果、コピー数は●●●であると推定されました。

34ページをお願いいたします。5-2-(2) といたしまして、ORFの有無について記載されております。6通りの読み枠でORFの検索を行った結果、●●●染色体では●●●のORF、*amyC*遺伝子座では●●●のORFが検出されました。これらの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ます。

結果は34から35ページにありますとおりですが、ヒットしたものはなかったということです。

続いて、第6の項目、こちらは記載のとおりでございます。

続いて、第7、7-1、諸外国における認可等ですけれども、*xlnTL*製品は1996年に販売が開始され、以来、EU、北米を中心として、加工助剤として使用されております。フランス、カナダではポジティブリストに収載されております。米国ではFDAのGRASの自己認証を経ております。

続いて、7-2、組換え体の残存ですけれども、ドットプロット解析によりまして*xlnTL*製品にはJPAo005株由来の染色体DNAが残存しないことが確認されております。

続いて、7-3、非有効成分ですけれども、こちらは表8に記載されているとおりでございます。

40ページをお願いいたします。7-4、5行目からになりますけれども、酵素製品中における*xlnTL*タンパク質純度は高く、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色の結果、●●●と推定されたということでございます。

7-5は記載のとおり。

第8ですけれども、第2から第7までの事項により、安全性の知見が得られるとしております。

005株の説明は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、申請書につきまして、先生方から御意見いただきたいと思っております。御意見なさるときには、004のほうか005のほうかを最初に御指摘いただけるとありがたく思います。

これは宿主やベクターについては全く同じで、キシラナーゼということも同じなのですが、004株だと近縁の*Aspergillus*からで、アミノ酸が●●●で、人工胃液、人工腸液で割とすぐに溶ける。これに対して005株のほうですと、*Thermomyces*ですからこれも糸状菌で、割と高温で生育する糸状菌のようですが、これはアミノ酸が●●●、結構タンパク質としては違うもののような感じです。人工胃液、人工腸液にはそこそこ抵抗すると。でも、いずれも諸外国でというか、欧州で20年以上の使用実績があるというものでございましょうか。

どうぞ。

〇〇〇 004株のほうの22ページの人工胃液の消化性試験のところなのですが、こちらは図7のAに関しては間違いがあるのではないかと思います。●●●と書いてある、これは●●●が入っているものなので、●●●のところなのですが、これでいくと●●●。ちょっとタンパクの分子量が、●●●がございまして。

それで、図7に関しては黄色のファイルのほうでは正確に描かれていまして、黄色のファイルのほうですと20ページになります。005の図7のAのほうで●●●なので、こちらは正しいと思うのですが、緑のファイルの方の図7は、Aの●●●が違っているのではないかと思います。

〇〇〇 こちらはウェスタンの結果もあって、ウェスタンのほうでも●●●ように見えるのですが、これと矛盾する。

〇〇〇 いや、これは大丈夫です。●●●に見えるというふうに出ますので、●●●というのはいいのですが、Aのほうに戻ってその●●●になっている。

〇〇〇 ●●●はずなのということですか。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 そもそも●●●の例のこれが何ぞやということですね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 それは直接聞いていただけますか。ここで議論しても始まらないと思っております。

〇〇〇 間違いではないかなというふうには思っています。

それと、緑の004のほうの図8、22ページの下側になるのですが、これがウェスタンで見ますと●●●というのわかるのですが、CBBのデータを見ますと、●●●

いるように見えるのですが、これは●●●ではないので、これは●●●ということではないかと思うのです。抗体の性質によるのかもしれないですが、●●●いるのですけれども、CBBで見る限りは●●●ように見えるということで、●●●では。

○○○ これもおっしゃるとおり、聞いてみていただけますか。

○○○ 同じく、黄色のほうでは21ページ、SIFでは切れません、残りますと言っているということなので、SIFでは緑のほうのも切れにくい、消化されにくいと考えていいのかと。聞いてみます。

○○○ それにあわせて、記述等も考えていただきたいということですよ。

○○○ はい。

○○○ ごもつともだと思imasるので、直接問いただしていただければありがたく思imas。

私のほうから、この緑のほうの004の36ページで、これはドットプロットで遺伝子のコピー数を推定しておるのですが、そのゲノム上でコピー数を明らかに、*oliC*が1コピー、*amy*が4コピーとあるのだけれども、麴菌で*amy*の遺伝子は3コピーで、●●●、これは4コピーと書いてあるところが気になっていて、これは3コピーが正しいので、これを根拠にコピー数が●●●コピーと計算しているのだとするとおかしくないかと言いたいわけです。

この場合はコピー数が少々違っていても、だからといって安全性どうこうという問題ではないのですが、私はこれを聞いてみたいと思っております。

次世代シーケンサーでやってみても、ここでは4,000 bpが欠失していたということ●●●染色体というのはわかるのだけれども、それ以上のデータはとれていない。タンDEMコピーについては次世代シーケンサーも威力を発揮しませんので、この点は仕方がないかなと思imas。

実は同じような問題なのですが、005株について、これも次世代シーケンサーで出ているのですが、これはデプスが23.8で、004株のほうはデプスが200でやっていたているのだけれども、ここはデプスが少々浅い。だけれども、接合領域はちゃんととれていて、●●●染色体に入っていると、そういうデータはとれているということです。

いずれにしても、これでコピー数は決められなくて、定量PCRで決めておるようなのですが、デプス23.8ということで、これで信頼性があると認めていいのかという話です。

だけれども、この遺伝子の場合にはデプスをふやしたところで結局タンDEMコピーの型はつかないと思imasし、また、麴菌は植物に比べれば大分ゲノムが単純で小さいので、二倍体ではなくて一倍体ですので、デプス23.8ならおおむね必要な情報を私はとれていると思うのですけれども、先生方、この辺はいかがですか。23.8だけれども、まあまあこれぐらいでも、これで全てのデータをとっているというわけではないので、私はいいように思うのですが、この辺、先生方、いかがでしょうか。

どうぞ。

○○○ このコピー数のところはいいと思うのですけれども、例えば解析数、この案件

とは関係ないかもしれませんが、解析するとき次世代シーケンサーをやってマッピングするとき、リファレンスの微生物に対してマップされないようなものというのが、Unknownな配列というのが出てくるのではないかと思います。

そういうのを見ると、前の案件にもありましたけれども、実は大腸菌の断片が入っているとか、ほかの生物種の断片が入っているとか、そういうのもわかると思うのです。なので、こういったデータを出してくる側として、実は不明な生物種由来の断片が、こういうのがあってというのが、あったのかなかったのかということがあるといいかなと。済みません。この案件とは関係ないですね。

〇〇〇 それは直接聞いてごらんになってもよろしいかと思いますが、ここでUnknownになっているのはコピー数がわからなかったからUnknownという説明がございまして、この場合はいいかなと思います。

それから、もう一つ私のほうで気になったのが、これはたまたま2つ並んで出てくるからなのですけれども、004株の42ページと005株の39ページにそれぞれ試験バッチの分析がありまして、おおむねいいのですけれども、なぜか●●●おりまして、●●●で、はかり方が違うのか何が違うのか。この辺、私としては少々気になるので聞いてみたいと思います。

ただ、コウジ酸そのものは、一時期発がん性が疑われた時期がございましたけれども、それは既に疑いが晴れておりまして、今では晴れて化粧品とかにもばんばん入っておりますので、●●●安全性については問題ないかなと思います。

先生方、ほかにどこかございませんでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 004株のほうの先ほど〇〇〇も指摘されたコピー数のところの36ページですけれども、これは放射線をラベルしてプローブをかけてやっているのですが、内部標準がある、内部に何コピーとわかっているもののコピー数が出てくるのは割とすんなり理解できるのですけれども、xylAAは内部にないので、全く新規の配列になるので、それで●●●コピーと計算しているやり方がいま一つよくわからなくて、本当はこれは放射線ラベルなんて長さとか比活性と全部きれいに計算して厳密にやれば出てくると思うのですけれども、なかなか難しい計算になるので、そこら辺は本当のところはどうやっているのかなと。

ただ、コピー数は、先ほど〇〇〇もおっしゃいましたけれども、余り安全性上そんなに目くじら立てることではこの場合はないのかなと思うは思うのですが、計算の仕方はやはりよくわからない。

もう一つ、amyのほうは4コピーと〇〇〇はおっしゃいましたけれども、●●●、この辺は聞いてみたいと思います。

〇〇〇 聞いてみましょう。そう私も思います。

ほかに先生方。

どうぞ。

〇〇〇 もう一つよろしいですか。4株のほうの29ページのアレルゲンですけれども、**villin 2, partial**というのと相同性が出たということなのですが、弱い相同性ですけれども、これが安全だという根拠が29ページの最後の2~3行のところに書かれているのです。消化性の確認が行われて結果が良好だったと書いてあるのですけれども、**villin 2**は別にそのタンパク質の消化性を見ているわけではないので、見たのはあくまでもxylAAなので、これは全然言えないと私は思います。いわゆる消化性がいいからという根拠が全然ないので、もし書くのであれば、こちらの4株のほうは純度が●●●のようですので、●●●、そんな感じの説明のほうが無難ではないかなと思います。

〇〇〇 基本的にはこの書き方の問題ですよ。確かにちょっとひっかかる書き方で、もう少しクリアに納得のいく説明の仕方のしようがあるはずだなと私も思いましたので、ここは特に申請者との議論の間ではなくても、この点は事務局のほうから後で指摘して、その辺の書き方を注意するように、少し書き直していただくようお願いいただけますか。どうぞ。

〇〇〇 小さなことですが、先ほど〇〇〇が御指摘された004株のほうの42ページの表8の●●●というのは、これは社内資料から見ると恐らく●●●だったのではないかな。

〇〇〇 これは、もとは●●●と事務局のほうから経緯も聞いておりまして。

〇〇〇 そうですか。

〇〇〇 iPadの1の社内文書16というのがそのデータになるのですけれども、これの1ページ目に結果がありまして、●●●と書いてあります。

〇〇〇 わかりました。

何かこれ、よく読んでみると御都合主義的に選んでいるなみたいに思った部分もあったのだけれども、そんなに、どっちにしてもレベルが低いから。

〇〇〇 コウジ酸はいずれにしても大して毒ではないので、その点そのものは問題ではないかな。

では、申請者をお呼びして、そんな深刻な問題は余りないように思うのですけれども、議論したいと思います。その場で思いついたことでもありましたら、せっかく申請者をお呼びするので聞いていただければと思います。

準備ができるまで少々休憩にいたします。

〇〇〇 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、お名前と会社名だけで結構です。

〇〇〇 ノボザイムズの〇〇〇と申します。よろしく願いいたします。

〇〇〇 同じくノボザイムズの〇〇〇と申します。よろしく願いいたします。

〇〇〇 本件は、004株と005株、どちらも宿主も共通していて、どちらもキシラナーゼということなので、まとめて審議しておりますので、質問も004株に関連するものと5株に関



連するものとまとめて聞かせていただこうと思いますので、よろしく願いいたします。

004株に関する事で、36ページにコピー数を推定するときに、コピー数のわかっているものとして、染色体の中で*oli*は1コピーで*amy*が4コピーと書いてあるのですが、よろしいですか。緑色のファイルの36ページです。これをもとにドットプロットを行って、●●●コピーであるところの●●●コピーであると推定しておられるのですが、幾つか疑問があります。麴菌にこの*amy*遺伝子は●●●3つなので、4つって本当かなということ。それから、この宿主は●●●という点なのですが、いかがでございましょうか。

〇〇〇 おっしゃるとおり、●●●おりました、詳しいところは確認しないとわからないのですけれども、●●●を弊社内で、社内で調べている遺伝子でやっている可能性がございいます。

一応、コピー数は生産菌にこれだけ入っているというのは確認してから試験を行っているはずなので、この*amy*がどの*amy*なのかというのは確認してみないとわからないのですけれども、このコピー数は確認しているはずだと思います。

〇〇〇 ヨーロッパではもう20年以上前から売っているということなので、資料を探すのは大変かと思いますが、ぜひ確認して、必要があればこの記述も改めていただければと思います。このままだといろいろとおかしいので、つじつまが合うように、よろしく願いいたします。

では、〇〇〇。

〇〇〇 004株のほうの22ページの人工胃液と腸液の実験なのですけれども、まず図7の人工胃液のほうなのですが、これは間違いではないかと思うのですけれども、Aのほうの●●●とあるのですが、ここには本来、●●●と思いますので●●●のバンドがCBBで染まると思うのですが、そこを確認いただきたいと思います。

〇〇〇 御指摘のとおり、●●●、先生のおっしゃるように●●●が当然かと思いますが、なぜこのバンドが●●●になっているのか、今この場ではちょっとわかりかねますので、弊社のほうに持ち帰って確認させていただきたいです。

〇〇〇 お願いいたします。

それから、続いて図8のBのほうを見ますと、ウェスタンバンドで●●●ということはわかるのですけれども、Aのクマシーブリリアントブルーのデータを見ますと、●●●いのように見えるのです。これが●●●と考えられるかと思うのですが、ウェスタンでこのバンドが、●●●というのは、何か抗体の性質によるものなのかということも考えられますので、その点、SIFのほうで完全に30分で消化し切れるということは、●●●言えるかもしれないのですが、言い切れないのではないかと思いますので、その点、確認いただければと思います。

〇〇〇 このデータに関して、また確認させていただきます。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 成分分析のところなのですが、42ページあたりまで、●●●で、数字に問題があ

るわけではないのだけでも、測定法がそんなに違うのかなと少し気になったのですが、何かわかることはございますか。

〇〇〇 済みません。もう一度お尋ねしたいのですけれども。

〇〇〇 004株で緑のほうの42ページの試験バッチでは麴菌は●●●、005株のほうは39ページに記載がありますが、これだと●●●ということで、●●●に見えるのだけでも、測定法を変える根拠か何かがあったのかなということですか。

〇〇〇 確認してみないとわからないのですけれども、基本的に生産菌を開発したり分析している時期がちょっとずれておいて、分析した時点での仕方が両方で違うのではないかと考えられます。

〇〇〇 物がコウジ酸なので、それ自体がさほど問題というわけではありませんが、確認できるようであれば、どこかに記載を加えていただくとありがたいと思います。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 ほかに先生方、ありますでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 4株のほうの先ほどのコピー数のところですが、これはドットプロットで●●●というやり方をやっているのですけれども、内部標準というか内部にもともとゲノムに何コピーあるというのに比べて、その強度で何倍あるから何十コピーというのは非常に計算がわかるのですけれども、xyIAAのほうは内部がないので、いわゆるゼロはゼロなのです。コントロールは。それに対して数値が出てきて、その数値がどうも*amdS*と同じぐらいの強度だから●●●と計算しているようなのですけれども、厳密に言うとこれはプローブの比活性とかそういうところで数値が変わってくるので、確認事項が幾つかあるようなので、そのときでいいのですけれども、どういうふうに計算したかというのをわかるように説明していただくとありがたいなと思います。

それと、せっかく次世代シーケンスされているので、次世代シーケンスのデータからコピー数ぐらいはある程度わかるケースが多いのですけれども、そちらではだめなのかなということもちょっとあるのです。

〇〇〇 計算方法に関しましては、確認して説明させていただきます。

また、シーケンス解析のほうでのコピー数の決定なのですから、このコピー数自体が●●●コピーということで、イルミナのほうでシーケンス解析はやっているのですけれども、ジャンクションを決定することまではイルミナのほうではできたのですが、コピー数をはかるころまでは、●●●コピー同じようにタンDEMでずっとなっているの、ショートリードの解析ではコピー数をはかることができなかったというところですか。

〇〇〇 平均100ではかっているのだったら、そのリード数でわからないかと聞いているのだけでも、リード数でもそれなりのデータというものはとれるもので。

〇〇〇 内部に1コピーあるもののリード数がこのぐらいで、こちらのある特定の部分のリード数はそれに比べて何倍あるから大体何コピーだというぐらいは多分できると思うの

ですけれども、それは今すぐ絶対必須というわけでもありません。ただ、次世代シーケンスされているので、そのくらいできるのではないかなど。

〇〇〇 その値がドットプロット解析の値と近い値だったら信頼できるよねぐらいのことが、もし言えるのだったら言っていただくとありがたいということでございます。

〇〇〇 多分、●●●、一応確認はさせていただきますが、もしかしたらそのデータはないかもしれません。ただ、ドットプロット解析に関しましては、定量PCRと同等の精度であることを確認しているようなデータはございますので、そこら辺のデータを確認させていただいて、精度についてはもう少し説明を加えさせていただきます。

〇〇〇 先生方、ほかにもございますでしょうか、〇〇〇、いいですか。

〇〇〇 ちょっと後学のために。これはいろいろところで活性をチェックされて、実はこういういろいろな種類のを前回のキシラナーゼのときもまた別の製品としてつくられて、それぞれ使用目的も違います。そういう一連のものは目的に応じて品質管理をされているのでしょうか。

〇〇〇 前回はキシラナーゼを見ていただいていたのですけれども、キシラナーゼといっても一応種類がいっぱいというか、●●●、そこはほとんど品質規格と同じようにちゃんとしっかりして、全部保管して製品として販売しております。

〇〇〇 社内としては、そういう社内規格的な管理はされているということですね。

〇〇〇 おっしゃるとおりです。

〇〇〇 わかりました。ありがとうございます。

〇〇〇 先生方、ほかに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す。

〇〇〇 それでは、議論を再開したいと思います。ただいまの議論を踏まえまして、何かございますでしょうか。コピー数等については、後から少し変動したところで、これが安全性に直結するとかそういった問題ではないと思いますし、また、20年以上欧州で無事に販売されていること等々を考えますと、これは安全性については問題ないと思うのですが、先生方、2件ともそう判定してよろしいでしょうか。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案のほうを2件ともお願いいたします。

〇〇〇 それでは、まず、4株のキシラナーゼの評価書案のほうから御説明させていただきます。評価書案を束ねた資料の1ページ目からです。

下のほうにページ番号を打っているのですけれども、まず、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。本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177株を宿主とし、*Aspergillus aculeatus* CBS101.43株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入することで作製したJPAo004株を利用して生産されたキシラナーゼでございます。本添加物は、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦デンプン製造における収量及び品質向上を目的として使用されます。

続いて「Ⅱ．食品健康影響評価」でございます。1の(1)、名称はキシラナーゼ、基原は糸状菌、放線菌、有効成分はキシラナーゼです。

(2) 製造方法ですが、概要、ろ過、製剤化等の工程を経て製造されます。生産菌は、除菌ろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態ですけれども、小麦デンプンの原料となる小麦粉中のキシランに作用することで、キシランと結合していたタンパク質の分離が促進され、デンプンの歩留まり及び品質が向上します。

(4) 摂取量です。全てのその他の小麦加工品の製造工程に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は1.55  $\mu$ g TOS/kg 体重/日でございます。

2の(1) 宿主の種名ですけれども、宿主は*A. oryzae* IFO4177株です。

*A. oryzae* IFO4177株は、清酒麴から分離された野生株でございます。

(2) DNA供与体の種名等ですけれども、キシラナーゼ遺伝子の供与体は*A. aculeatus* CBS101.43株、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow野生株及び*Saccharomyces cerevisiae* FL100株でございます。

(3) 挿入DNAの性質ですけれども、*xyIAA*遺伝子は*xyIAA*をコードします。*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子は、それぞれアセトアミダーゼ及びオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選抜マーカーに用いております。キシラナーゼの生産性を高めるために、*A. oryzae* IFO4177株の $\alpha$ -アミラーゼをコードする*amyC*遺伝子を含む●●●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、さらにガンマ線照射による*cpa*遺伝子クラスター及び*aff*遺伝子クラスターの欠失により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシン生産能が欠失しております。

*xyIAA*遺伝子、*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子を含む遺伝子導入用ベクターpJPV015をプロトプラスト法により宿主ゲノムに導入いたしております。

3、食経験等ですけれども、*A. oryzae*は長期にわたり食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験があり、国内では麴菌として味噌、醤油、醸造酒などの発酵食品製造に広く利用されております。

4、宿主の構成成分等ですが、*A. oryzae*でのアフラトキシンの産生は確認されておられません。*A. oryzae*の中にはシクロピアゾン酸、コウジ酸、 $\beta$ -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されております。

5、組換え添加物の性質でございますが、こちらは記載のとおりです。

次のページをお願いします。6の(1) 添加物の相違点でございますが、基原並びに至適温度、pHが異なる点です。

(2) 組換え体と宿主の相違点は、JPAo004株には*xyIAA*遺伝子が複数コピー導入され、*xyIAA*生産性を獲得している点。*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子を導入している点、並びに*amyC*遺伝子を含む複数遺伝子を欠失している点でございます。

以上から、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

があると判断しております。

続いて、第2、宿主に関する事項ですが、1は記載のとおりです。

2、病原性ですけれども、*A. oryzae*は一般的に非病原性の微生物であると考えられ、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当します。*A. oryzae*の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸を生産する株が報告されております。

*A. oryzae*由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及びTAKAアミラーゼは、アレルゲンデータベースに記載されており、いずれも呼吸器系感作が報告されておりますが、これは特定職種での高頻度ばく露が起因と考えられております。

*A. oryzae* IFO4177株は、食品添加物の生産菌として長年使用され、安全性に問題を生じる事例は報告されておらず、アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられるとしております。

3から5については記載のとおりです。

続いて、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pJPV015の作製には、*Escherichia.coli*由来のプラスミドpUC19が用いられております。

2、性質については記載のとおりです。

続いて、第4でございます。

1の(1)は記載のとおりです。(2)安全性についてですが、*A. aculeatus*は、従来のキシラナーゼの基原の一つであり、また、食品分野においてクエン酸等の有機物の生産菌として使用されてきました。*A. nidulans*の食経験は特に知られておりませんが、*amdS*遺伝子は選抜マーカーとして長年利用されてきた実績を有しております。

続いて、*S. cerevisiae*は、パン酵母やアルコール発酵用酵母として食品製造において長年にわたり安全に使用されてきました。いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当すると考えられるとしております。

2の(1)クローニングに関する事項ですが、いずれの遺伝子も宿主ゲノムからPCRにより得られております。(2)は記載のとおり。

(3)挿入遺伝子の機能に関する事項です。まず、①*xylAA*遺伝子ですけれども、コードされる*xylAA*は、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素でございます。

続いて、a、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はございませんでした。

続いて、b、遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見ですが、*xylAA*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ございません。

続いて、c、物理化学的処理に対する感受性の項目です。まず、(a)人工胃液に対する感受性ですが、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後30秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

(b) 人工腸液ですけれども、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析を行った結果、SDS-PAGE分析ではパンクレアチンを示すバンドと重なったため判定ができなかったが、ウェスタンブロット分析では試験開始後30秒以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

最後に (c) 加熱処理ですけれども、80℃・30分の処理で活性が消失することが示されたとしております。

続いて、d、既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見でございます。xylAA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た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する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されませんでした。

続いて② *amdS* 遺伝子です。コードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを分解し、アセトアミドを唯一の窒素源として利用できることにより、選抜マーカーとして使用されております。アセトアミダーゼについては、アレルギー誘導性及び毒性を示す報告はございません。

③ *URA3* 遺伝子は、オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼをコードし、ウリジン要求性を相補する選抜マーカーとして長年使用されてきました。オロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼのアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はございません。

以上のことから総合的に判断し、xylAA、アセトアミダーゼ及びオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼはアレルギー誘発性を有さないものと考えられたとしております。

続いて、3、4、5の(1)については記載のとおりでございます。

続いて、322行目、(2) 遺伝子導入用ベクターpJPV015に *xylAA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子以外のORFの有無を確認するために、全領域のORF検索を行っております。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終結する連続する30アミノ酸以上のORFが147個検出されました。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アミノ酸配列以上で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、タバコの葉由来のアクチン結合タンパク質の一種が検出されました。本製剤を用いた消化性試験では、良好な結果が得られていることから、仮に本ORFがタンパク質に翻訳されたとしても安全性への影響は低いと考えられるとしております。

なお、連続する8アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンはなく、さらに、これらのORFと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、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、3個のORFがデータベース上のタンパク質と相同性を示しましたが、いずれも毒性を有するとは考えがたいタンパク質でございました。

したがって、遺伝子導入用ベクターpJPV015には、アレルギー誘発性及び毒性をコードするORFが含まれる可能性は低いと考えられたと記載してしております。

(3) 意図する挿入領域は遺伝子導入用ベクターpJPV015全領域でございます。

(4) については記載のとおりです。

続いて、6、導入方法ですけれども、遺伝子導入用ベクターpJPV015を宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入しました。その結果、pJPV015は宿主ゲノム上の任意の位置にタンデムに複数コピー挿入されていると考えられております。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子については記載のとおりです。

続いて、第5、組換え体ですけれども、1については記載のとおりでございます。2の(1) JPAo004株の染色体上でのpJPV015の導入位置を確認するためにシーケンス解析を行った結果、1カ所に挿入されたことを確認しました。さらに、ドットブロット解析にてコピー数を確認した結果、複数コピーのxylAA遺伝子が導入されていることが確認されました。

続いて(2) ORFの有無の項目ですけれども、JPAo004株の遺伝子挿入領域と宿主ゲノムとの接合部位をまたぐ領域並びに欠失導入用ベクターを導入したamyC遺伝子座及び両接合近傍配列における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が合計で175検出されました。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アミノ酸配列以上で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はありませんでした。さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性を確認するために、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、相同性を示すORFは認められませんでした。したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられております。

第6については記載のとおりでございます。

第7の1、諸外国における認可状況ですけれども、xylAA製剤は、フランス、カナダにおいて食品用加工助剤のポジティブリストに掲載されております。

7の2、ドットブロット解析によりまして、xylAA製剤中には、組換えDNAが検出されないことが確認されております。

続いて、3、xylAA製剤前の酵素サンプルは、コウジ酸、β-ニトロプロピオン酸、シクロピアゾン酸及びアフマトキシンの産生量を分析した結果、いずれも検出限界未満であることを確認しております。

4、5、第8については、記載のとおりでございます。

4株の評価書案については以上でございます。

〇〇〇 続いて、5株をお願いします。

〇〇〇 続いて、5株のほうの評価書案の説明をさせていただきます。評価書の19ページからでして、まず24ページをお願いします。先ほどの評価書案と記載が重複する部分もございまして、適宜省略しながらの説明をさせていただきます。

まずⅠ、概要でございます。本添加物は*Aspergillus oryzae* IFO4177株を宿主とし、*Thermomyces lanuginosus* CBS 586.94株由来のキシラナーゼ遺伝子を導入することで作製したJPAo005株を利用して生産されたキシラナーゼでございます。本添加物は、キシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、パン生地の品質向上を目的として使用されます。

続いて、Ⅱ、食品健康影響評価についてです。

1の(1)(2)は先ほどと同様です。

(3)用途及び使用形態ですけれども、パンの製造工程において、原料となる小麦粉中のキシランを加水分解することで、生地の弾力向上等を目的として使用されます。

(4)摂取量です。全てのパンの製造工程に使用され、最終製品中に100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は2.24 μg TOS/kg 体重/日でございます。

続いて、2の(1)は4株と同様です。

(2)DNA供与体の種名等ですけれども、キシラナーゼの遺伝子の供与体は*T. lanuginosus* CBS586.94株由来。*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子の供与体については、*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株、*Saccharomyces cerevisiae* FL100株でございます。

(3)挿入DNAの性質ですが*xlnTL*遺伝子は*xlnTL*をコードします。そのほかの規制は4株と同様です。

3、4についても記載ぶりは同様でございます。

5、組換え添加物の性質ですけれども、こちらは記載のとおりでございます。

続いて、26ページ、6の(1)といたしまして、添加物の相違点ですが、基原並びに至適温度、pHが異なる点でございます。

組換え体と宿主との相違点は、JPAo005株には*xlnTL*遺伝子が複数コピー導入され、*xlnTL*生産性を獲得している点、*amdS*遺伝子、*URA3*遺伝子を導入している点、並びに*amyC*遺伝子を含む複数遺伝子を欠失している点でございます。

続いて、第2と第3については、先ほどと同様なので説明は割愛いたします。

少し飛んで、第4の項目をお願いします。1の(1)については記載のとおりです。

218行目から安全性についてでございますけれども、*T. lanuginosus*は自然界に広く存在する高温菌で、食経験は知られておりませんが、安全性審査の手続を経た旨の公表がなされたりパーゼの供与体としての実績がございます。

*A. nidulans*、*S. cerevisiae*の記載は4株と同様でございます。

続いて、2の(1)クローニングに関する事項でございますが、いずれの遺伝子も宿主ゲノムからPCRにより得られております。

(2)については記載のとおりです。

続いて、(3)挿入遺伝子の機能でございます。まず①*xlnTL*遺伝子ですが、コードされる*xlnTL*はキシランの1,4-β-D-キシロイド結合をエンド型で加水分解する酵素でございます。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見でございますが、文献検索を行



った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はございませんでした。

b、遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見ですが、*xlnTL*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す報告はございません。

c、物理化学的処理でございます。まず (a) 人工胃液に対する感受性でございますが、**SDS-PAGE**及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後10分以内にバンドが消失したため、分解されることが示されたとしております。

(b) 人工腸液でございますが、**SDS-PAGE**及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後6時間においても分解されないことが示されたとしております。

(c) 加熱処理に対する感受性ですが、85℃・30分の処理で活性が消失することが示されております。

続いて、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けれども、*xlnTL*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相同性検索を行った結果、連続する80アミノ酸配列以上で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は検出されませんでした。

②の*amdS*遺伝子、③の*URA3*遺伝子については、4株と同様でございます。

以上のことから総合的に判断し、*xlnTL*、アセトアミダーゼ及びオロチジン5'-リン酸デカルボキシラーゼはアレルギー誘発性を有さないものと考えられたとしております。

続いて、3、4、5の(1)については記載のとおりです。

続いて、(2) 遺伝子導入用ベクター

JPV022

に、*xlnTL*遺伝子、*amdS*遺伝子及び*URA3*遺伝子以外のORFの有無を確認するために全領域でORFの検索を行っております。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終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計で147個検出されました。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アミノ酸配列以上で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はございませんでした。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、**E-value<0.02**を指標として検索を行った結果、2個のORFがデータベース上のタンパク質との相同性を示しましたが、いずれも毒性を有するとは考えがたいタンパク質でございました。したがって、遺伝子導入用ベクター

JPV022

には、アレルギー誘発性及び毒性をコードするORFが含まれる可能性は低いと考えられたとしております。

(3) 意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター、

JPV022

全領域でございます。

(4)、その後の6、7については記載のとおりです。

続いて、第5、組換え体に関する事項です。

1は記載のとおり。

2の(1)でございますが、**JPAo005**株の染色体上での

JPV022

の導入位置を確認するた

めにシーケンス解析を行った結果、1カ所に挿入されたことを確認し、さらに定量PCR解析を用いてコピー数を解析した結果、複数コピーのxlnTL遺伝子が導入されていることが確認されました。

(2) ORFの有無の項目でございますが、JPAo005株の遺伝子挿入領域と宿主ゲノムとの接合部位をまたぐ領域並びに欠失導入用ベクターを導入した*amyC*遺伝子座及び両接合近傍配列における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が合計185個検出されました。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査を行った結果、連続する80アミノ酸配列以上で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はありませんでした。さらに、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、E-value<0.02を指標として検索を行った結果、相同性を示すORFは認められませんでした。したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられたとしております。

第6については記載のとおりです。

第7、まず諸外国における認可状況ですが、フランス、カナダにおいて食品用加工助剤のポジティブリストに掲載されております。また、米国では1997年にGRASとして認証されております。

続いて、7の2、ドットプロット解析により、xlnTL製剤中には組換えDNAが検出されないことが確認されております。

3、非有効成分の項目ですけれども、xlnTL製剤前の酵素サンプルは、コウジ酸、β-ニトロプロピオン酸、シクロピアゾン酸及びアフラトキシンの産生量を分析した結果、いずれも検出限界未満であることを確認しております。

4、5、第8については記載のとおりでございます。

5株の評価書案は以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案につきまして、御意見、コメント等を承りたいと思います。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。

〇〇〇 4株のほうに関しては、11ページの266行目なのですけれども、これはまた回答がどのように出てくるかということはあるのですが、これを生かすとすると、ウェスタンブロット分析では試験開始後30分以内に完全長のバンドが消失したためという形で、分解され得ることが示されたという形でやり直していただければと思うのですが、またデータが出てきたら、そこで書いていただければと思います。

〇〇〇 これにつきましては、申請者のほうから回答が来て、それに合わせて評価書案のほうも微調整が必要ということになりましたら、私と関係する先生のほうで確認して、そ

れから最終的に食品安全委員会のほうに報告するという形にしたいと思います。それでよろしいでしょうか。

〇〇〇 大丈夫です。

〇〇〇 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、後ほど確認してということで、議題1についてはこれで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。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 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でございます。

以上をもちまして、第197回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会にいたします。

ありがとうございました。