遺伝子組換え食品等専門調査会における審議結果について

1. 審議結果

厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた JAPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼに係る食品健康影響評価（令和2年5月20日付け厚生労働省発食0520第5号）については、令和3年2月26日に開催された第208回遺伝子組換え食品等専門調査会において審議され、審議結果（案）が取りまとめられた。

2. JAPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼに係る食品健康影響評価についての意見・情報の募集について

上記品目に関する「審議結果（案）」を食品安全委員会ホームページ等に公開し、意見・情報を募集する。

1) 募集期間

令和3年4月27日（火）開催の食品安全委員会（第814回会合）の翌日の令和3年4月28日（水）から令和3年5月27日（木）までの30日間。

2) 受付体

電子メール（ホームページ上）、ファックス及び郵送

3) 意見・情報提供等への対応

いただいた意見・情報等を取りまとめ、遺伝子組換え食品等専門調査会の座長の指示のもと、必要に応じて専門調査会を開催し、審議結果を取りまとめ、食品安全委員会に報告する。

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAN005 株を利用して生産された
ペクチナーゼ

2021年4月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>	3
<食品安全委員会委員名簿>	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>	3
要 約	4
II. 食品健康影響評価	5
第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺 伝子組換え添加物及び組換え体との相違	5
1. 従来 of 添加物の性質及び用途等に関する資料	5
2. 宿主及び導入 DNA	6
3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料	6
4. 宿主の構成成分等に関する資料	6
5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料	6
6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物 及び組換え体と宿主等の相違点	7
第 2. 宿主に関する事項	7
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	7
3. 寄生性及び定着性に関する事項	8
4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項 ...	8
5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項	8
第 3. ベクターに関する事項	8
1. 名称及び由来に関する事項	8
2. 性質に関する事項	8
第 4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項	9
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	9
3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事 項	11
4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
第 5. 組換え体に関する事項	12
1. 宿主との差異に関する事項	12
2. 遺伝子導入に関する事項	12
第 6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	13

1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	13
2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られている こと	13
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....	13
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	13
2. 組換え体の残存に関する事項.....	13
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	13
4. 精製方法及びその効果に関する事項.....	14
5. 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項	14
第8. 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な 事項	14
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	14
<参照>	15

<審議の経緯>

- 2020年5月26日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0520第5号）、関係書類の接受
- 2020年6月16日 第782回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2021年2月26日 第208回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2021年4月27日 第814回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- 佐藤 洋（委員長）
山本 茂貴（委員長代理）
川西 徹
吉田 緑
香西 みどり
堀口 逸子
吉田 充

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

- 中島 春紫（座長）
児玉 浩明（座長代理）
安達 玲子 近藤 一成
飯島 陽子 手島 玲子
岡田 由美子 樋口 恭子
小関 良宏 山川 隆
小野 竜一 吉川 信幸
橘田 和美

要 約

「JPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼ」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*A. niger* AP-18 株由来のペクチナーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼである。本添加物は、ペクチンの基本骨格であるポリガラクトuron酸をエンド型で開裂する β 脱離反応を触媒する酵素であり、ジュース製造に使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性、アレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「JPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

名称：JPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼ
用途：ジュース製造時の生産性及び品質の向上
申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社
開発者：Novozymes A/S (デンマーク)

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*A. niger* AP-18 株由来のペクチナーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN005 株を利用して生産されたペクチナーゼであり、その反応特異性からペクチンリアーゼに分類される。本添加物は、ペクチンの基本骨格であるポリガラクトuron酸の α -1,4-ガラクトuronシド結合をエンド型で開裂する β 脱離反応を触媒する酵素であり、ジュース製造に使用される。

II. 食品健康影響評価

第1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名称：ペクチナーゼ (ペクチンリアーゼ)

基原：*Aspergillus niger*

有効成分：ペクチンリアーゼ

IUB No.：EC 4.2.2.10

CAS No.：9033-35-6

(2) 製造方法

ペクチナーゼは、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

ペクチナーゼは、ジュースの製造において、ペクチンを分解し、野菜及び果実の搾り汁の濾過性の向上及び清澄化の効果が得られることで生産性及び品質の向上を目的として使用される。

(4) 摂取量

ペクチナーゼが全てのジュース製造に使用され、100%最終製品中に残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、86.1 μ g TOS (Total Organic Solids)/kg 体重/日である (参照 1)。

2. 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*A. niger* BO-1 株である。*A. niger* BO-1 株は、自然界から分離された *A. niger* C40-1 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、きょう雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失させた株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ペクチナーゼ (*peA*) 遺伝子の供与体は、*A. niger* AP-18 株である。選抜マーカであるアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

peA 遺伝子は、ペクチナーゼ (*peA*) をコードする。*amdS* 遺伝子はアセトアミダーゼをコードし、選抜マーカに用いた。

peA 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットを、インテグラーゼにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入した。

なお、生産菌の作製に当たり、あらかじめ複数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ているが、このうちセルフクローニングに該当しない一部の遺伝子座では、ORF 検索を行い、安全性を検討した（第 5-2-(2) 参照）。

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

A. niger は、長年食品や食品用酵素の製造に安全に利用されている。また、*A. niger* は、日本において黒麹菌として焼酎、食酢等の発酵食品の製造に広く用いられている。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. niger は、オクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株がオクラトキシン 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いる（参照 2）。

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は、以下のとおりである。

製品名：peA

有効成分：ペクチナーゼ

IUB No.：EC 4. 2. 2. 10

CAS No.：9033-35-6

(2) 製造方法

pelA は、JPAN005 株を生産菌として、従来のペクチナーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、2 回の除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

pelA は、従来のペクチナーゼと同様に、ジュース製造時における生産性及び品質を向上するために使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

pelA は、従来のペクチナーゼと同様に、植物中のペクチンを分解する酵素である。

6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

pelA と従来のペクチナーゼとの相違点は、アミノ酸数、至適温度が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPAN005 株と宿主との相違点は、JPAN005 株には *pelA* 遺伝子が複数コピー導入され、ペクチナーゼの高産生性を獲得している点、*amdS* 遺伝子を導入している点及びペクチナーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点である。

以上 1 から 6 までから、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、以下の各事項について評価を行った。

第 2. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*A. niger* BO-1 株である。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

A. niger は、病原性で問題となる菌種ではないとされており、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（BSL）1 に相当する（参照 3）。

A. niger は有害生理活性物質であるオクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株はこれらのマイコトキシンを産生しないことが確認されている（参照 2）。

A. niger は、アレルギー性において特に問題となる菌種ではないとされている

が、*A. niger* 由来の酵素として β -キシロシダーゼ、セリンプロテアーゼ及び 3-フィターゼ B がアレルゲンデータベース^aに登録されている。これらの酵素は吸入性アレルゲンとして報告されており、*A. niger* 由来の酵素に起因するものとして報告されたアレルギーは、特定職種での高頻度ばく露が原因と考えられる。*A. niger* は、国内では焼酎等の製造に安全に利用されてきた経験があるが、これらの酵素を原因とするアレルギーと *A. niger* のアレルギー性との関連性を否定できないことから、リスクの低減のため、他の糸状菌と同様、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（参照 4）。

以上のことから、適切な環境で扱われている限り、*A. niger* BO-1 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。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

4. 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

A. niger には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

5. 宿主の近縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

A. niger の近縁種には、日和見感染及び気管支アレルギーの原因菌である *A. fumigatus* や、オクラトキシン産性能を有する *A. carbonarius* が知られている。

第3. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV024 の作製には、*E. coli* 由来のプラスミド pBluescript SK-が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pBluescript SK-の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pBluescript SK-の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

プラスミド pBluescript SK-の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee 検索日：2018年6月

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pBluescript SK-には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pBluescript SK-には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

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

第4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

pelA 遺伝子の供与体は *A. niger* AP-18 株である。*amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(2) 安全性に関する事項

A. niger の安全性は、第2-2に記載のとおりである。

A. nidulans は、食経験は認められていないが、*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する。

A. niger 及び *A. nidulans* はともに、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照3）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

pelA 遺伝子は *A. niger* AP-18 株のゲノム DNA を鋳型として、分泌シグナル配列を含む配列を PCR で増幅して得られた。

amdS 遺伝子は *A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノム DNA を鋳型として、PCR により得られた。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *pelA* 遺伝子

pelA 遺伝子がコードする *pelA* は、ペクチンの基本骨格であるポリガラクトuron酸の α -1,4-ガラクトツロノシド結合をエンド型で開裂する β 脱離反応を触媒する。

- 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
A. niger AP-18 株のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^bを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。
- b. 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見
pelA 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。また、*A. niger* AP-18 株由来のペクチナーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^bを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。
- 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
(a) 人工胃液に対する感受性
pelA の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 0.5 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（参照 5）。
- (b) 人工腸液に対する感受性
pelA の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 1 時間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（参照 5）。
- (c) 加熱処理に対する感受性
pelA の加熱処理に対する感受性について確認した結果、70°C・30 分で失活することが確認された。
- 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
pelA 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^c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なかった（参照 6）。

② *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解する酵素であり、アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選抜マーカーとして利用された。アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

^b PubMed、検索日：2018 年 12 月

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(FARRPversion18)

以上のことから総合的に判断し、*pelA* 及びアセトアミダーゼがアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

pelA 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター断片と *A. nidulans* Glasgow 野生株由来のトリオースリン酸異性化酵素をコードする *tpi* 遺伝子のプロモーター断片を連結した *na2/tpi* プロモーター配列である。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *tef1* 遺伝子のプロモーター配列である（参照 5）。

(2) ターミネーターに関する事項

pelA 遺伝子及び *amdS* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーター配列である（参照 5）。

(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

pelA 遺伝子の転写を安定化させるため、*A. niger* BO-1 株由来の *payA* 遺伝子の 5'側非翻訳領域 (*payA* 5'UTR 配列) を用いた。また、*pelA* 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ため、Tabacco mosaic virus の coat protein 遺伝子の 3'側非翻訳領域 (*CP* 3'UTR 配列) を用いた（参照 5）。

そのほか、インテグラーゼ認識配列 (FRT-F / FRT-F3 配列) が用いられている。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pBluescriptSK- に、インテグラーゼ認識配列を両端に配した *pelA/amdS* 遺伝子断片発現カセット、インテグラーゼ遺伝子等を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pJPV024 を作製した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV024 の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 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オープンリーディングフレームが含まれていないこと 第 5-2-(2) に記載のとおりである。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクターpJPV024 の FRT-F 配列から FRT-F3 配列までの遺伝子発現カセットを含む領域である。

- (4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクターpJPV024 は、全長塩基配列を解析した結果、その配列は構築したとおりであることが確認され、精製されたものが用いられていることから、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

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pJPV024 を導入し、ベクター上のインテグラーゼの作用により、ベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある *pelA* / *amdS* 遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*amdS* 遺伝子による選抜を行った後に、*pelA* の産生量を指標として形質転換体を選択した。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV024 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。このことは、シーケンス解析により確認されている（参照 6）。

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

JPAN005 株は、*pelA* / *amdS* 遺伝子発現カセットが導入され、ペクチナーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失させている。

2. 遺伝子導入に関する事項

- (1) 制限酵素による切断地図に関する事項

各遺伝子座への *pelA* 遺伝子/*amdS* 遺伝子発現カセットの挿入を確認するためにシーケンス解析を行った結果、設計通り各遺伝子座に全長の発現カセットが挿入されたことが確認された。また、挿入領域近傍の塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 6）。

- (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

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（以下「ORF」という。）の有無を確認するために、挿入 DNA と 5' 近傍配列領域を含む領域及び 3' 近傍配列を含む領域における ORF 検索を行った。また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにおいて、異種遺伝子断片の残存した遺伝子座で、同様に 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終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 1014 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^d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として検出された Der f 15、Der p 15、Asp f 18、Asp f 18 及び Subtilisin は、呼吸器誘発性アレルゲンであることから、食物アレルギー誘発性についての懸念は低いと考えられる。

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なかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース (参照 7) を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、5 個の ORF がデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれも毒性を有するとは考え難いタンパク質であった (参照 8~33)。

第 6. 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

1. 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

pelA 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績がある。

2. 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

pelA 製品の製造原料及び製造器材は、安全に使用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合している。

第 7. 遺伝子組換え添加物に関する事項

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項

pelA 製品は、欧州で販売されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、pelA 製剤前の酵素サンプルには組換え DNA が残存しないことが確認された (参照 34)。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

pelA 製剤前の酵素サンプルは、食品衛生法の規格基準を満たしている (参照 35)。また、製造原料は食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、安全性に問題のある非有効成分が

^d ネブラスカ大学アレルゲンデータベース(FARRPversion18)

含まれるとは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

pelA 製剤は、生産菌の培養物を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考えられる。

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

pelA 製剤の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動はないと考えられる。

第8. 第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第2から第7までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAN005株を利用して生産されたペクチナーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 平成29年国民健康・栄養調査報告
2. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内文書)
3. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊1「病原体等のBSL分類等」.
4. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijck PWM. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Review 2002;59(4-5):426-435.
5. 遺伝子導入ベクターpJPV024のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
6. JPAN005株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
7. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD et al. MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D391-394.
8. Osman KL, Jefferies JM, Woelk CH, Cleary DW, Clarke SC. The adhesins of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, Review 2018;16(3):187-196.
9. Holden MTG, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeno-Tarraga AM, Atkins T et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(39):14240-14245.
10. Stevens JM, Ulrich RL, Taylor LA, Wood MW, DeShazer D et al. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bimA mutant. *Journal of Bacteriology* 2005;187(22):7857-7862.
11. McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, Article 2001;413(6858):852.
12. Maurer J, Jose J, Meyer TF. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *Journal of Bacteriology* 1999;181(22):7014-7020.
13. Baldy-Chudzick K, Stosik M. Diversity of fliC gene in commensal *Escherichia coli* derived from various mammals. *Folia Microbiologica* 2007;52(3):261-272.
14. Hales BA, Morgan JAW, Hart CA, Winstanley C. Variation in flagellin genes and proteins of *Burkholderia cepacia*. *Journal of Bacteriology* 1998;180(5):1110-1118.
15. Kanesaki Y, Shiwa Y, Tajima N, Suzuki M, Watanabe S et al. Identification of Substrain-Specific Mutations by Massively Parallel Whole-Genome Resequencing of *Synechocystis* sp PCC 6803. *DNA Research* 2012;19(1):67-79.
16. Moran DL, Tetteh AO, Goodman RE, Underwood MY. Safety assessment of

- the calcium-binding protein, apoaequorin, expressed by *Escherichia coli*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2014;69(2):243-249.
17. Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S. Two genes encoding serine protease homologues in *Serratia marcescens* and characterization of their products in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* 1997;121(5):902-913.
 18. Tripathi LP, Sowdhamini R. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: Analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *Bmc Genomics* 2008;9.
 19. Warren G, Corotto L, Wolber P. CONSERVED REPEATS IN DIVERGED ICE NUCLEATION STRUCTURAL GENES FROM 2 SPECIES OF PSEUDOMONAS. *Nucleic Acids Research* 1986;14(20):8047-8059.
 20. Vlcek C, Paces V, Maltsev N, Paces J, Haselkorn R et al. Sequence of a 189-kb segment of the chromosome of *Rhodobacter capsulatus* SB1003. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(17):9384-9388.
 21. Garber AC, Shu MA, Hu JH, Renne R. DNA binding and modulation of gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Journal of Virology* 2001;75(17):7882-7892.
 22. Rainbow L, Platt GM, Simpson GR, Sarid R, Gao SJ et al. The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *Journal of Virology* 1997;71(8):5915-5921.
 23. Locht C, Geoffroy MC, Renauld G. COMMON ACCESSORY GENES FOR THE BORDETELLA-PERTUSSIS FILAMENTOUS HEMAGGLUTININ AND FIMBRIAE SHARE SEQUENCE SIMILARITIES WITH THE PAPC AND PAPD GENE FAMILIES. *Embo Journal, Article* 1992;11(9):3175-3183.
 24. Lugli EB, Allen AG, Wakefield AE. A *Pneumocystis carinii* multi-gene family with homology to subtilisin-like serine proteases. *Microbiology-Uk* 1997;143:2223-2236.
 25. Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G et al. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 2004;304(5669):441-445.
 26. Quistgaard EM, Low C, Guettou F, Nordlund P. Understanding transport by the major facilitator superfamily (MFS): structures pave the way. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016;17(2):123-132.
 27. Ling PD, Ryon JJ, Hayward D. EBNA-2 OF HERPESVIRUS PAPIO DIVERGES SIGNIFICANTLY FROM THE TYPE-A AND TYPE-B EBNA-2 PROTEINS OF EPSTEIN-BARR-VIRUS BUT RETAINS AN EFFICIENT TRANSACTIVATION DOMAIN WITH A CONSERVED HYDROPHOBIC

- MOTIF. *Journal of Virology* 1993;67(6):2990-3003.
28. Jiang H, Cho YG, Wang F. Structural, functional, and genetic comparisons of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A, 3B, and 3C homologues encoded by the rhesus lymphocryptovirus. *Journal of Virology*, Article 2000;74(13):5921-5932.
 29. Schwyzer M, Wirth UV, Vogt B, Fraefel C. BICP22 OF BOVINE HERPESVIRUS-1 IS ENCODED BY A SPLICED 1-CENTER-DOT-7 KB RNA WHICH EXHIBITS IMMEDIATE-EARLY AND LATE TRANSCRIPTION KINETICS. *Journal of General Virology* 1994;75:1703-1711.
 30. Nishio Y, Nakamura Y, Kawarabayasi Y, Usuda Y, Kimura E et al. Comparative complete genome sequence analysis of the amino acid replacements responsible for the thermostability of *Corynebacterium efficiens*. *Genome Research* 2003;13(7):1572-1579.
 31. Miller SA, Binder EM, Blackman MJ, Carruthers VB, Kim K. A conserved subtilisin-like protein TgSUB1 in microneme organelles of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276(48):45341-45348.
 32. Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(26):17020-17024.
 33. Shanks J, Burtnick MN, Brett PJ, Waag DM, Spurgers KB et al. *Burkholderia mallei* tssM encodes a putative deubiquitinase that is secreted and expressed inside infected RAW 264.7 murine macrophages. *Infect Immun* 2009;77(4):1636-1648.
 34. The analysis of residual DNA in pelA product formulation by means of dot blot hybridization (社内文書)
 35. Characterization of GMM Pectine lynase Toxbatch *** (社内文書)