

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第214回) 議事録

1. 日時 令和3年8月25日(水) 13:58~16:50

2. 場所 食品安全委員会中会議室(赤坂パークビル22階)
(Web会議システムを利用)

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

- ・チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統(食品・飼料)
- ・JPBL008株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ・JPBL009株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ・JPBL010株を利用して生産された α -アミラーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

中島座長、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、樋口専門委員、山川専門委員、吉川専門委員

(食品安全委員会)

川西委員、脇委員

(事務局)

鋤柄事務局長、中事務局次長、石岡評価第二課長、井上評価情報分析官、松原課長補佐、奥藤評価専門官、山口係長、松井技術参与、松田技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統(食品)
- ②チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統(飼料)
- ③JPBL008株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ④JPBL009株を利用して生産された α -アミラーゼ
- ⑤JPBL010株を利用して生産された α -アミラーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 まだ定刻には少々ございますが、出席予定の皆さんはおそろいですので、ただいまから第214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」に基づきまして、非公開で行います。

また「テレビ会議又はWeb会議システムを利用した食品安全委員会等への出席について」に基づきまして、ウェブ会議システムを利用して行います。

本日、所用により、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇、〇〇〇が御欠席です。

事務局から人事の連絡があります。お願いいたします。

〇〇〇 先生方、まずカメラのオンをお願いいたします。

事務局の人事異動がございますので、御報告いたします。

評価情報分析官であった〇〇〇が異動いたしまして、8月1日付で後任として〇〇〇が着任しております。

〇〇〇 8月1日付でございますが、〇〇〇の後任で参りました、〇〇〇と申します。よろしくをお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

本日の議題ですが、新規品目でありますチョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統の食品及び飼料についての評価、JPBL008株、JPBL009株、JPBL010株を利用して生産された α -アミラーゼ、それぞれ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、専門委員名簿、食品健康影響評価に関する資料及び机上配付資料となっております。

また、本日は、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統の申請者であるバイエルクロップサイエンス株式会社の方、JPBL008株を利用して生産された α -アミラーゼ、JPBL009株を利用して生産された α -アミラーゼ、JPBL010株を利用して生産された α -アミラ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。

〇〇〇 「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頂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でした。

以上でございます。

〇〇〇 御提出いただいております確認書につきまして、その後、相違等はございませんでしょうか。

審議に入る前に、ウェブ会議における注意事項がありますので、事務局から説明をお願いいたします。

〇〇〇 本日はウェブ会議形式で行いますので、注意事項をお伝えいたします。

1点目、発言者の音質向上のため、発言しないときはマイクをオフにしてくださいようお願いいたします。

2点目、発言の際はこちらの赤い挙手のカードを提示してください。またはウェブ会議画面の挙手ボタンを押してください。

〇〇〇より呼びかけますので、マイクをオンにして、お名前を御発言いただいた上で御発言をお願いいたします。

〇〇〇より指名がない場合は、直接マイクから呼びかけてください。

発言の最後には「以上です」と御発言いただき、マイクをオフにしてください。

3点目、音声接続不良時、通信環境に問題があるときは、カメラをオフにすることや再入室することにより改善する場合もございます。

マイクが使えない場合は、ウェブ会議システムのメッセージ機能によりお知らせください。

万が一、全く入室ができなくなった場合には、事務局までお電話をお願いいたします。

4点目、議事中、意思確認をお願いすることがございますが、事前にお送りさせていただきました青い同意カードを挙げていただく、もしくは手で丸をつくるなど、意思が伝わるようお願いいたします。

以上がウェブ会議における注意事項となります。どうぞよろしくお願いいたします。

〇〇〇 それでは、新規品目でありますチョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統について、審議を行いたいと思います。

事務局から説明をお願いいたします。

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。

冒頭で御紹介いたしましたが、本日はバイエルクロップサイエンス株式会社の方をお呼びしておりますので、申請書の審議をいただいた後に、申請者に対する質疑応答等があれば、整理していただきたいと思います。その後に説明者にウェブに入室していただき、質疑応答を行います。

質疑応答終了後、説明者には退室していただき、審議を再開していただくこととしております。

それでは、申請者から提出されている申請書を説明させていただきます。

チョウ目害虫抵抗性トウモロコシMON95379系統の要旨の御準備をお願いします。

2ページ目をお願いいたします。本品はデント種のトウモロコシに二つの*cry*遺伝子を導

入した系統でございます。*cry*遺伝子は、どちらもチョウ目に殺虫活性を持つたんぱく質を産生させることで害虫抵抗性を獲得するといったものでございます。

4ページ目をお願いいたします。6、安全性評価において検討が必要とされる相違点についてでございます。

本系統には、従来のトウモロコシには含まれない*cry1B.868*及び改変*cry1Da*遺伝子が導入されており、これらによりたんぱく質が産生されることから、安全性評価が必要な相違点は、導入された遺伝子とそれに関するものと考えております。

5ページ目に参りまして、第2、組換え体の利用目的、方法に関する事項についてでございます。今回産生される2種類のCryたんぱくは、それぞれ既に利用されている殺虫たんぱくとも異なる受容体に作用することから、害虫に対する持続的な抵抗性を付与することが期待されているといったものでございます。

6ページ目に参りまして、第3、宿主についてでございます。宿主のトウモロコシは、先ほど申し上げたとおりデント種でLH244という系統でございます。

7ページに参りまして、6、安全な摂取に関する事項について、デント種は飼料用のほか、コーンスターチの原料、食用油、スナック菓子に加工されて、食品として摂取されるといったものでございます。

10ページに参りまして、第5、挿入DNAの供与体等についてでございます。

1の(1)番、導入する*cry1B.868*及び改変*cry1Da*遺伝子につきまして、こちらはいずれも*Bacillus thuringiensis*に由来するものでございます。

2の(1)は、クローニング合成方法についてでございますが、*cry1B.868*につきましては、*B.thuringiensis*の野生型Cry1Beタンパク質のドメインⅠ及びドメインⅡ、*thuringiensis*の亜種*kurstaki*に由来するCry1Abタンパク質のドメインⅢ、亜種*kurstaki*に由来する*cry1Ab*タンパク質のC末端を組み合わせたものでございます。

11ページの図1のとおり、各ドメインの部分のアミノ酸配列につきましては、元のタンパク質と100%相同性があるといったものでございます。

その下の改変*cry1Da*遺伝子につきましては、*B.thuringiensis*の亜種*aizawai*に由来し、4アミノ酸を追加または改変により、殺虫活性を強化したものでございます。

具体的には14ページの図3を御覧いただければと思います。図3の下線を引いたアミノ酸の部分が改変されたアミノ酸でございます。

15ページ、遺伝子産物の機能でございますが、一部修正がございます。机上配付資料1を御覧ください。

机上配付資料1の1枚目をめくっていただきまして、15ページと書かれているところです。赤で修正されている部分を御覧いただければと思います。

追加した事項として「また、両者はツマジロクサヨトウの防除に既に利用されている殺虫性タンパク質であるCry1F、Cry1A.105、Cry2Ab及びVip3Aタンパク質とも異なる受容体に結合し、独立した作用を示すことが報告されている」ということで、今までの殺虫の

タンパクとも違うところに作用するといったことが追加されております。

17ページに参ります。それぞれのタンパク質の昆虫への感受性についてでございます。**Cry1B.868**につきましては、このとおりチョウ目に特異的であるといったところを確認しております。また18ページ、こちらは改変**Cry1Da**でございますが、同じくチョウ目に特異的であることを確認しております。

21ページに参りまして、5の(2)、目的外のオープンリーディングフレームの有無についてでございます。T-DNA領域のORFにつきましては、後ほど第6の項で説明させていただきます。

24ページに参りまして、ベクタープラスミドの構成でございます。こちらの構成につきましては、表3のとおりとなっております。

24ページの最初と下のほうに*loxP*の配列がございます。その間に*cp4 epsps*がございます。これは除草剤グリホサート耐性を獲得する遺伝子でございます。後ほど説明いたしますが、このプラスミドがちゃんと導入されているかどうかを確認するための選択マーカーとして用いられるといったものでございます。

25ページ、上のほうに*cry1B.868*、下のほうに改変**Cry1Da**の配列がございます。

そのほかの構成要素につきましては、転写等をコントロールするようなものとなっております。

27ページに参りまして、6、導入方法についてでございます。今回の導入方法は、アグロバクテリウム法を用いています。その後、形質転換が行われていないものを除去するため、除草剤グリホサートを使用しております。自殖により、T-DNA領域をホモで有し、外側骨格領域が入っておらず、さらに発育のよいものを選択しております。

それにより選抜されたR₂の世代の個体に対し、Creリコンビナーゼ発現カセットを導入している組換えトウモロコシ系統とかけ合わせ、Cre/*lox*法によって、*loxP*で挟まれたグリホサート耐性遺伝子の配列を脱落させたものをつくっております。

そこから自殖により、Creリコンビナーゼ配列を持たないものを選択、さらに自殖をして、導入領域をホモで有しているものを選別し、F₄世代以降の申請範囲の系列としております。

Creリコンビナーゼを有する系統の作出については、28ページのとおりになっておりますが、Creリコンビナーゼを持つ系統の導入につきましては、机上配付資料1を御覧ください。机上配付資料の最後、ページ番号で94ページの次に1ページと記載されているところからです。その1ページから4ページまでが、Creリコンビナーゼ系統を作出するときのプラスミドの構成要素でございます。

育成図につきましては、30ページの図6を御覧ください。

35ページに参りまして、導入遺伝子の導入箇所及びコピー数、ベクター由来の非意図的な配列の有無等に関する事項でございます。挿入箇所、コピー数等につきましては、NGS解析とPCR解析により、コピー数は1、ベクター以外の配列は含まれていないこと、Cre

リコンビナーゼを導入したプラスミドの配列は存在していないところを確認しています。

41ページに参りまして、導入遺伝子の近傍配列を解析したところ、160bpの欠失が確認されております。

43ページに参りまして、内在する遺伝子への影響について、導入部位近傍の両側それぞれ1,000bpと欠失した160bpについて、EST_2020及びNT_2020に登録されている配列との相同性検索を行ったところ、EST_2020で、45個見つかりましたが、全て挿入部位をまたがっているものはございませんでした。

NT_2020においては、導入部位近傍に位置するものがございました。これについて机上配付資料1で修正がございました。遺伝子予測のための計算解析に基づき自動生成されたアノテーションであったが、この予測は正確でなかったため、削除されているとなっております。このため、近傍に位置していた1つは関係ありませんでした。全部で25個あり、残りの24個は、近傍からちょっと離れているところから、遺伝子の導入がもともとあった遺伝子に影響を与えたといったことは考えられないと考察されています。

45ページ、ORFの有無についてでございます。導入部位の境界領域についてORFを検索したところ、6つ検出をされました。ただし、アレルゲン及び毒性タンパクのデータベースで相同性を確認したところ、相同性を示す配列は検出されなかったというところでございます。

46ページ、導入遺伝子領域におけるORFでございます。29アミノ酸、35%以上のアミノ酸相同性を示す配列及び連続する80アミノ酸で相同性を持つもので検索をしたところ、問題となるORFは見つかっていないところでございます。

47ページの20行目、毒性タンパクについてTOX_2020やPRT_2020を用いて検索したところ、相同性のある配列は検出されましたが、多数のストップコドンで分断されているというところで、生理活性を持つタンパク質の相同性を持つものは認められないということでございます。

48ページに参り、部位や時期による遺伝子産物の発現に関してでございます。49ページの表6及び表7を御覧いただきたいと思います。こちらにあるとおり、それぞれの成長現段階において、発現は確認できます。50ページ、タンパク質の摂取量から見たところ、有意な量を占めるところは考えにくいということでございます。

50ページの4番、遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する事項については、*B.thuringiensis*に対するアレルギー誘発性が確認されていないといったところから、アレルギー誘発性は考えられないということです。

51ページ、人工胃液試験でございます。54ページの図12のとおり、Cry1B.868は0.5分で消化されているところの確認されています。人工腸液については、60ページから62ページでございます。資料の修正があります。机上配付資料1の61ページを御覧ください。それぞれCry1B.868タンパク質、Cry1Daタンパク質の最後のところ、以上の結果から、完全長のタンパク質は、人工腸液によるアルカリ処理及び酵素処理に関する感受性を持つこと

が示されたところにつきましては、耐性を持つことから削除をするという修正がされております。

63ページに参りまして、加熱試験でございます。Cry1B.868につきましては、66ページ、改変Cry1Daは68ページのとおりでございます。どちらも95℃、30分で失活されています。

ここについても、資料の修正がございます。机上配付資料1の64ページを開いてください。28行目のところでございますが、75℃、15分以上で感受性が認められたことから、75℃、15分以上を追記しております。改変Cry1Daタンパク質につきましても同様に、65ページ21行目のところに、75℃、15分を追記しています。

74ページの7、栄養成分や栄養阻害成分などについて、宿主と比較したところがございます。各成分の具体的なところは77ページの表13からでございますが、粗タンパク質など、幾つかの成分において有意差が認められましたが、ILSIのデータベースの範囲内であり、従来のトウモロコシの品種と同等であると考えられると考察されています。

最後、91ページをお願いいたします。諸外国における認可状況でございます。カナダ、米国等で申請が行われており、12行目、2020年の12月、ブラジルで商業利用が認可されている状況でございます。

2021年1月にFSANZについては●●●でございますが、申請者に確認し、2021年4月に申請されたことが確認されておりますので、机上配付資料1の92ページのとおり修正があります。

トウモロコシの食品については、以上でございます。御審議のほどよろしくお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

トウモロコシの殺虫タンパクには、Cry1というのは、基本的にはチョウ目害虫抵抗性ですけれども、最近、耐性の昆虫が出てきたということで、いろいろと工夫をされているようです。少しずつ由来の違うCry1Ab、Cry1Da、これからドメインをつぎはぎしてつくったものが、今回のCry1B.868です。もう一つはCry1Daで、この二つを入れて、耐性昆虫に対して対応しているということです。

新しい殺虫タンパク質をつくっているということで、いろんな昆虫に対しての試験などのデータもそろっております。

こちらで細かいところが何か所か問合せをして、やり取りなどをいたしましたので、説明の中で机上配付資料とあちらこちら行ったり来たりして、聞きづらかったと存じますが、その辺は御勘弁いただければと思います。

そういうことで、先生方から御質問をいただきたいと思います。よくあるパターンの申請ですし、何ページと言わずに、どこでもお気づきのところを挙手なさって、御質問いただければと思います。よろしくお願いいたします。

この株では、途中で組換え体の選抜のところでCP4 EPSPS、グリホサート耐性ですが、これで選んでおりますけれども、Cre/lox法で後に除去しております。この方法については、

以前も審議しておりまして、こういう方法で除去するという例はございました。

それについて、あまり詳しく書いていないようで、読み取ることを苦勞された先生などがいらっしゃるかもしれませんが、事務局は、この辺を少々気にした方もいたようすけれども、いかがでしょうか。書きぶりの問題だろうと思うのですけれども、〇〇〇辺り、その辺の記述で気になったところなどはございますでしょうか。

〇〇〇 やったことがあるような技術だから、あまり気にしなかったのですけれども、一般の人はどうかという考えですが、これで分かると思ったのですが、どうでしょうか。

〇〇〇 時間をかけて読めば分かるという気もするのですけれども、〇〇〇、この辺の記述で気になったところなどはございますでしょうか。

〇〇〇 これでいいと思うのですけれども、より易しくと言われたら、そうかもしれないのですが、私はそこまで求めるのは酷だと思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 もよろしいですか。

〇〇〇 私は事前に事務局をお願いしまして、ちょっとした文章の修正と後ろの机上配付資料にある途中のCreリコンビナーゼを発現しているトウモロコシの導入遺伝子の素性を添付資料という形でつけていただいていますので、資料としてはこれでよろしいのではないかと考えております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

私も添付資料がなかったら、分かりづらいとか言おうと思ったのですけれども、これで大分補完されているように思いますので、この辺はよろしいですね。

もう一つ、人工胃液、人工腸液の試験です。人工腸液の試験については、さらに連続に行っておりまして、いずれもそれなりに分解するのだけれども、多少のフラグメントが残るとか、こういったデータが来ております。

Cryタンパク質は、特に人工腸液では分解しづらいのは以前から知られていることではあるのですが、この辺のデータと書きぶり等については、いかがでしょうか。こういうものは、最初にいつも〇〇〇にお聞きするのですけれども、よろしいですか。

〇〇〇 特にこの書きぶりで問題ないと思います。どうしてもCryタンパク質は、人工腸液では分解時間が少し長くなってしまうのですけれども、その部分は特に問題はないと思います。

人工胃液で分子量3,000程度の断片が残るということで、その断片に関して、人工胃液の試験をした後、人工腸液の試験をして、そこで残らないことを示していますので、その部分に関してもは、特に問題がないと思いました。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この辺はどう御覧になっておられますか。

〇〇〇 人工胃液、人工腸液の連続のものも行って、腸分解は確認されていますし、私もこちらで問題はないと感じております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

こちらの申請書は大部ですけれども、割とよくできていて、ところどころ読みづらいところはあったのですが、いいのかという感じだったのです。先生方、細かい点でも結構ですので、申請者をお呼びしていますので、細かい点などがあつたら、その場で答えをいただけることもあろうかと存じますが、ぜひお願いします。

どうぞ。

〇〇〇 68ページの加熱のところなのですけれども、加熱試験をして、レーン6の75℃の加熱、レーン7が95℃なのですけれども、95℃の加熱で元のタンパク質(120kDa)のバンドがほとんど見られなくなっているということなのですが、レーン6や7で元のタンパク質の分子量より大きいところのバンドが濃くなっているように見受けられます。レーン6や7の条件で、凝集体ができているかどうか。特に凝集体ができて遠心するようなことがなかったかどうか、そのことだけお聞きしたいと思いました。

〇〇〇 レーン6の分子量の高いBandがここだけ少々濃くなっているということで、彼らの見解をお聞きしたいということですのでよろしいでしょうか。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 ありがとうございます。後ほどよろしくお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 すごく細かい点なのですけれども、36ページの真ん中辺りに、次世代シーケンスをしたときに、細菌に由来すると考えられる配列が一致したということなのですけれども、リード数を見る限り非常に少ないので、本当に混入したのだらうということはほぼ分かるのですけれども、混入したであろう配列をきちんと見ることによって、細菌由来の配列と今回のトウモロコシのゲノムが実はつながった形でシーケンスされてくるようなことがあったりすると、その配列が挿入されていることになるので、そういったところまできちんと見ているのかということを聞いてみたいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

これは先生から申請者に直接お尋ねいただくということですのでよろしいですか。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 後ほどよろしくお願いいたします。

ほかにございますでしょうか。

それでは、申請者をお呼びしてよろしいでしょうか。

その場で思いつかれた質問がございましたら、忌憚のないところを申請者にぶつけていただければと思います。

それでは、申請者をお呼びしてください。

準備ができるまで、少しだけ休憩にいたします。

(申請者入室)

〇〇〇 本日は、お忙しいところ、待機いただきまして、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。

〇〇〇 ありがとうございます。

バイエルクロップサイエンスの〇〇〇と申します。本日はどうぞよろしくお願いいたします。

〇〇〇 同じくバイエルクロップサイエンスの〇〇〇と申します。本日はよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 同じくバイエルクロップサイエンスの〇〇〇と申します。本日はよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 今回の御申請で、チョウ目害虫抵抗性のCry1タンパク質、由来の違うものを要するに三つづぎはぎしてつくったもので、Cry1B.868とCry1Daの組合せですが、耐性昆虫に対する対応ということで、安全性には直接関係あることではなくて、それなりの効果は認められておるのでしょうか、

〇〇〇 おっしゃるとおりでございまして、南米でツマジロクサヨトウに対する抵抗性が非常に問題になっておりまして、それに対して、現在、商業栽培がされている幾つかの商品に抵抗性が確認されております。

そのような抵抗性を昆虫に対しても活性を持ち、なおかつ2種類のCryタンパク質を入れることで、抵抗性の発達を遅らせて、商品効果の持続性を狙っております。

まだ上市はされておられませんので、商品の効果は社内で実際にあることは確認しております。

〇〇〇 これは特定の受容体に結合することで、毒性を発揮するということだったと思いますが、資料の何ページに書いてあったのか、分からなくなってしまったのですが、15ページ、16ページには、この機能について書いてありますが、今回作製された融合タンパク質は、従来と異なる受容体に結合するとか、そんな記述もあったような気がするのですが、その辺のところはいかがなのでしょうか。

〇〇〇 おっしゃるとおりでございまして、実際に2種類のCryタンパク質につきましては、2019年か2020年に発表させていただいておりまして、その中でこれまでのCryタンパク質、同じくツマジロクサヨトウに活性を持っていたCryタンパク質とは異なる受容体に発現することを実験的に証明しておりまして、実際、その受容体がツマジロクサヨトウに発現していることも、実験的に論文の中で確かめております。

〇〇〇 異なる受容体に結合することであっても、それでも対象となる害虫のスペクトルについては、チョウ目に限定ということも確認済みで、データを見させていただいているのですけれども、よかったと思います。

〇〇〇 そのとおりでございまして。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇に68ページの人工腸液加熱試験のところで質問がございました。

〇〇〇からお願いいたします。

〇〇〇 66ページの図20になるのですけれども、Bの75℃で120 kDaのタンパク質が薄くなって、90℃でそれがさらに薄くなっているのです。75℃から行きますと、凝集体というのですが、68ページがよりバンドがクリアだと思うのですけれども、120 kDaよりも少し分子量が大きいところにも見えるようなのですが、熱をかけることによって凝集体ができてきて、120 kDaのタンパクのところは薄くなったとか、そのような可能性は特にはございませんでしょうか。気になるほどの凝集体ができるということではないということでしょうか。

〇〇〇 そのような話については、社内では聞いておりません。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 これもより高温にすると、分解されていることで、安全性に直接結びつくとは考えておられないのですが、こういうパターンは、一時的に凝集体ができるような場合によくあるパターンだと思うのですけれども、そのような解釈で特に矛盾はないとお考えですか。

〇〇〇 特に一般的なタンパク質の挙動と変わることはないと考えております。

〇〇〇 ありがとうございます。

36ページ、次世代シーケンサーによる解析の結果についてなのですが、ここに質問がございました。

これは〇〇〇から直接お願いできますか。

〇〇〇 了解です。

36ページの中ほどなののですけれども、環境中の細菌に由来すると考えられる配列が一つ一致したということなのですが、その図が39ページの図9のところにマッピングをしたものが書いてありますが、これはpBR322のところにあるものは、リード数が非常に少ないということですか。

〇〇〇 そのとおりでございます。

〇〇〇 そう考えると、これは混入したものなのだということがほぼ分かるのですけれども、実際にこういった組換えをする際に、組換え部位のところに環境中の細菌のゲノムが入ることもまれにありますので、実際に次からこういった事例があった場合に、シーケンスが細菌によるものとトウモロコシのところとつながっていないかどうかとか、そういったところを細かく見てもらえると、遺伝子水平伝播みたいな事象も捉えられるので、今後このように解析をしていただけたらと思いますという意見です。

〇〇〇 ありがとうございます。承知いたしました。

なお、今回の製品においても、導入部位の塩基配列は、NGS以外にPCR等々で確認しておりまして、そのような混入はないことを確認させていただいております。

〇〇〇 ありがとうございます。

私からは以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

つまりは染色体にどこかで組み込まれてしまったわけではなくて、たまたまシークエンシングするときに何らかの昆虫のサンプルが入ったと考えて、このデータからの頻度から考えても、それで矛盾がないと考えるのですが、そういうことでよろしいですか。

〇〇〇 そのとおりでございます。

〇〇〇 これもお聞きしたいところなのですが、Cryタンパク質は、使えるものの種類が限られているので、耐性昆虫が出るとやっかいだからということで、いろいろと栽培方法についての指導なども苦勞されていることとも聞いているのですが、それでも耐性昆虫は、実際のところ、結構深刻な状況にあるのでしょうか。それとも、南米の場合のように、今のところ何とかコントロールは効いているのでしょうか。差し支えがない範囲で教えていただけるとありがたいのです。

〇〇〇 ツマジロクサヨトウに関して言えば、現地の農家さんは非常に困っている状況にあるということは伺っておりまして、なので、新しい商品は常に希求しているようなことを伺っております。

我々としても、●●●こともしているのですけれども、それでも特定の昆虫を殺すようなことを繰り返していくと、どうしても抵抗性の獲得がGMに限らず、殺虫剤の使用においても同じなのですから、避けられないものですので、その辺りは実際の現場の農家さんとも協力しながら、行政とも協力しながら、抵抗性の対策を取っていくことが大事であると弊社としては考えております。

〇〇〇 ありがとうございます。

もともとアワノメイガか何かに対応するために開発されたもので、アワノメイガは、現在でもそれなりに脅威になっていて、たまにはこの耐性も出たりするのでしょうか。

〇〇〇 申し訳ありません。アワノメイガまでは把握しておりません。

〇〇〇 お気になさらないでください。ありがとうございました。

先生方、せっかく専門家が来ておられるようなので、お聞きしたいことなどございますか。〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 今日の評価とは別にお尋ねしたいことがあります。これはトウモロコシのデント種ということなので、恐らくは飼料として使ったり、コーンスターチの原料になると思うのですけれども、今回の人工胃液、人工腸液、温度耐性の結果を見ると、人工腸液、人工胃液は置いておいて、加熱で大体75℃以上になると、まず分解されているだろうということになります。

デント種の使用目的から考えて、75℃以上だと、原料として使うという目的で使ったときだと、今回、安全性の試験で対象としたようなものは、大体発現タンパク質は分解していると考えていいような条件なのかということをお聞きしたいのですが、いかがでしょう

か。

〇〇〇 実際に何℃でどの程度の時間が加工されているか、私のほうではそこまで詳しく把握していないので、社内からフォローできたら、お願いできればと思っているのですが、基本的にもそもそも発現しているタンパク量自体は非常に僅かでして、また、そのほかのウェートオブエビデンス等々を考慮いたしましても、75℃の温度でこのように失活するのならば、我々として安全性に問題はないと考えております。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 1点加えさせていただきますと、以前、1990年代とか、2000年初頭の頃は、実際の加工工程である温度を参考にして実験を組ませていただいていたところなのですが、最近は、今回の試験のように幅広く温度を振りまして、それで一般的な熱に対する耐性等を調べております。

今回は大体75℃にかけて分解をしていくことが確認されておりますので、いわゆる沸騰の温度になったとしても、基本的には容易に分解されるだろうということで、先ほど御指摘されたような形で、我々もそのように考えております。

〇〇〇 先生方、ほかにございますか。よろしいでしょうか。

本日はお疲れさまでした。ありがとうございました。これで終わります。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、再開いたします。

ただいまの質疑を通して、新たな疑問等はございますでしょうか。

諸外国としては、アメリカなどではまだのようなのですが、今回、申請書も問題はなく、しかも、事前のやり取り等もございまして、私としては、疑問点はおおむね解消されているのではないかと思ったのですが、先生方、何かございますでしょうか。

それでは、安全性については、問題ないと判定したいと思いますが、先生方、よろしいでしょうか。意思表示をお願いいたします。

ありがとうございます。皆さんに同意いただけましたので、安全性については問題ないと判定したいと思います。

それでは、評価書案の説明をよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 それでは、評価書案の説明をいたします。

資料の2ページ目からが本品目の評価書案でございます。

7ページをお開き願います。Ⅰ．評価対象食品の概要につきましては、この記載のとおりとさせていただきますと思います。

Ⅱ．食品健康影響評価の第1、宿主及び導入DNAに関する事項についてです。

宿主の種及び由来につきましては、記載のとおり、デント種のLH244でございます。

(2) のDNA供与体の種名及び由来、(3) の挿入DNAの性質及び導入方法も記載のとおりでございます。

2、宿主の食経験に関する事項から、次のページに参りまして、4、5までにつきましても、記載のとおりとさせていただきたいと思います。

6、安全性評価において検討が必要とされる相違点についても、記載のとおりです。

第2、組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項は、Cry1B.868タンパク及び改変Cry1Daタンパク質は、ツマジロクサヨトウやアメリカタバコガ等のチョウ目害虫に対する抵抗性を付与する。また、これらは異なる受容体に結合することから、既に商業利用されている害虫抵抗性トウモロコシに対して抵抗性を有するチョウ目害虫に対する抵抗性もトウモロコシMON95379に付与するをしたいと思っております。

第3の宿主に関する事項でございます。

1の分類上の位置づけ等から7まで、記載のとおりとさせていただきたいと思います。

169行目、第4、ベクターに関する事項でございます。

2、性質に関する事項でございますが、(1) DNAの塩基数及び塩基配列を示す事項と(2) については、明らかになっている、(3) については、既知の有害塩基配列を含まれていないということです。

(4) については、スペクチノマイシン及びストレプトマイシンに対して耐性を付与する*aadA*遺伝子が含まれている、(5) の伝達性に関する事項も、伝達を可能とする塩基配列は含まれていません。

197行目に行きまして、第5、挿入DNA、遺伝子産物並びにベクターの構築に関する事項につきまして、1、2については記載のとおりです。

2. 挿入DNAまたは遺伝子及びその遺伝産物の性質に関する事項につきまして、(1) クローニング及び合成方法に関する事項につきましては、こちらもそのとおりとなっております。

(2) (3) についても、記載のとおりというところですが、(3) の236行目のところでございます。「(参照3) 。」となっておりますが、その文末の後に、ちょうど机上配付資料で修正がありますといった部分を付け足したいと思っております。236行目の文末以降につきまして、両タンパクは、Cry1F、Cry1A105、Cry1Ab及びVIPタンパク質とは異なる受容体に結合し、独立した作用を示すことが報告されているといった文言を追加するところでございます。

245行目の(4) からは、記載のとおりとしたいと思います。

12ページ目に参りまして、3. 挿入遺伝子及び薬剤耐性遺伝子の発現に関わる領域に関する事項でございますが、(1) ～ (3) は記載のとおりです。

4. ベクターの導入DNAの組み込み方法に関する事項につきましても、記載のとおりでございます。

5. 構築された発現ベクターに関する事項につきまして、(1) の切断地図は明らかにな

っています。(2)につきましては、第6-1-(2)の記載のとおりとしております。

13ページに参りまして、宿主に対して用いる導入方法により、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであるということで、こちらにつきましては、導入のプラスミドに意図する挿入領域は、T-DNA領域の右側境界領域から左側境界領域までです。

なお、T-DNA領域中の*cp4 epsps*遺伝子(選抜マーカー)発現カセット及び*loxP*配列の一つは、組換え体作出の過程で除去されたいと思っております。

(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については、確認しております。トウモロコシMON95379への挿入DNAにつきましては、表1のとおりとしたいと思います。

14ページに参りまして、6. DNA宿主の導入方法及び交配に関する事項で、最初に先生方にお配りしたところから修正をさせていただいております。311行目のところでございますが「*loxP*配列の1つが除去されるのは、自殖によりCreリコンビナーゼ発現カセットをもたない個体を選抜して」という文言を追加しております。

第6、組換え体に関する事項の1、遺伝子導入に関する事項の(2)コピー数及び挿入近傍配列に関する事項でございます。このところは記載のとおりでございますが、322行目のところでございます。得られたリードの全てを導入用プラスミドと照合した結果、トウモロコシは、T-DNA領域の5'及び3'末端配列を含む二つの接合領域が特定され、T-DNA領域が1箇所1コピー挿入されていることが確認されたいと思っております。

15ページ目に参りまして、343行目の「また」のところからでございます。また、トウモロコシMON95379のゲノムにDNAを挿入することにより、宿主の内在性遺伝子が損なわれていないことを確認するために、5'末端近傍配列、欠失した160bp及び3'末端近傍配列の計2,160bpについて、ESTデータベースを用いて検索をした結果、相同性を有する配列が認められたということで、353行目の導入のところですが「導入遺伝子挿入部位においてトウモロコシ内在性の既知の遺伝子は破壊されているとは考えられなかった」としております。

16ページ、(2)オープンリーディングフレームの転写及び発現の可能性に関する事項についてといったところでございます。こちら記載のとおりでございます。「いずれもタンパク質として翻訳され、アレルゲン性及び毒性を有する可能性は低いと考えられた」ということです。

2. 遺伝子産物の組換え体における発現部位、発現時期及び発現量に関する事項につきましては、記載のとおりとしたいと思います。

17ページに参りまして、3、4の(1)及び(2)についても、記載のとおりです。

(3) 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する事項について、人工胃液に対する感受性は、0.5分以内に消化されたことになります。

18ページに参りまして、②人工腸液に関する事項の443行目、完全長のCry1B.868タンパク質は、試験開始後5分以内に消化されるが、約60kDaのフラグメントが試験開始5分後

から24時間後にわたり認められたとしたいと思います。b、改変Cry1Daタンパク質も同様としたいと思っております。

③加熱処理に関する感受性につきましては、記載のとおりとしたいと思います。

19ページに参りまして、475行目の(4)の遺伝子産物と既知のアレルゲンの相同性に関する事項については、アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列が認められたとしたいと思っております。

487行目に参りまして、5. 組換え体に導入された遺伝子の安定性に関する事項は、記載のとおりになります。

6. 遺伝子産物の代謝経路への影響に関する事項も、記載のとおりとしたいと思います。

20ページ目に参りまして、7. 宿主との差異に関する事項ということです。

(1) につきましては、515行目でございますが、統計学的有意差が認められたが、これらの平均値はILSIデータベースの範囲内であった。その他の項目に統計学的有意差は認められなかったとしたいと思います。

(2) (3) についても、記載のとおりになります。

529行目、諸外国における認可、食用等に関する事項でございます。こちらも記載のとおりでございます。

540行目、豪州及びニュージーランドのところでございますが、2021年1月にオーストラリア・ニュージーランド食品基準機関に対して行われたとなっておりますが、先ほどの配付資料のとおり、ここは「1月」ではなく「4月」の間違いでございましたので「2021年4月」と修正させていただきたいと思っております。

21ページの9. からⅢ. 食品健康影響評価につきましては記載のとおりで、最後はヒトの健康を損なうおそれはないと考えられるとしたいと思っております。

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、評価書案について、御意見、コメント等を承りたいと思います。

細かい字句等の修正でしたら、後ほど事務局にお伝えいただければと思います。

そのほかにございましたら、よろしくお願いいたします。〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 今までのものでも同じようなところはあったのかと思うのですが、もし御存じだったら、教えていただきたいのですけれども、もともと申請者の資料にもそういうことが書いてあったので、それをそのまま書いてあると思うのですが、17ページの395行目からの遺伝子産物が一日タンパク摂取量の有意な量を占めるかということで、401行目の4.8×10のマイナス7乗という数字があって、したがって、一日タンパク摂取量の有意な量を占めることはないかと判断されると書いてあります。

一般にこの数値は、多めに見積もってこれだけという数字だから、非常に少ない量であることはよく分かります。それに文句をつけるわけではないのだけれども、こういう数字というのは、遺伝子組換え食品のときでもいいのですが、一般に考えられているのですか。

化学物質の毒性などの場合は、いろんなケースで目安となる数字が計算されているのだけれども、遺伝子組換え食品の遺伝子産物の場合にはこのくらいの量だったらという目安みたいなものは一般に考えられているのですか。それとも、ここは幾ら何でもこのくらいの量だから大丈夫だというロジックなのでしょうか。もし御存じの先生がいたら、参考までに教えていただきたいと思うのですけれども、なければいいです。

〇〇〇 私はこの辺はあまり詳しくないのですが、〇〇〇辺り、そういう慣例なり何なり、御存じなことはございますか。

〇〇〇 〇〇〇です。

有意な量を占めるか否かということについては、見るようにということにはなっていないけれども、ここのところに数値的な指標があることについては、承知しておりません。

〇〇〇 そうなのかと思うのですけれども、どなたかいらっしゃいますか。

数値的な基準みたいなものは、私も特になかったように思うのですけれども、それではよろしいですか。そういうことみたいです。

〇〇〇 分かりました。そういうことだということを承知して、聞かれているときには答えます。

〇〇〇 よろしく願いいたします。

4.8×10のマイナス7乗は、その後に単位はなくていいのですね。

〇〇〇 多分数値的には相当少ないと思います。しかも、多めに見積もっていますから、これは分かるのですけれども、これからのために聞いたまでです。ありがとうございます。

〇〇〇 ほかにございますでしょうか。

評価書案についても、これでオーケーということではよろしいでしょうか。ありがとうございます。

飼料の申請も上がっておりまして、人間が食べてオーケーしておいて、飼料としては駄目ということも考えづらいのですが、審査を別々にやることになっておりますので、事務局から説明を簡略にお願いします。

〇〇〇 それでは、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシに関する遺伝子組換え飼料についての要旨の資料の御準備をお願いいたします。

本系統の特徴は、食品と同じでございます。

使用方法是基本的に従来のトウモロコシと同じです。24行目に、トウモロコシの飼料としての利用は、子実の直接利用、サイレージ、青刈りとしての直接利用、ウェットミリング、ドライミリング及びアルコール発酵の際の副産物の利用であり、子実を配合飼料原料として使用することが最も多いものとなっております。

2ページ目に参りまして、2、チョウ目害虫抵抗性トウモロコシの系統に関する組換え飼料としての安全性でございますが、遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方の3によるということで、①～③にあるかどうかを考慮して判断しております。

その結果、24行目に参りまして、本系統につきましては、Cry1B.868タンパク質及び改

変Cry1Daタンパク質の発現により、チョウ目害虫に対する抵抗性が付与されている。このため、本系統は害虫抵抗性を付与させたものに分類され、一般的に挿入された遺伝子、もしくは当該遺伝子によって産生されるタンパク質が肉、乳、卵等の畜産物中に移行するということは報告されていない。

したがって、上記の①のみならず、②③の可能性も考えにくく、飼料を摂取した家畜に由来する畜産物には、通常、安全性上、新たな問題は生じないと考えられるといったことで、これらの飼料を摂取した家畜に由来する畜産物を摂取することに、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性はないと考えられるとしてございます。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

本申請につきまして、御意見、御質問等はございますでしょうか。

Cryタンパク質については、これまでも何度も審議されておりました、食品としてオーケーなものが家畜を通して増殖されて、悪いことが起こることは認められないことになっておりますので、今回のものもオーケーにしたいと思うのですが、よろしいでしょうか。御意思の表示をお願いいたします。

皆さんに同意いただけましたので、飼料としても安全性に問題はないと判定したいと思います。

評価書案の審議に入ります。

事務局から簡略をお願いいたします。

〇〇〇 評価書案につきましては、資料の25ページの②からになります。本文につきましては、28ページからでございます。

説明させていただきます。

I. 評価対象飼料の概要については、記載のとおりでございます。

II. 食品健康影響評価につきまして、1につきましては記載のとおり、2も記載のとおりで、1、2を考慮したところ、トウモロコシMON95379に新たな有害物質が生成されることはないため、肉、乳、卵等の畜産物中に新たな有害物質が移行することは考えられない。遺伝子組換えに起因する成分が畜産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性や家畜の代謝系に作用し、新たな有害物質が生成される可能性は考えられない。

以上のことから、改めて遺伝子組換え食品の安全性評価を行う必要はなく、当該飼料を摂取した家畜に由来する畜産物について、安全性の問題はないとしたいと思います。

以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございます。

ただいまの評価書案につきまして、御意見、御指摘等はございまでしょうか。

細かい字句等は、お気づきでしたら、後ほど事務局に御連絡いただければと思います。

ただいまの評価書案につきまして、オーケーでよろしいですね。ありがとうございます。

それでは、次に進みたいと思います。

新規品目でありますJPBL008株を利用して生産された α -アミラーゼについて、審議を行いたいと思います。

事務局から御提案がありますね。お願いします。

〇〇〇 申請書の説明に入ります前に、本日の審議の進め方について、御提案させていただきます。

本日御審議いただく3つのアミラーゼにつきましては、宿主組み込み方法等が同じでございます。そのため、並行して審議を行うことで違いが分かりやすく、審査のポイントが明確になると思いますので、この3件の申請書について続けて説明し、御審議いただいております。

〇〇〇 事務局から審議の進め方について御提案がありました。

申請書をお目通しいただければお気づきと思いますが、今回の008株、009株、010株につきましては、宿主は同じ、ベクターも同じ、組み込み方法も同じ、供与体のDNAも同じ、何と遺伝子も同じです。どこが違うのかというと、元の遺伝子について、アミノ酸を●●●変えたものと●●●変えたもの、そこが違うだけということで、まとめて審議するということはもっともだと思いますので、反対される方はいないと思うのですが、よろしいですか。

それでは、よろしくお願いいたします。

〇〇〇 承知いたしました。

なお、冒頭で御紹介いたしましたが、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、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。その後に説明者にウェブ上入室していただき、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考えております。

それでは、申請書の説明に入ります前に、机上配付資料2を御覧ください。

机上配付資料2の1ページ目ですが、今回、各品目の類似点、共通点が多かったために、一覧表にして整理していただきました。それが机上配付資料2の1ページ目の資料になります。

新規の申請品目といたしまして、左側から009株、008株となっております、有効成分はそれぞれNA62-7、NM447、TS-25となっております。

アミノ酸の改変箇所と置換したアミノ酸についても、ここに記載されております。

至適温度とか、至適pHもここに記載のとおりです。

供与体や宿主は全て共通しております。

下ですが、従来製品について記載しております。

それぞれの有効成分は、今回の申請品目と同じでございまして、こちらに官報掲載日がありますが、それぞれ全て安全性審査を経たものでございまして、販売実績がそれぞれあ

るものでございます。評価した当時は*Bacillus subtilis*に入れておりましたが、今回は宿主を*B.licheniformis*と変えてきたところが、前回審議した際との大きな違いになると思います。

それでは、灰色のファイル、JPBL008株の α -アミラーゼの申請資料を御用意ください。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 α -アミラーゼ(TS-25)。反応特異性は、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-D-グルコシド結合をエンド型で加水分解するものでございます。

製造方法ですが、生産菌株の培養液から抽出、除菌、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、 α -アミラーゼは代表的な製パン用酵素の一つであり、パンの品質を向上させるための改良剤として用いられております。

TS-25は、製パンの工程において加工助剤として老化防止の目的で使用され、パン生地をTS-25で処理することによって、パンの老化を起りにくくすることが可能となります。

なお、TS-25は焼成の最終段階で高温により失活いたします。

次のページへ行きまして、第1-2をお願いいたします。

(1) 宿主でございますが、*B. licheniformis* Ca63株でございます。

(2) 挿入DNAの供与体ですが、こちらは4ページの表1を御覧ください。

*amyM*遺伝子でございますが、こちらは*Geobacillus stearothermophilus* C599株。

*prsA*遺伝子は、*B. licheniformis* Ca63株由来でございます。

そのほかに、プロモーター、ターミネーター、転写調節配列等についても併せて記載しております。

次のページをお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質でございますが、こちらは図1に示しておりますとおり、●●●の遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入し、そのうち●●●の遺伝子座に対しては、マーカー遺伝子を欠失導入用ベクターを用いて除去、●●●の遺伝子座に対して*amyM*遺伝子発現カセットを挿入。●●●の遺伝子に対して、*prsA*遺伝子発現カセットを挿入しております。

続きまして、11ページをお願いいたします。第1-3、第1-4については、記載のとおりでございます。

第1-5、遺伝子組換え添加物の性質についてでございます。

(1) 有効成分は、 α -アミラーゼ(TS-25)。

反応特異性はこちらに記載のとおりでございます。

(2) 製造方法の概略ですが、こちらは次のページの図4に示したとおりでございます。

(3) 用途については、既存のものと変わりはありません。

(4) 有効成分の比較ですが、TS-25は既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた α -アミラーゼ(2001年3月30日官報掲載)でございます。

次のページをお願いいたします。第1-6-(1)でございます。本遺伝子組換え添加物と従

来の添加物の有効成分の相違点は、生産菌が異なることのみでございます。

(2) 組換え体と宿主の相違点ですが、JPBL008株では、*amyM*遺伝子が●●●、*prsA*遺伝子が●●●となっております。

続きまして、第2、第3については、記載のとおりでございます。

続きまして、17ページ、第4の項目をお願いいたします。

1・(2) 安全性に関する事項でございます。*G. stearothermophilus* C599株でございます。*G. stearothermophilus*は、以前、*B. stearothermophilus*と呼ばれたグラム陽性の芽胞形成する桿菌で、温泉や土壌、食品工場など、様々な環境に分布しております。*G. stearothermophilus*のヒトに対する病原性や毒素産生は知られておらず、EFSAが提供する安全性適格推定、QPSステータスに認定されており、安全性に懸念がないとされています。

B. licheniformis Ca63株については、記載のとおりでございます。

また、そのほかの供与体についても、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4-2・(1) としまして、挿入遺伝子のクローニング、合成方法に関する事項です。

*amyM*遺伝子では、初めに*amyM*遺伝子をPCRで増幅することにより取得しております。さらにCa63株由来の α -アミラーゼ遺伝子及び*B. amyloliquefaciens* DSM7株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列を組み合わせた配列が分泌シグナル配列として付加されております。

(2) は記載のとおりです。

続いて(3) 挿入遺伝子の機能です。

*amyM*遺伝子は α -アミラーゼ活性を有するTS-25をコードし、アミロースやアミロペクチン及び同様の結合を持つグルコース重合体の α -1,4結合の分解を触媒し、デキストリンやオリゴ糖を生成させる酵素でございます。

アミノ酸配列から推定される分子量は、●●●でございますが、SDS-PAGE分離に引き続くCBB染色による分析では、●●●で検出されております。

ここで、机上配付資料2の3ページを御覧ください。事前に問い合わせた質問の2ポツ目になるのですが、先ほどの株にも共通することなのですが、アミノ酸配列から推定される分子量よりも分析のほうの分子量が小さいのはなぜかということで、セカンドプロセッシング等が起きているのではないか、そのようなことを問い合わせたところ、回答がありました。

全部は長いので、読み上げるのは割愛いたしますが、回答の中ほどに、社内の研究データ等を調べたところ、発現しているタンパク質にはセカンドプロセッシング等が起きていることを示唆するデータはなく、全長に近いアミノ酸配列で発現しているものと考えられていますと記載がされております。

申請資料の本文に戻りまして、20ページをお願いいたします。上のTS-25の安全性です

が、アレルギー誘発性及び毒性について示唆する報告はなく、TS-25を有効成分とする α -アミラーゼは、食品用酵素として20年ほど前から安全に使用されてきた旨の記載がございます。

*prsA*遺伝子については、記載のとおりでございます。

続きまして、第4-3、第4-4、第4-5-（1）までは記載のとおりでございます。

少し飛びまして、26ページをお願いいたします。第4-5-（2）です。最終的に構築されました2つの発現ベクターは、*amyM*遺伝子発現カセットを●●●の遺伝子座に、*prsA*遺伝子発現カセットを●●●の遺伝子座に挿入するための遺伝子導入用ベクターでございます。それぞれpJPV040、pJPV035と記載されております。相同組換えによる宿主に導入される領域はそれぞれ明らかでございまして、これらの遺伝子座のシーケンス解析により確認されております。したがって、遺伝子導入用ベクターの全配列を対象としたORFの解析は行っておりません。宿主ゲノムとの境界部位を含む遺伝子導入座位のORF解析については、後ほど第5で御説明いたします。

（3）（4）は記載のとおりです。

続いて、第4-6、DNAの宿主への導入方法でございます。初めに●●●の遺伝子座にマーカー遺伝子発現カセットを挿入。そのうち、●●●の遺伝子発現座のマーカー遺伝子を除去するために、欠失導入用ベクターを用いて除去しております。さらにTS-25の産生量を促進するために、*prsA*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターを菌体内に導入して、最後に*amyM*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターを菌体内に導入しております。

なお、異種遺伝子が●●●の遺伝子座に残存するため、これらについても同様に安全性の確認を行っております。

続きまして、30ページ、第4-7をお願いいたします。遺伝子導入用ベクターpJPV040及びpJPV035はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、ループアウトで脱落するため、宿主の染色体には導入されません。また、●●●遺伝子座に導入されたマーカー遺伝子発現カセットは、ネオマイシン耐性遺伝子が存在しますが、欠失導入用ベクターが挿入された後のループアウトによって脱落いたします。したがって、JPBL008株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在せず、シーケンス解析により確認がされております。

続いて、第5でございます。

第5-2-（1）でございますが、シーケンス解析について記載されております。挿入領域の塩基配列はシーケンス解析により確かめられ、その結果、●●●遺伝子座に*amyM*遺伝子発現カセットが●●●挿入、●●●遺伝子座に*prsA*遺伝子発現カセットが●●●挿入されていることが示されました。また、●●●遺伝子座のマーカー遺伝子が削除されていることが示されております。さらにこれらの挿入領域には抗生物質耐性遺伝子が存在しないことも明らかになっております。

続きまして、35ページ、第5-2-（2）をお願いいたします。ORFの有無についてでござい

すが、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、五つの遺伝子座でそれぞれORFが記載のとおり検出されております。

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、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。

36ページをお願いします。既知のアレルゲンとの相同性検索です。

①の条件で検索を行いました結果、挿入DNAと宿主ゲノムの接合部位をまたいで新たに生じるORFの中で、既知のアレルゲンと一致するORFは検出されませんでした。

TS-25及びPrsAをコードするORFと部分的に相同性を示すアレルゲンが検出されましたが、これらのタンパク質は既に食品添加物として販売・使用されている製品に含まれており、これらのタンパク質のアレルギー誘発性は報告されております。

②の条件でヒットするものはございませんでした。

次のページをお願いいたします。検出されたORFと既知の毒性タンパク質との相同性検索でございますが、E-Value0.02未満を指標にして検索を行いました結果、各遺伝子座においてヒットしたものを示しております。

なお、TS-25及びPrsAをコードするORFと部分的に相同性を示す毒性タンパク質が検出されましたが、これらのタンパク質は既に食品添加物として販売・使用されている製品に含まれており、これらのタンパク質の毒性は報告されております。

以上の結論は、40行目以降に書いてあるとおりでございます。

続きまして、第6、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、長い間、全て安全に使用されてきた実績がある旨が記載されております。

続きまして、第7です。

第7-1、諸外国における認可の状況でございますが、TS-25製品は、日本を含む世界各国で20年以上にわたって販売されております。JPBL008株を利用して生産されたTS-25においては、デンマーク、フランスで承認されております。

続いて、第7-2でございますが、PCR解析によりまして、TS-25の製品には生産菌株由来のDNAが残存していないことが確認されております。

第7-3、非有効成分ですが、製品バッチの分析値と我が国の食品、添加物等の規格基準に定める規格値を記載しております。

続いて、第7-4でございます。精製方法及びその効果に関する事項ですが、6行目に社内文書3にタンパク質の純度が高いことが確認されているとありますが、具体的な数値が書かれております。社内文書3では、●●●という結果になっておりました。

第7-5については、記載のとおりでございます。

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。

JPBL008株の説明は以上でございます。

それでは、続きまして、JPBL009株について説明いたします。

重複する部分もございますので、適宜割愛しながら説明させていただきます。

JPBL009株の申請資料の11ページをお願いいたします。第1-5-（1）ですが、名称及び有効成分は α -アミラーゼ（NA62-7）でございます。

反応特異性は先ほどのものと同様です。

12ページ、第1-5-（4）をお願いいたします。NA62-7は、既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた α -アミラーゼ（2014年12月15日官報掲載）でございます。

13ページをお願いいたします。表4にありますとおり、JPBL009株には、*amyM62.7*遺伝子が●●●、*prsA*遺伝子が●●●挿入されております。

続きまして、18ページをお願いいたします。第4-2-（1）でございますが、*amyM62.7*遺伝子の合成方法です。

初めに*amyM*遺伝子をPCRで増幅することにより取得し、位置特異的変異導入法を用いて●●●アミノ酸置換を導入し、本遺伝子を得ております。また、分泌シグナル配列も付加されております。

19ページに行きまして、こちらは*amyM62.7*遺伝子の機能についてでございます。こちらは先ほどと同様の説明になりますので、割愛いたします。

続いて、20ページをお願いいたします。NA62-7の安全性ですが、NA62-7を有効成分とする α -アミラーゼは、食品用酵素として5年ほど前から安全に使用されている旨を記載しております。

ここで、机上配付資料2の3ページを御覧ください。こちら先生から事前にいただいたコメントで、これについて申請者に問い合わせました。赤字のとおり、回答がまいりました。

具体的な修正は4ページの上、修正後というところを見ていただければと思いますけれども、下線が引いてあるところでございます。なお、JPBL009株中で発現するNA62-7のアミノ酸配列は、既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた*B. subtilis* MDT121株を利用して生産された α -アミラーゼのアミノ酸配列と同一のものである。したがって、JPBL009株から生産されるNA62-7の胃腸液に対する感受性は、既に我が国で販売・使用されている製品中のNA62-7と同等だと考えられ、人工胃腸液での消化性試験は実施しなかったと修正をしております。

続きまして、申請資料本文に戻りまして、31ページをお願いいたします。第5-2-（1）でございます。挿入領域の塩基配列はシーケンス解析により確かめられ、*amyM62.7*遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座に●●●挿入されていることが分かっております。

続きまして、35ページをお願いいたします。6通りの読み枠で、ORFとして定義して検索を行いました結果、申請資料に記載のと通りのORFが検出されております。

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溶性検索の結果は、36ページ、37ページにあるとおりで、先

ほどと同様でございます。

ここで、机上配付資料2の5ページを御覧ください。事前に先生からいただいたコメントとして、毒性タンパク質が市販品に含まれているかのような表現になっているので、修正するというので、修正後の記載内容は、MvirDBデータベース中のタンパク質が検出されたが、これらのタンパク質は単独での毒性が報告されているものではなかった。また、NA62-7及びPrsAは既に我が国で販売・使用されている製品中にも含まれており、安全に使用されているとしております。

続きまして、39ページをお願いいたします。第7の諸外国における認可の状況ですが、世界各国で5年以上にわたって販売されており、製パンの工程で加工助剤として用いられている旨が記載されております。

また、デンマークやフランスの承認状況についても記載されております。

続きまして、42ページをお願いいたします。第7-4、5行目から6行目にかけてですが、純度の確認をしております。本文には書かれておりませんが、これも社内文書を見たところ、●●●の純度でございました。

JPBL009株の説明は以上でございます。

最後にJPBL010株について説明させていただきます。

11ページをお願いいたします。組換え添加物についてですが、第1-5-（1）の名称及び有効成分は、 α -アミラーゼ（NM447）でございます。

12ページに行きまして、第1-5-（4）、NM447は既に安全性審査の手続を経た旨の公表がなされた α -アミラーゼ（2015年5月11日官報掲載）でございます。

13ページ、第1-6-（2）の表4でございますが、*amyM*遺伝子が●●●、*prsA*遺伝子が●●●挿入されております。

18ページをお願いいたします。第4-2-（1）の*amyM447*遺伝子のクローニング合成方法ですが、初めに*amyM*遺伝子をPCRで増幅することにより取得し、*amyM*遺伝子に位置特異的変異導入法を用いて●●●アミノ酸置換を導入しております。

19ページ、第4-2-（3）挿入遺伝子の機能に関する事項は、先ほどと同様なので、割愛させていただきます。

続きまして、31ページをお願いいたします。第5-2-（1）シーケンス解析の結果でございますが、遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座に●●●挿入、*prsA*遺伝子発現カセットが●●●遺伝子座に●●●挿入されていることが確認されました。

続きまして、35ページをお願いいたします。第5-2-（2）は●●●検索を行っておりますが、●●●遺伝子座でそれぞれ申請書に記載のと通りのORFが検出されておりました。

既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性検索は、結果としては先ほどと同様なので、詳細は割愛させていただきます。

39ページ、第7-1、諸外国における認可ですが、NM447製品は、世界各国で5年以上にわたって販売されております。

JPBL010株については、デンマーク、フランスで承認されていると記載されております。

42ページに行きまして、第7-4、5行目から6行目にかけて、タンパク質純度について記載されております。社内文書3では、先ほどと同様、●●●であることが記載されております。

JPBL010株の申請書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、先生方から御意見をいただきたいと思います。3つの申請書はほぼ似たようなものですし、また、一つ一つの申請書はそれほど大部ではございませんので、どこからでも御質問いただければと思います。

これは、以前、*B. subtilis*に入っていたもので、中身のアミラーゼについては、オリジナルのもの、アミノ酸を変えたもの、全部審査済みです。*B. subtilis*は安定なプラスミドベクターがございますので、そちらは先に開発されていて、それでも時々不安定で変わったりするので、管理に苦労するとも聞いております。なので、理由は書いてありませんでしたけれども、そんな理由で*B. licheniformis*にしたのではないかと思います。*B. licheniformis*ですと、安定なプラスミドとか、そういうものはないので、染色体に組み込むしかなくて、少々手の込んだやり方で染色体に組み込んでおりますが、現在では定法になっておりますので、よくある方法だと考えられます。

何かございますでしょうか。

私が一つだけ気になったのは、分子量についてです。推定分子量とSDS-PAGEの分子量が違うというのは、時々あることなので、*Bacillus*ですから、普通に考えるとセカンドプロセッシングだと思ったのですけれども、そうではないようだという回答が来ています。そういう場合だと、例えば電荷が偏っていて泳動の速度が変わるとか、そんなこともあり得るのですが、*B. subtilis*で生産したときもSDS-PAGEの分子量は同じようにシフトしていたのかどうかという点と、それから諸外国ですと、*Bacillus*でつくったものは販売されているけれども、*licheniformis*のものはまだ審査中のものがあったりします。何が言いたいかというと、*Bacillus*でつくったものと*licheniformis*でつくったものが本当に同じものなのかというところがポイントでして、そこが確認できれば、私はいいのではないかと思います。*Bacillus*のときも同じように分子量にシフトが起きていたのか。分子量のシフトが*licheniformis*で宿主を変えたときに特異的であるとなると、本当に同じかどうかというところが決定的に重要ですので、その確認ができないと、安全性は確認できないのではないかと考えております。

先生方、この辺、御意見をいただければと思います。〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 008株の19ページですけれども、今、〇〇〇がおっしゃったようなこともありますし、社内文書3を見ていますと、●●●ということで、●●●とか、低いところも幾つか見えているので、例えばウエスタンのデータがあるのかということもあるのですが、全部が低いということと、分子量が少し低いということが気になります。あとは、承認を受

けているほかとの比較もデータとして示してもらった方がいいのではないかと思います。
〇〇〇 その辺については、申請者を呼んでおりますので、後ほど直接ぶつけて、納得のいく回答が返ってくるかどうか注視したいと思っています。

先生方、そういうことだったらこれも聞いてみたいとか、ほかに何かございますでしょうか。〇〇〇、コメントはございますか。

〇〇〇 特にないです。結構です。

〇〇〇 〇〇〇、いかがですか。

〇〇〇 私も特にありません。先ほどの分子量の差は気になる場所ですけども、それ以外は特にありません。

〇〇〇 ほかにどなたかございますか。〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 特にはなくて、〇〇〇がおっしゃったような基質特異性が違うからというもの、この程度の違いだとそんなに気にならなかったです。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇、この件については何かありませんか。

〇〇〇 すみません、特にございません。

〇〇〇 それでは、ポイントはこの辺に絞られたようにも思いますので、申請者をお呼びしたいと思います。申請者の顔を見て、指摘等を思いつかれたら、適宜質問していただければと思います。

それでは、申請者をお呼びしていただけますでしょうか。準備が整うまで、少しだけ休憩にいたします。

(申請者入室)

〇〇〇 御多用中、ありがとうございます。長々と待機していただいたのだと思います。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。

〇〇〇 ノボザイムズ、〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 ノボザイムズ、〇〇〇と申します。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、事前に幾つか質問させていただいて、丁寧な回答をいただきましたので、特に3つのアミラーゼについての差異とか、そんなに差異はないのではないかと見えるのですが、それぞれについては、以前、*B. subtilis*に導入した件で既に審査済みということで、今回の*licheniformis*についても安全性は確認されておるものなので、そういった点は安全性の懸念は少ないかと存じます。

ポイントはどうやら一つだけでして、今回のSDS-PAGEでの分子量と推定分子量は●●●差がある。その差については、普通に考えるとセカンドプロセッシングだと思ったのだけれども、そういうことはなさそうだと御回答をいただいています。ポイントは、*Bacillus*

が宿主のときにも同じようなSDS-PAGEでバンドのシフトが起こっていたのかどうか。つまり今回の申請にあった*licheniformis*でつくったアミラーゼと*Bacillus*でつくったアミラーゼが本当に同じものなのかどうか、プロセッシング等々も含めて同じものなのかどうか、そこがポイントになっております。同じという御主張だと思えるのですが、資料だけでは分子量の違いについての説明等も少々納得いかない点がございまして、その点、丁寧に御説明いただければと思います。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 御指摘ありがとうございます。

そういったコメントなのですが、事前コメントでいただいております、少し回答させていただいているとは思いますが、確かに予想されるアミノ酸配列から考えられる分子量よりも、実際にSDSで確認されたバンドは低いというところがございます、弊社の中でいろいろと調べてみたのですが、以前、*subtilis*で発現していたものも同じ位置にバンドが出ていたということは確認しております。それ自体は、ここでも回答させていただいているのですが、かなり古い、一番古いものでいうと、30年近く前からつくられていまして、アミノ酸改変を含んでいるものが比較的新しいのですが、それも20年近く前から開発していまして、その中で酵素の分子の分析等、質量分析を含めてやっておったということで、社内のデータを全部見て、研究者にも確認したのですが、そのようなデータの中で、そういうプロセッシングが見られたということはなかったということで、恐らくSDS-PAGEは実際の分子量と少し乖離しているのだろうけれども、今のところ、そういうプロセッシングを示唆するようなデータはありません。販売している経緯から、そういうことをお客さんからも言われたこともないし、今までもの分析でもないので、そういうプロセッシングは今のところ考えられないという回答を得ております。

〇〇〇 ありがとうございます。

つまり*Bacillus*で従来つくっていたものと、今回申請の*licheniformis*でつくったものは、MS（質量分析）の解析等で同じものであるということを確認している。*Bacillus*でつくったものも、推定分子量よりは低い位置、今回の申請と同じ位置に来ることを確認しておるということでよろしいでしょうか。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 はっきり言って、そこが一番肝心のポイントでした。そこが確認できれば、あとは安心して、既に評価済みとして扱うこともできます。

余談ではあるのですが、SDS-PAGEで分子量がずれるというのは時々あることで、一つは電荷が偏っている場合です。それから、割とかちつとした固まり、少々似たぐらいではばらけないようなコアがあるような場合、こういうふうに分子量のずれが生じるのですが、このアミラーゼのpIはすぐに分かりますか。

〇〇〇 今すぐに手元には出てこないと思います。

〇〇〇 アミノ酸の配列をざっと見て、分子量がシフトするほどのpIのずれはないような気がしたので、なぜかと思いました。後ほどでもいいので、お願いします。

〇〇〇 確認しておきます。

〇〇〇 調べていると思いますので、お知らせいただけるとありがたいと思います。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 *licheniformis*でつくったものと、従来の*Bacillus*でつくったものと同じであることを確認しているという回答をいただきましたので、その点についても確認したというデータを後ほど添付していただけますでしょうか。

〇〇〇 申請用につくっているデータではないので、どこまできれいにらせるかというところで、出せるものと出せないものがありますので、整理させていただきまして、お示しできればと思います。

〇〇〇 昔から売っている*Bacillus*でつくっているものと、同じものであるということが確認できる程度の資料があれば、それで十分です。MSでも何でもいいです。*Bacillus*のときとSDSのバンドの位置がぴったりであるとか、そんなデータを添付していただければと思います。それはできますね。

〇〇〇 こちらで確認して、お示ししたいと思います。

〇〇〇 先生方、ほかにございませんでしょうか。

〇〇〇 1点だけ、既に市販されているものと今回との比較のデータを出していただけるということだったのですけれども、例えばウエスタンブロットをしているとか、そういったデータはございませんでしょうか。

〇〇〇 ウエスタンブロットは、ここではまだやっていないかもしれません。

〇〇〇 分かりました。

●●●ということで、●●●に思うのですけれども、これも従来と同じ程度だと考えてもよろしいですか。

〇〇〇 2013年、2014年に1回申請させてもらったものがあるのですけれども、そのときにも同じようなSDS-PAGEで、挙動というか、バンドのずれはありました。

〇〇〇 純度的にも同じ程度なのでしょうか。

〇〇〇 純度的にも、同じような現象ということで認められています。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 培養液からこの製品を調製するときの工程については、以前のものと大きな違い等はあるのでしょうか。

〇〇〇 この製品は生産性を高めるためということで、新しい宿主に入れていますので、そこら辺を変えてしまうと、製品が全く違うものになってしまうところがありますので、基本的には従来と同じような製造方法で、製品的にもお客さんが使ったときに、全く違うものになってしまうと、最終製品の出来栄も変わってきてしまいますので、その点は非常に注意して、同じものであることを確認しているところです。製造方法に関しましても、大きく何かを変えたということではございません。

〇〇〇 ありがとうございます。

先生方、ほかにございますでしょうか。どうぞ。

〇〇〇 今のお話で思ったのですが、今回の3品目は生産菌を変えて生産性を上げたということですが、売り出すときは従来製品と同じ名前で売るという理解でいいのですか。

〇〇〇 ●●●になると思います。

〇〇〇 売るときは、どのような形になるのですか。

〇〇〇 ●●●という形になると思います。

〇〇〇 ●●●という形で売るということですか。

〇〇〇 そういうことになります。●●●になっていくかと思います。

〇〇〇 分かりました。どうもありがとうございます。

以上です。

〇〇〇 ほかに先生方からございますでしょうか。よろしいですか。

本日は、お忙しいところ、ありがとうございました。

〇〇〇 ありがとうございました。失礼します。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、審議を再開したいと思います。

審査済みのものと分子量、調製方法等は同じであるということは確認が取れましたし、また、それを裏づけるデータも後で添付していただけるということですので、私としては疑問の点は氷解したと考えております。

先生方、ほかに御質問、御指摘等はございますでしょうか。

それでは、008、009、010、3株まとめて、安全性については問題ないと判定してよろしいでしょうか。意思表示をお願いいたします。

ありがとうございます。それでは、3件いずれも、安全性については問題ないと判定したいと思います。

後ほど資料が送られてきましたら、私どもで確認して、特に何も無いとは思いますが、もしもあれば、また相談させていただこうかと思えます。

それでは、評価書案に入りたいと思います。事務局からお願いいたします。

〇〇〇 それでは、評価書案について御説明させていただきます。

評価書案の束の29ページからが008株のアミラーゼになります。

34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、こちらは記載のとおりでございます。

Ⅱ．食品健康影響評価に関する事項です。

1の1の(1) 名称は、 α -アミラーゼ(TS-25)。

(2) 製造方法ですが、TS-25は、培養、ろ過、精製等の工程を経て製造されます。

(3) 用途及び使用形態ですが、パンの老化防止の目的で用いられます。TS-25は、パンの焼成の最終段階で高温により失活いたします。

(4) は記載のとおりでございます。

2の(1)でございます。宿主は*Bacillus licheniformis* Ca63株でございます。

(2) DNA供与体の種名ですが、 α -アミラーゼ遺伝子の供与体は、*Geobacillus stearothermophilus* C599株。*prsA*遺伝子は、*B. licheniformis* Ca63株由来でございます。

(3) 挿入DNAの性質でございますが、*amyM*遺伝子は*G. stearothermophilus* C599株由来のTS-25をコードいたします。*prsA*遺伝子は、菌体外分泌を促進する細胞膜タンパク質であるPrsAタンパク質をコードいたします。

3、食経験等でございますが、こちらは記載のとおりです。

4、宿主の構成成分ですが、*B. licheniformis*は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティーレベル1に相当いたします。

5、遺伝子組換え添加物の性質でございます。こちらは記載のとおりでございます。

6の(1)でございます。遺伝子組換え添加物と従来の添加物ですが、JPBL008株の産生するTS-25と従来の*B. subtilis* DN1413株が産生するTS-25との相違点は、生産菌が異なる点でございます。

(2) JPBL008株と宿主との相違点は、JPBL008株には*amyM*遺伝子及び*prsA*遺伝子が挿入されている点、並びに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。

第2、宿主に関する事項は記載のとおりでございます。

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pJPV040及びpJPV035の作製には、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドpE194が用いられております。

2、性質に関する事項は、記載のとおりです。

第4でございます。

1は記載のとおりです。

2の(1) クローニング、合成方法でございますが、*amyM*遺伝子は*G. stearothermophilus* C599株よりPCR法により取得し、*B. licheniformis* Ca63株由来の α -アミラーゼ遺伝子及び*B. amyloliquefaciens* DSM7株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列を組み合わせた配列が分泌シグナル配列として付加されております。

(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。*amyM*遺伝子がコードするTS-25は、グルコース重合体の α -1,4結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素でございます。

*prsA*遺伝子は、菌体外分泌を測定する細胞膜タンパク質であるPrsAタンパク質をコードし、TS-25の菌体外分泌量を増加させます。

TS-25を有効成分とする酵素製剤は、食品用酵素として20年前から使用されており、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。

3、4、5の（1）（2）は記載のとおりでございます。

5の（3）、271行目になりますが、遺伝子導入用ベクターpJPV040及びpJPV035上の意図する挿入領域は、それぞれ*amyM*遺伝子発現カセット、*prsA*遺伝子発現カセットの領域でございます。

（4）は記載のとおりです。

6、導入方法でございます。宿主ゲノムの各標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、各マーカーにより選抜しました。その後、遺伝子導入用ベクターpJPV040を導入し、インテグラーゼの作用によって*amyM*遺伝子発現カセットを挿入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体選抜しました。各標的遺伝子座においては、*cry3Am*RNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、●●●遺伝子、インテグラーゼ認識配列及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落いたしました。

また、宿主ゲノムの標的遺伝子座にあらかじめマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより導入し、マーカーにより選抜しました。

次に、遺伝子導入用ベクターpJPV035を相同組換えにより導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜しております。その後、*cry3Am*RNA安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落いたしました。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子についてですが、遺伝子導入用ベクターpJPV040及びpJPV035はエリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主のゲノムからはループアウトにより脱落しております。また、抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことをシーケンズ解析により確認しております。

第5でございます。

1は記載のとおりです。

2の（1）ですが、*amyM*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットの標的遺伝子座の導入位置を確認するため、シーケンズ解析を行った結果、*amyM*遺伝子が複数コピー及び*prsA*遺伝子が挿入されていることが確認されております。

（2）ORFの有無の項目ですが、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検索を行いました結果、ORFが合計で333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の確認するため、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。

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、E-Value0.02未満を指標にして検索を行った結果、毒性タンパク質と相同性を有するORFは検出されませんでした。

第6については、記載のとおりでございます。

第7の1、諸外国における状況でございますか、TS-25製剤は、日本を含む世界各国で20年以上使用されております。JPBL008株を利用して生産されたTS-25製剤は、デンマークにおいては2020年、フランスにおいては2021年に、それぞれ食品用加工助剤として承認されております。

第7の2、ドットブロット解析により、TS-25製剤には組換えDNAが検出されないことが確認されております。

第7の3、第7の4、第7の5については、記載のとおりでございます。

008株の評価書案の説明は以上でございます。

続きまして、009株の評価書案について説明させていただきます。

先ほどと評価書案の記載内容が重複する箇所については、適宜割愛しながら説明いたします。

49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、こちらは記載のとおりでございます。

Ⅱ．食品健康影響評価ですが、1の1の(1)名称は、 α -アミラーゼ (NA62-7) でございます。

(3) 用途及び使用形態ですが、NA62-7は、耐熱性及びスクロース耐性を有し、パンやケーキ類の老化防止の目的で用いられます。NA62-7は、パンやケーキ類焼成の最終段階で高温により失活いたします。

50ページの97行目をお願いいたします。(3) 挿入DNAの性質等ですが、*amyM62.7*遺伝子は、*G.stearothermophilus* C599株由来の α -アミラーゼ (TS-25) のアミノ酸配列中複数のアミノ酸置換したNA62-7をコードします。TS-25と比較しまして、耐熱性及びスクロース耐性が向上しております。

51ページの138行目、6の(1)といたしまして、相違点でございますが、JPBL009株の産生するNA62-7と従来の*B.subtilis* DNT121株が産生するNA62-7との相違点は、生産菌が異なる点でございます。

(2) JPBL009株と宿主との相違点は、JPBL009株には*amyM62.7*遺伝子及び*prsA*遺伝子が挿入されている点並びに複数遺伝子を欠失している点でございます。

53ページをお願いいたします。212行目、クローニング、合成方法に関する事項でございます。

*amyM62.7*遺伝子は、*G.stearothermophilus* C599株よりPCR法により取得した*amyM*遺伝子に位置特異的変異導入法を用いて複数のアミノ酸が置換する変異を導入いたしました。また、分泌シグナル配列も付加されております。

54ページをお願いいたします。277行目ですが、遺伝子発現用ベクターpJPV041及びpJPV035上の意図する挿入領域は、それぞれ*amyM62.7*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットの領域でございます。

55ページ、317行目ですが、*amyM62.7*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットの標的遺伝子座の導入位置を確認するため、シーケンス解析を行った結果、*amyM62.7*遺伝子が複数コピー及び*prsA*遺伝子が挿入されていることが確認されました。

324行目、ORFの有無についての項目ですが、56ページをお願いします。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検索を行いました結果、6つの読み枠において、終止コドン間で終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計335個検出されました。

これらのORFと既知のアレルゲン、毒性タンパク質との相同性についての記載は、先ほどと同様でございます。

飛びまして、354行目、第7でございます。諸外国の状況ですが、NA62-7製剤は、日本を含む世界各国で5年以上使用されております。JPBL009株を利用して生産された製剤は、デンマークでは2020年に、フランスでは2021に、それぞれ食品用加工助剤として承認されている旨を記載しております。

第7の2ですが、PCR法により製剤には組換えDNAが検出されないことを確認しております。

第7の3、第7の4、第7の5については、記載のとおりでございます。

009株の評価書案の説明は以上です。

続きまして、010株の評価書案でございます。

64ページをお願いします。Ⅰ．評価対象添加物の概要ですが、こちらは記載のとおりでございます。

Ⅱ．食品健康影響評価でございます。

1の1の(1) 名称は、 α -アミラーゼ (NM447) でございます。

(3) 用途及び使用形態ですが、NM447は、耐熱性を有し、パンやケーキ類の老化防止の目的で用いられます。NM447は、パンやケーキ類焼成の最終段階で高温により失活いたします。

65ページ、96行目をお願いします。(3) 挿入DNAの性質ですが、*amyM447*遺伝子は、*G.stearothermophilus* C599株の α -アミラーゼ (TS-25) のアミノ酸配列中、複数のアミノ酸置換したNM447をコードします。TS-25と比較して耐熱性が向上しております。

66ページ、138行目をお願いいたします。6の(1) 組換え添加物と従来の添加物の相違点でございますが、JPBL010株の産生するNM447と従来の*B.subtilis* NZYM-SO株が産生するNM447との相違点は、生産菌が異なる点でございます。

(2) JPBL010株と宿主との相違点は、JPBL010株には*amyM447*遺伝子及び*prsA*遺伝子が挿入されている点並びに複数遺伝子を欠失している点でございます。

少し飛びまして、68ページをお願いいたします。210行目からですが、挿入遺伝子のクローニング、合成方法です。*amyM447*遺伝子は、*G.stearothermophilus* C599株よりPCR法により取得した*amyM*遺伝子に位置特異的変異導入法を用いて複数のアミノ酸が置換す

る変異を導入しました。

70ページをお願いいたします。314行目、第5の2の（1）でございますが、*amyM477*遺伝子発現カセット及び*prsA*遺伝子発現カセットの標的遺伝子座の導入位置を確認するため、シーケンス解析を行った結果、*amyM447*遺伝子が複数コピー、*prsA*遺伝子が挿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、ORF検索を行いました結果、合計で335個検出されております。

既知のアレルゲンや毒性タンパク質との相同性検索の結果については、先ほどと同様でございます。

352行目、第7でございます。諸外国の認可状況ですが、NM447製剤は、日本を含む世界各国で5年以上使用されております。JPBL010株を利用して生産されたNM447製剤は、デンマークで2020年に、フランスでは2021に承認されております。

第7の2ですが、PCR法により、NM447製剤には、組換えDNAが検出されないことが確認されております。

第7の3、第7の4、第7の5、第8については、記載のとおりでございます。

010株の評価書案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、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。3つまとめて、どこからでも結構です。また、細かい字句等でしたら、後ほど事務局までお伝えいただければと思います。

〇〇〇 全部の株に当てはまるのですけれども、一番最初の008株だと41ページの330行目になるのですが、ここで用いているアミノ酸の相同性なののですけれども、データベースの中では「80アミノ酸残基で35%以上」ですが、ここでは「80アミノ酸配列以上で」とございます。今回は80アミノ酸残基で35%となっていますので、その点、訂正をお願いできればと思います。

同じところは、009株では56ページの336行目、010株では71ページの334行目になります。その点、お願いできればと思います。細かいところすみません。

〇〇〇 これはこれまでの慣例もあって、今までは多分全部配列になっていたと思います。

〇〇〇 今回は80アミノ酸残基のものだけしか出していなくて、アレルゲンのほうでやっています。データとして2つしかつけていないので、8アミノ酸の連続、80アミノ酸の残基でやるということだけしか書いていなくて、申請書にもそのような形で書いてありますので、今回の申請書だけに限れば、正確に言えば、80アミノ酸残基だと思います。

〇〇〇 分析資料では、80amino acid windowとなっているので、以上ではなくて、80アミノ酸なのですね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 だから、こちらが違うのですね。

〇〇〇 評価書のほうです。

〇〇〇 修正していただけるということなので、それでいいですか。

〇〇〇 はい。

〇〇〇 〇〇〇、御指摘ありがとうございました。おっしゃるとおりです。

〇〇〇 3つの株で同じところがあります。

〇〇〇 要するに「以上」は余分ということですね。

〇〇〇 はい。「以上」はなしで「80アミノ酸残基」だけです。

〇〇〇 その点は訂正していただいて、後ほどこちらでも確認させていただきます。

〇〇〇 お願いいたします。

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。〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 今日は〇〇〇から確認していただくこと、追加していただくことをお願いして、それでいいと思ったのですが、評価書はこれが出る前のままですか。案としてつくった段階ですか。例えば008だったら、36ページの遺伝子組換え添加物と従来の添加物というところで、相違点は生産菌が異なる点であるとあるのですが、この回答を踏まえてこう書き換えたのですか。

〇〇〇 6の(1)については、事前に〇〇〇から御意見をいただいたものでして、それを反映したものであって、机上配付資料2を踏まえて修正したものではないです。

〇〇〇 難しいところなのですが、机上配付資料の修正点というのは、箇所としては、218行目からの(3)の挿入遺伝子の機能に関する事項というところで、人工胃液とか、人工腸液とか、熱安定性のことをやっていたらこの辺に書き込みます。今回そういうデータは、やらなくても言えると申請者は主張して、その線で今度データを出してくれる。その辺りを何か書かないと、これが公表されると、別の会社がそういうことをやらない例が出たという感じで、人工胃液とか、人工腸液とか、熱安定性をやらないで出してくることがあるのではないかと。今回のノボザイムズほど、きちんとやらないで出してくるということはないか。やらなくていいという結論、今回やっていないということをここに記述しておく必要はないですか。今までの評価書がどうなっていたかというのは、全部見ていないので分からないのですが、もう慣れているところは大丈夫だと思うのですが、新たに出そうとするところは、これを見て、やらなくていいとなってしまうのではないのでしょうか。

今の基準からすると、人工胃液、人工腸液、熱安定性辺りを言及しているものは、抗生物質の耐性マーカー遺伝子のところに入っています。もちろんアミノ酸配列が違った場合などは、比較せよみたいな何からの説明が書いてあるのだけれども、この辺りは何も触れていなくても大丈夫ですか。事務局が大丈夫だと言うのだったら、申請者はそんなに新たな参入はないだろうからいいと思うのですが、その辺りはどうですか。このままでいいですか。

〇〇〇 このままでも宿主を変えたものだという記述から、宿主を変える前のものは審査

済みと読み取ることはできるので、いいとも思うし、以前の安全性審査なり何なりの裏づけがないものがいきなり出てきたら、やってくださいとこちらから要求するだけの話なので、私はいいのではないかと思うのですが、事務局的にはどうでしょうか。これは事務的に話をつけてください。

〇〇〇 今の話につきましては、評価指針が基本になると思います。

〇〇〇からも御指示がありましたように、事務的に詰めたいと思いますけれども、特段に御指示等がございましたら、御意見をいただければと思います。

〇〇〇 先生方、何かございますか。先生方、何かコメントはございますか。いいみたいです。それでは、話がまとまりましたら報告してください。

ほかに評価書案等についてございますでしょうか。

〇〇〇から指摘等もございましたので、そこは事務局で修正し、私と〇〇〇も確認にお付き合いをお願いいたします。

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入りたいと思います。

ありがとうございました。

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、事務局から今日は何かあるのですか。よろしくお願いします。

〇〇〇 本年5月の調査会で審議いたしましたJPAN009株を利用して生産されたグルコアミラーゼにつきましては、〇〇〇より、最新のデータベースに基づき再検索することというコメントをいただいていたところでございます。

本件につきまして、申請者に確認を行いましたところ、机上配付資料3のとおり、新たなアレルゲンとの相同性を示す結果となったところから、専門委員の先生におかれましては、再度御確認いただきたく、その他の議題とさせていただきます。

〇〇〇 こういうことがあるから、しつこく最新のデータベースで検索してとお願いする必要があるということですね。

出していただいたところは、それほど深刻なものではないようですが、とにかくデータに引っかかったということで、説明をお願いいたします。

〇〇〇 それでは、机上配付資料3を御覧ください。

先ほど申し上げたとおり、最新のデータベースで検索をお願いいたしました。その結果について回答をいただいております。

1ページ目を御覧ください。赤字部分でございます。簡潔に説明させていただきますと、JPAN009株の遺伝子挿入部位の配列を用いて既知のアレルゲン及び毒性タンパクの相動性の検索を行ったところ、遺伝子導入用ベクターpJPV030の挿入部位の3'末端に存在するORFが新たに連続する8アミノ酸配列一つがアレルゲンと相同性を示しました。

しかしながら、当該ORFは、既に別のアレルゲンと同じ8アミノ酸配列で相同性を示しているものであるため、結論に変更はございませんといったところでございます。

要旨の具体的な修正箇所といたしましては、机上配付資料3の48ページでございます。

37行目、黄色いマーカー部分、一つのORFが牛だけだったものが、さらにタイセイヨウサケ及びバラマンディに由来のアレルゲンと連続した8アミノ酸配列で一致したと、このように修正をしております。

また、45行目、マーカーがついております。相同性を示したアレルゲンは、牛、タイセイヨウサケ及びバラマンディ由来のI型コラーゲンの基本骨格である $\alpha 1$ 鎖、またはプロ $\alpha 2$ 鎖であったとしております。新たに増えたというわけではないですが、このように修正をしております。

回答及び要旨の修正案について、まず御意見をいただければと思います。

〇〇〇 新しく見つかったとはいえ、既に知っているものということのようですね。

この点については、〇〇〇、いかがでしょうか。

〇〇〇 8残基での相同性が見つかったところがあるということなのですが、エピトープの部分ではなかったと書かれていることと、80アミノ酸残基で35%の条件では相同性はなかったということです、これでよろしいと思います。アレルゲンとして考えるほどの深刻なものではないと思いますので、このデータがあればよろしいと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇 辺りはいかがですか。

〇〇〇 特段問題はないと思いますので、十分だと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

〇〇〇にも御意見をお聞きしたいと思います。

〇〇〇 〇〇〇がおっしゃられましたように、エピトープとしての一致は見られないところ、80アミノ酸残基で35%以上の条件で見たときにも該当しないということで、アレルギー性を持つことについては、大きな心配はないのかと感じております。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

専門の先生方がこのように御見解をいただいておりますので、先生方、よろしいですか。

ありがとうございます。この辺はいいということです。

そうすると、評価書が少し変わります。

〇〇〇 回答に併せて評価書案の書きぶりについて修正をしたいと思います。

76ページ、423行目でございます。赤字の見え消しで書いておりますが、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、1個のORFに対して3種類、いずれも同一の連続した8アミノ酸配列が認められた。これらは牛、タイセイヨウサケ、バラマンディ由来I型コラーゲンの基本骨格であるプロ $\alpha 1$ 及び2鎖のタンパク質であり、牛由来タンパク質はワクチン接種を暴露経路とするアレルゲンとして、タイセイヨウサケ及びバラマンディ由来タンパク質は、魚アレルギー患者の血清で反応が確認された食物アレルゲンとして登録されている。

当該ORFは、80アミノ酸残基で35%以上の条件ではいずれも3種類のタンパク質とも相

同性を示していない。また、この8アミノ酸配列に対して、一致するアレルゲンエピトープは認められていないことから、仮にORFが転写・翻訳されたとしても、アレルギー性を有すと可能性は低いと考えられたと修正したいと思っております。よろしいでしょうか。

〇〇〇 変更点を踏まえた修正になっていると思いますが、御意見等はございますでしょうか。これでいいですか。

ありがとうございました。それでは、手続を進めていただければと思います。

議題2のその他はこれでよろしいでしょうか。

〇〇〇 その他の事項については、以上でございます。

〇〇〇 ありがとうございました。

それでは、本日の議題はこれで終了でございます。

それでは、皆様、お疲れさまでした。これで第214回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を終了いたします。