食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

（第220回）議事録

1．日時　令和3年12月22日（水）　14:00～16:14

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
・*Bacillus subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼ
・JPAN004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、岡田専門委員、小関専門委員、小野道之専門委員、小野竜一専門委員、藤原専門委員、山川専門委員
（専門参考人）
児玉専門参考人、手島専門参考人
（食品安全委員会）
川西委員、脇委員
（事務局）
鋤柄事務局長、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

5．配布資料
資料　食品健康影響評価に関する資料
①*Bacillus subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼ
②JPAN004株を利用して生産されたα-アミラーゼ

6. 議事内容

○○○　それでは、定刻になりましたので、ただいまから第220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。

本日、所用により○○○、○○○、○○○は御欠席です。

また、専門参考人として、○○○及び○○○に御出席いただいております。

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、Web会議システムを利用しております。

本日の議題ですが、継続品目である「*Bacillus subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼ」及び新規品目であります「JPAN004株を利用して生産されたα-アミラーゼ」の安全性についての審議でございます。

お手元の資料を確認したいと思います。事務局からお願いいたします。

○○○　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となっております。

また、本日は、「*Bacillus subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼ」の申請者である日本食品化工株式会社の方、「JPAN004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、質疑応答等に対応していただくことを予定しております。

以上でございます。

○○○　それでは、事務局から「食品安全委員会における調査審議方法等について」に基づきまして、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。

○○○　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。

○○○　審議に入る前に、Web会議における注意事項について、事務局からお願いします。

○○○　本日はWeb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いただくようお願いいたします。

2点目、発言の際は赤い挙手のカードを提示してください。またはWeb会議画面の挙手

ボタンを押してください。または手を挙げていただければと、よろしくお願いいたします。

座長よりお呼びいたしますので、マイクをオンにしてお名前を発言していただいた上で御発言をお願いいたします。

座長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場合は、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Web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。

ウェブ会議における注意事項は以上でございます。どうぞよろしくお願いいたします。

○○○　それでは、継続品目である「*Bacillus subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼ」について審議を行いたいと思います。

本品目は令和3年5月の専門調査会において審議を行ったものです。

では、事務局から説明をお願いいたします。

○○○　それでは、御説明させていただきます。

本品目につきましては、本年5月の専門調査会で御審議いただいた際に、申請者に対し先生方から幾つか御質問や御指摘をいただいたところですが、今般、その内容を踏まえまして、申請資料の修正がなされておりますので、該当部分の御説明をいたします。

それでは、お手元にα-グルコシルトランスフェラーゼと記載されております水色の紙ファイルの御準備をお願いいたします。

まず1枚目でございますが、指摘事項1からそれぞれ順に説明させていただきます。

まず指摘事項1、こちらは第1-1-（4）摂取量に関するものでございます。α-1,6-グルカン含有糖化品中の当該酵素の残存量より摂取量を推計しているが、これを改め、現在日本国内で添加物として使用されているα-グルコシルトランスフェラーゼが全て本添加物に置き換わった場合の一日最大摂取量として算出することというものでございます。

回答としましては、α-グルコシルトランスフェラーゼの摂取量の算出法については、既存のα-グルコシルトランスフェラーゼが全てDDase-GOに置き換わった場合のDDase-GOの推定摂取量を算出する方法に修正いたしました。

次のページを御覧ください。表1にあるとおりでございますが、厚生労働省による国民健康・栄養調査報告に基づきまして、α-グルコシルトランスフェラーゼを用いて製造された糖化品を添加し得る食品群を選定し、当該糖化品の食品への最大摂取量を●●●%、糖化品製造時の酵素添加量を●●●%かつ食品中に酵素が全量残存すると仮定して一日当たりの最大摂取量を計算いたしました。結果としましては、4.7 mg/kg 体重/日ということで

ございます。

続きまして、指摘事項2、第1-2-（1）に関するものです。図2の生産用組換え体の構築の概略図は煩雑で分かりづらいため、（A）から（C）の各工程を実施した作業に即して説明すること。また、要旨本文中にも説明を追記することというものです。

回答としましては、まず（A）*B.subtilis* ISK01株の作製では、芽胞形成能が欠失した株の取得を目的に、ISW1214株のゲノムDNA上の芽胞形成関連遺伝子を直鎖DNA断片による二重交差相同組み換えにより、クロラムフェニコール耐性遺伝子及びその発現、調節領域に置換し、*B.subtilis* ISK01株を得ております。また、当該置換場所のPCR及びDNAシーケンス解析により意図した位置に*cat*が挿入されたことを確認しております。

次のページ（B）でございますが、*B.subtilis* NTI01株の作製につきましては、ISW1214株に対して、*trpS*欠失用プラスミドを一重交差相同組み換えにより、ゲノム内に導入して、*B.subtilis* TKC01株を得た後に、*trpS*補完用プラスミドであるpDATSKを導入してTKC01(pDATSK)株を得ております。これに●●●を行うことで、目的の遺伝子型を有する*B.subtilis* NTI01(pDATSK)株を得ております。

次のページに行きまして（C）*B. subtilis* NTI04（pHYT2TD）株の作製ですが、こちらは先ほどの（B）で得たNTI01（pDATSK）株が目的の遺伝子型を有するものの、ほかの酵素の発現プラスミドをpDATSKと入れ替える形で導入し、生産培養を行うと組換え酵素の生産量が低かった。この原因は、寒天培地での継代培養や冷蔵保存を繰り返し行ったためだと推測され、そこで生産性の向上を企図して、寒天培地での継代培養回数や冷蔵保存の期間を可能な限り削減した上で、NTI01（pDATSK）株と同様の遺伝子型を有する株を作製することとした。すなわち、●●●を実施することで、継代培養回数や冷蔵保存の期間を大幅に削減し、NTI01株と同じ遺伝子型を有した*B.subtilis* NTI04（pDATSK）株を取得し、続いて、NTI04（pDATSK）株が保持するプラスミドpDATSKを*Tepidibacilus decaturensis*由来α-グルコシルトランスフェラーゼの発現プラスミドであるpHYT2TDに入れ替え、得られた株について生産培養を行った。その結果、NTI04株は、芽胞形成能を欠損していること及び抗生物質非存在下であっても宿主のISW1214と同等の酵素生産性を有することが確認されたとしております。

続きまして、指摘事項3でございますが、フィルターの膜孔径を記載することということで、こちらは記載のとおりでございます。

続いて、指摘事項4、1-6-（1）ですが、従来の添加物との比較において、本遺伝子組換え添加物がα-グルコシルトランスフェラーゼとしての活性を有することを説明し、アミノ酸配列中のシグナル配列、触媒サイト、従来の添加物との相同性などを図にて示すことというものでございます。

回答として、TDDAとGODDのアライメントは、成熟タンパク質の推定アミノ酸配列で行っているため、TDDAのシグナルペプチド配列を除いたアミノ酸配列を記載しており、アミノ酸数、分子量、至適pH、至適温度などをそれぞれ回答書に比較するような形で記載

をしております。

3ページほど飛びまして、指摘事項5をお願いいたします。こちらは検索キーワードでございますが、記載のとおりやり直すことというものでございました。

回答の内容としては、記載のとおりでございます。

続いて、指摘事項6です。*Bacillus*属についてはヒトへの危険性を有するものも含まれていることから、*B.subtilis* sp. JAMB750株の安全性について記載することというものです。

B.subtilis sp. JAMB750株の16s rRNAの遺伝子配列を基に近縁種を推定し、当該近縁種の病原性や毒素算出能について調査したところ、これらの報告がなされていないことを確認したことから、*B.subtilis* sp. JAMB750株及びその近縁種はヒトへの危険性を有さないと推測しております。修正箇所はその次のページの下線部にございますが、*B.subtilis* sp. JAMB750株の16s rRNA遺伝子をblastnで検索すると、*Alkalihalobacillus alcalophilus* の16s rRNA遺伝子との相同性が最も高く、*B.subtilis* sp. JAMB750株及びその近縁種は、ヒトへの危険性を有さないと推測されたと記載をしております。

続きまして、指摘事項7でございます。図5及び図6のTDDAに相当するバンドに矢印を付して示すことというものでございます。こちらは次のページの記載のとおりでございます。

続いて、指摘事項8、4-2-（3）5）摂取量の項目ですが、残存量が●●● ppm未満であり、ヒトが摂取する可能性は低いとの考察は適切ではないことから修正するということで、下線部を修正してきております。

続いて、指摘事項9、第4-5の項目でございます。発現ベクターに関して、挿入DNAの塩基数、塩基配列、切断地図を申請要旨にも記載すること。また、構成要素の表も作成し、記載することというものでございます。

回答ですが、その下の表2でプラスミドの構成要素、次のページに行きまして、図12ではプラスミドのマップを示してきております。

続いて、指摘事項10でございます。データベースとしてSDAPを用いているが、2003年より更新されていないため、適切なデータベースを用いて検索をやり直すことというものです。

回答としては、2021年2月に更新されているAllergenOnlineを用いて、既知のアレルゲンとの相同性検索を再実施した結果、TDDA及び発現ベクター上の挿入DNA領域を含むORFについて、80アミノ酸残基を1セットとした検索では一致度が35％を超える配列は認められず、さらに連続する8アミノ酸残基が一致する領域も認められなかったということでございます。

続いて、指摘事項11です。遺伝子及びタンパク質の単位としてppmは適切ではないため、修正すること。ドットハイブリダイゼーション法による試験の趣旨に沿った考察に書き直すことというものです。

申請者の回答ですが、ELISAにおけるタンパク質の単位をppmからμg/mLに修正してお

ります。また、ドットハイブリダイゼーション法については、趣旨を勘違いし、抗生物質耐性遺伝子の摂取量を求めることを企図して行ったということです。一方で、組換え体の残存については、7-2においてプレートでの培養法にて組換え体が残存していないことを確認しているため、ドットハイブリダイゼーションに関する記載は不要と判断し、削除したということでございます。

続きまして、指摘事項12をお願いします。第5-2-（2）ですが、生産菌ゲノムの芽胞形成遺伝子座はクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換されていることから、新たに生じた接合部を含む本領域についてORF検索を行い、得られたORFと既知のアレルゲン及び毒性タンパク質との相同性に関して考察をすることというものです。

回答ですが、ISK01株の当該領域をシーケンス解析して得られた塩基配列を基に、終止コドンに挟まれた90塩基以上の配列をORFとして検索を行い、ORF産物をAllergenOnlineによるアレルゲン検索及びblastpによる相同性検索を実施した結果、*spoIIAC::cat*の変異により生じたORFによって、アレルゲンや毒性タンパク質といった、有害なタンパク質が産生される可能性は低いと推測されたということでございます。

最後になりますが、指摘事項13です。ImageJでの画像処理手法に代わり、純度を推定するためのより適切な手法を検討して解析をやり直すことというものでございました。

回答ですが、画像処理以外の純度を推定する手法として、有効成分であるTDDA精製酵素の比活性から濃縮後サンプル中のTDDAの純度を求める手法を検討したということです。こちらはその次のページの下線が引いてある部分にあるとおりですが、活性測定及びBradford法によるタンパク質濃度測定を行い、TDDAの比活性からTDDAの純度を求めたということです。TDDA精製酵素の比活性、濃縮後サンプルの活性値を基に、TDDAは濃縮後サンプル中にタンパク質濃度として●●● mg/mL含まれると算出されました。また、濃縮後サンプルの総タンパク質濃度は●●● mg/mLであったということです。以上求めたタンパク質濃度の割合から算出されたTDDAの純度は約●●●%であったということでございます。

ただいまの回答書の図14については、後ろのほうに申請要旨の22ページがあるのですけれども、22ページの図14を見ていただくと、矢印の部分が実はちょっとずれておりまして、回答書の図14ですと●●●kDa近辺に矢印がついていて、申請要旨のほうですと●●●kDa近辺に矢印がついておりまして、申請者の回答が一致しておりませんので、ここは申請者に修正を求める必要があるかなと考えております。

回答書の説明は以上でございます。

○○○　ありがとうございました。今年の5月に審議したもので、めったやたら指摘事項がついておりますが、これは問題がありまくりというわけでは全然なくて、申請者がいかにもこの申請に慣れていないという感じで細かい不備が多かったのと、あとはどういう点を概要書に書いて、どういう点を添付資料にすべきかとかその辺のさじ加減で分かりにくかったので、細かく指摘事項をつけさせていただいたので、大体そういう感じでございま

す。この回答書にページ番号がついておりませんので、最初から1枚ずつめくる形でちゃっちゃといきたいと思います。

指摘事項1、これは一日最大摂取量として算出することということで、私と本日御欠席の○○○、既に御退任の○○○の指摘でございます。厚労省の数字に基づいてきちんと計算し直していただいておりまして、4.7 mg/kg 体重/日、私はこれでよろしいかと思います。先生方、この点につきまして御質問等ございますでしょうか、よろしいでしょうか。

よろしいようですね。では、どんどん行きたいと思います。

指摘事項2、これは生産用組換え体の構築の概略図が煩雑で分かりづらいので、ちゃんと各工程で実施した作業に即して説明して、もう少し分かりやすく、何をやってこの株をつくったのか言ってくださいということです。添付資料2にあったものが、もう一枚めくっていただきますとこの概要、図5になっておりまして、それから、途中のこの説明、詳しくシステムを書き加えてきております。これは私と○○○の指摘でございました。私はこれくらい書いてくれれば十分かなと思うのですが、○○○、いかがでしょう。

○○○　元の文章は図と対応させて読んでいくと全然分からなかったのですけれども、これで非常にスムーズに分かりましたので、これでよろしいかと思います。

○○○　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。では、この点もよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、もう一問、まためくっていただいて、指摘事項3です。フィルターろ過の工程でということなのですが、菌体が確実に除けるようなフィルターを使っているかどうか確認したかったので、私が尋ねました。●●●、普通こういう目的に使われるものなので、私はこれでよろしいかと思います。

先生方、この点につきまして何かございますでしょうか。よろしいでしょうか。

ありがとうございます。では、次に行きたいと思います。

同じページの指摘事項4、従来の添加物との比較において、本添加物がα-グルコシルトランスフェラーゼの活性を有することを説明して、さらにアミノ酸配列中のシグナル配列、触媒サイト、従来の添加物との相同性などを図で示すこと。これは○○○の御指摘でして、これはアミノ酸配列の比較のアライメントの図など、彼らなりに一生懸命このデータを出してきたと思いますが、○○○、この点、いかがでしょうか。

○○○　いただいた図は非常に分かりやすくて、これくらい相同性があれば十分同じ活性を持っていてもおかしくないと思いますので、触媒サイトもきちんと明示されていますので、これでよろしいかと思います。

○○○　ありがとうございます。確かにこれで随分見やすくなりましたね。

先生方、この点につきましてほかに御意見ございますでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項5に行きます。これは○○○からの御指摘でございまして、検索のキーワードは「fixation」ではなくて「colonization」として検索をちゃんとやり直してく

だいということでした。○○○、いかがですか。
○○○　こちらの回答で結構だと思います。
○○○　ありがとうございます。
　○○○はよろしいということなのですが、ほかの先生方、この点につきまして、よろしいでしょうか。
　よろしいようですね。ありがとうございます。
　それでは、指摘事項6に行きます。同じページで*Bacillus*属についてはヒトへの危険性を有するものも含まれているので、*Bacillus* sp.としかなっていないので*Bacillus* sp.JAMB750株の安全性について、この元株の安全性についてきちんと示してくださいという○○○からの御指摘です。元株の情報について、出すべきものを出してきてくれたかなと私は思いますけれども、○○○、いかがでしょうか。
○○○　16sの配列で一番近いのが*Alkalihalobacillus*という形で、*Bacillus*ではないといったら*Bacillus*ではなくなってしまうのですけれども、Alkalとかがつくと大体極限微生物になって、極限微生物のほとんどは病原性がないので、この記述でよろしいかと思います。
○○○　ありがとうございます。これは多分、*Bacillus*って随分分割されていろいろな名前がついているので、今の*Bacillus*というのを分類し直すと違う名前になるのではないかという気もするのですけれども、これでよろしいかと思います。
　ほかに先生方、よろしいでしょうか。
　よろしいようですね。ありがとうございます。
　それでは、指摘事項7、人工胃液、人工腸液、もう一枚めくっていただいたSDS-PAGEの図なのですが、見てほしいもののバンドに矢印ぐらいつけてちょうだいよと私が要求いたしました。ちゃんと矢印がついていて分かるようになっているので、よろしいかなと思います。
　それから、この図はいいのだけれども、最後の純度のところで事務局からの指摘があったもの、あれは明らかに概要書のほうが合っていて、今回つくってきたほうがずれていると思うので、それは多分、向こうに指摘すれば慌てて直してくるかと思います。私はこれで十分かと思いますけれども、先生方、この点、ございますでしょうか。よろしいでしょうか。
　ありがとうございます。
　それでは、指摘事項8、残存量が●●● ppm未満であり、ヒトが摂取する可能性は低いとの考察はあまり適切ではなくて、もうちょっとちゃんと考察してくださいと、これは○○○からの御指摘だったと思います。表現が書き直されておりますが、○○○、これくらいでいいですか。
○○○　いいと思います。ありがとうございます。
○○○　ありがとうございます。
　先生方、この辺につきまして御意見等ございますでしょうか。よろしいでしょうか。

それでは、指摘事項9は○○○からで、発現ベクターpHYT2TDに関して挿入DNAの塩基数、塩基配列及び切断地図を申請要旨にも記載すること。また、構成要素の表も作成し、記載することという、通常こういうのは概要書が膨れ上がっても概要書にきちんと書いておいていただくもので、添付資料ではなくてこちらにということで、マップがついていて、それで領域についても構成要素についての表2がついております。もうちょっと説明があってもいいかなと思うけれども、大体これで必要なことは書いてあるのかなと私は思うのですけれども、○○○、この点はいかがですか。

○○○　座長のおっしゃるとおり、ちょっとそっけないといえばそっけないですけれども、必要最小限のことは書かれてありますので、これでよろしいかと思います。

○○○　ありがとうございます。通常はもうちょっと構成要素のところで説明があったりもするものなのですけれども、まあいいかなというところのようで、先生方、この点につきましてよろしいでしょうか。

ありがとうございます。

それでは、そのプラスミドマップの指摘事項10、ここは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というので、このデータベースとして用いているものは2003年から更新されていないので、ちゃんと適切なデータベースを用いて検索をやり直すということで、実はこの指摘事項、本日御欠席の○○○からです。

これは私も見させていただきましたけれども、新しいアレルゲンデータベースを使って検索のやり直しをしておりまして、そのデータが付されております。やることはやってくださっているかなと思うのですけれども、○○○、この辺はいかがですか。

○○○　質問とちょっとずれるのですけれども、私としてはよろしいのではないかと思ったのですが。

○○○　ありがとうございます。○○○。

○○○　AllergenOnlineの一番新しいバージョンで検索してもらっていますので、これで問題ないと思います。

○○○　ありがとうございます。

○○○、いかがですか。

○○○　問題ないと思います。

以上です。

○○○　ありがとうございます。

ほかの先生方、この点につきまして。

では、多分、○○○もうんと言うでしょうということで、この点はクリアということにしたいと思います。

では、指摘事項11は○○○ですが、遺伝子及びタンパク質の単位としてppmはないでしょうと、そこはちゃんと修正すること。それから、ドットハイブリダイゼーション法によ

る試験の趣旨に沿った考察に書き直すことということで、これはppmではなくてμg/mLに修正されていて、記述も結構書き直されております。一生懸命対応してくれているかなと思うのですけれども、○○○、いかがでしょうか。

○○○　これで結構です。

以上です。

○○○　ありがとうございます。

ほかの先生方、この点につきまして、よろしいですね。ありがとうございます。

それでは、指摘事項12は私と○○○ですね。生産菌ゲノムの芽胞形成に関する遺伝子で*SpoII*遺伝子座、これらはクロラムフェニコール耐性遺伝子に置換されているので、新たに生じた接合部を含む本領域についてORF検索を行い、得られたORFと既知のアレルゲン及び毒性タンパク質の相同性に関して考察をすることということです。

これは言われたとおりORF検索をやっておりまして、それで細かいことをいろいろ書いてありますが、基本的には問題ないかなと。これの変異によって生じた23個のORFによって有害なタンパク質が生産される可能性は低いと推測されると結論されておりまして、私はこれならいいかなと思うのですけれども、○○○、いかがでしょうか。

○○○　私もこれでよろしいかと思います。

以上です。

○○○　ありがとうございます。

この点につきまして、ほかの先生方、いいでしょうか。よろしいですね。

それでは、指摘事項13、これは私ですが、次のページをめくっていただきますと、ImageJで製品の純度検定とかをやっていて、それで初めは●●●％で、どう見てもそれより濃そうに見えるし、それからImageJってフリーソフトではなくてもうちょっとましな画像解析ソフトを使えよというふうに言いたかったのですけれども、彼らはタンパク質の濃度と比活性を使って計算し直してきていて、それで純度約●●●％と出してきています。これでもいいといえばいいかなと思いますので、私はこれでいいかなと思いますが、先生方、この点いかがでしょうか。

よろしいですね。ありがとうございます。

これで指摘事項に関する回答は全部でございます。全般を通しまして、この件につきまして、質問等はございますでしょうか。

それでは、本件につきまして、安全上特に問題がないと判定をしたいと思いますが、いかがでしょうか。先生方、意思の確認をしたいと思いますので、意思表示をお願いいたします。よろしいでしょうか。

（同意する委員あり）

○○○　ありがとうございます。それでは、全員同意いただけましたので、本件については安全上問題ないということで、待機している申請者、出番なしと伝えてあげてくださいませ。

それでは、引き続き、評価書案の審議に入りたいと思います。事務局のほうからお願いいたします。

○○○　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2ページ目からがα-グルコシルトランスフェラーゼの評価書案になります。

まず、7ページを御覧ください。「Ⅰ．評価対象添加物の概要」でございます。*Bacillus subtilis* ISW1214株を宿主としまして、*Tepidibacillus decaturensis*由来のα-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミドpHYT2TDを導入して作製した*B. subtilis* NTI04（pHYT2TD）株を利用して生産されたα-グルコシルトランスフェラーゼでございます。

続いて、「Ⅱ．食品健康影響評価」についてです。まず、第1-1-（1）ですが、名称はDDase-GO、基原は*Gluconobacter oxydans*、有効成分はα-グルコシルトランスフェラーゼでございます。

（2）製造方法ですが、DDase-GOは、*G. oxydans*を生産菌として用い、培養、精製、製剤化等の工程を経て製造されます。生産菌は、精製工程で分離、除去されます。

（3）用途及び使用形態ですが、デンプン加水分解物に作用し、α-1,6-グルコシル転移反応を触媒する酵素であり、α-1,6-グルカンを製造するために使用されております。

（4）摂取量ですが、DDase-GOを用いて製造された糖化品を添加する食品において、その食品中に本酵素が100％残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、4.7 mg/kg 体重/日でございます。

続いて、2-（1）宿主の種名ですが、宿主は、*B. subtilis* ISW1214株です。

（2）DNA供与体の種名ですが、*tdda*遺伝子の供与体は*T. decaturensis*、*trpS*遺伝子の供与体は*B. subtilis* ISW1214株、*cat*遺伝子の供与体は、*Staphylococcus aureus*でございます。

（3）挿入DNAの性質等ですが、*tdda*遺伝子は、α-グルコシルトランスフェラーゼをコードし、*trpS*遺伝子はトリプトファニルtRNA合成酵素をコードします。これらの遺伝子を含む発現プラスミドpHYT2TDを宿主に導入しております。*cat*遺伝子は、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードし、二重交差相同組換えによりゲノムに導入されました。

3及び4は記載のとおりです。

続いて、5-（1）ですが、製品名はDDase-TD、有効成分はα-グルコシルトランスフェラーゼでございます。

（2）、（3）は記載のとおりでございます。

（4）有効成分の性質及び従来の添加物の比較でございます。DDase-TDは、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素ですが、熱安定性が向上しており、反応生成物であるα-1,6-グルカンの組成が異なります。

続いて、6-（1）としまして、DDase-TDと従来の添加物との相違点は、アミノ酸残基数、

至適pH、温度、熱安定性が向上している点並びに反応生成物の組成が異なる点でございます。

組換え体と宿主との相違点ですが、*B. subtilis* NTI04（pHYT2TD）株はα-グルコシルトランスフェラーゼ産生能、テトラサイクリン耐性及びクロラムフェニコール耐性を有している点でございます。

以上の1から6までより、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は記載のとおりでございます。

2、病原性ですが、*B. subtilis*の病原性は知られておらず、有害生理活性物質を生産するという報告はございません。また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程に定めるバイオセーフティレベル1に該当いたします。

続いて、3から5について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、発現プラスミドpHYT2TDの作製には*E. coli*由来のプラスミドpACYC177と*Streptococcus faecalis*由来のプラスミドpAMα1から構築されたプラスミドpHY300PLKが用いられております。

続いて、2、性質については記載のとおりでございます。

続いて、第4の項目です。1-（1）は記載のとおりです。

（2）安全性ですが、*T. decaturensis*及び*B. subtilis* ISW1214株は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られておらず、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レベル1に相当します。

*S. aureus*は、毒素産生能を有しており、バイオセーフティレベル2に分類されております。ただし、*cat*遺伝子に毒素産生に関する報告は確認されておらず、遺伝子産物であるCATに病原性は知られておりません。

続いて、2-（1）ですが、*tdda*遺伝子は、*T. decaturensis*のα-グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子の塩基配列に基づき、*B. subtilis*での発現を最適化するための塩基変異を導入し、人工合成した遺伝子でございます。*trpS*遺伝子は、*B. subtilis* ISW1214株の*trpS*遺伝子をクローニングした後、塩基変異を導入した遺伝子でございます。

（2）は記載のとおりです。

続いて（3）、まず①遺伝子産物の供与体のアレルギー誘発性に関する知見ですが、文献の検索を行いました結果、報告はございませんでした。

続いて、②遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見について、α-グルコシルトランスフェラーゼに関しては、そのような報告はございませんでした。

続いて、③物理化学的処理に対する感受性でございます。まず、a、人工胃液に対する感受性ですが、SDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後15秒以内に消化されることが確認されました。b、人工腸液に対する感受性ですが、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6

時間経過しても消化されない結果となりました。続いて、c、加熱処理に対する感受性ですが、加熱による免疫反応性の変化について、ELISA法を用いて分析した結果、酵素失活条件であるpH4.0、80℃の加熱により1時間で相対結合能が加熱前の10％以下にまで低下する結果となりました。

続いて、既知のアレルゲンとの構造相同性でございます。TDDA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、既知アレルゲンと80アミノ酸配列で35％以上の相同性を示す配列及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされませんでした。

以上から、TDDAのアレルギー誘発の可能性は低いと考えられるとしております。

続きまして、3、4、5-（1）は記載のとおりでございます。

続いて（2）でございます。発現プラスミドpHYT2TDの全塩基配列について、6つの読み枠においてORF検索を行った結果、終止コドンから終止コドンで連続する30アミノ酸以上の目的以外のORFが84個見いだされ、これらのORFについてタンパク質データベースを用いてblastpによる相同性検索を行った結果、29個のORFに相同性が認められましたが、既知の毒性タンパク質との相同性は見られませんでした。また、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、80アミノ酸配列で35％以上の創造性を示すORF及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされませんでした。

（3）意図する挿入領域ですが、発現プラスミドの全塩基配列であり、宿主においてはプラスミドの状態で保持されます。

（4）は記載のとおりです。

続いて、6、DNAの導入方法ですが、発現プラスミドのプロトプラスト法により宿主に導入後、テトラサイクリン耐性及びカナマイシン感受性を示す形質転換体を選抜することによって生産菌株を得ております。

続いて、7でございますが、取り消し線を1か所引いてございまして、こちらは事前に○○○から御意見をいただいたものによる修正でございます。発現プラスミド上にアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子が存在し、*B. subtilis* NTI04（pHYT2TD）株のゲノムDNA上にクロラムフェニコール耐性遺伝子である*cat*遺伝子が存在します。アンピシリン耐性遺伝子は*B. subtilis*では発現しないとしております。テトラサイクリン耐性遺伝子がコードする膜タンパク質は、細胞内からテトラサイクリンを能動的に排出することで耐性を付与いたします。*cat*遺伝子はCATをコードし、アセチルCoAのアセチル基をクロラムフェニコールの水酸基へ転移させることで宿主にクロラムフェニコール耐性を付与いたします。これらの遺伝子産物の有害性に関する報告はございません。

続いて（2）遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項ですが、DDase-TDに含まれるテトラサイクリン耐性遺伝子産物及びクロラムフェニコール耐性遺伝子産物の含有量をELISA法で測定した結果、それぞれ0.125 μg/mL未満及び0.025 μg/mL未満ということで

ございました。

続いて、第5-（1）は記載のとおりです。

（2）でございますが、宿主ゲノムに導入された*cat*領域●●●、*cat*領域の上流及び下流のそれぞれ500 bpの合計●●●について、ORF検索を行った結果、23個検出されました。これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性を検索するために、タンパク質データベースを用いて*E*-value<10を指標にて検索した結果、既知の毒性タンパク質との相同性は認められませんでした。また、既知のアレルゲンとの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検索を行った結果、80アミノ酸配列で35%以上の相同性を示すORF及び連続する8アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされませんでした。

第6、製造原料等に関する事項は、記載のとおりでございます。

続いて、7-1、諸外国における認可状況ですが、DDase-TDは、海外での販売及び使用実績はございません。

続いて、第7-2、DDase-TDに生産菌の残存がないことを培養法により確認している旨、記載しております。

続いて、第7-3、4、5及び第8については、記載のとおりでございます。

評価書案の説明は以上でございます。

○○○　ありがとうございました。

それでは、本評価書案につきまして、御意見と御質問等ございますでしょうか。細かい字句の修正にお気づきになった場合は、後ほど事務局にお伝えいただければと思います。

では、よろしいでしょうか。ありがとうございます。

それでは、食品安全委員会に報告しまして、パブリックコメント等の手続を進めていきたいと思います。

それでは、早速2つ目、新規品目でありますJPAN004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。こちらも事務局から説明をお願いいたします。

○○○　御説明させていただきます。灰色の紙ファイルを御用意ください。JPAN004株を利用して生産されたα-アミラーゼの申請資料になります。

2ページ目を御覧ください。第1-1、従来の添加物に関する事項でございます。（1）、（2）は記載のとおりでございます。（3）用途はデンプンからデンプン糖を製造する際に加工助剤として用いられます。

3ページ目を御覧ください。（4）は記載のとおりでございます。22行目になります。第1-2-（1）宿主は*Aspergillus niger* BO-1株です。

（2）DNA供与体ですが、こちらは4ページの表1にまとめられております。*amyJA126PE096*遺伝子の供与体は*Rhizomucor pusillus* IFO2457株と*Aspergillus nigr* BO-1株、*amdS*遺伝子の供与体は*Aspergillus nidulans* Glasgow野生株、*pyrG*遺伝子の供与体は*Aspergillus nidulans* NRRL1092株になっています。そのほかにプロモーター、タ

ーミネーター、転写調整配列等については記載のとおりでございます。

5ページ目から（3）挿入DNAの性質及び導入方法になっております。図1を御覧ください。*pyrG*遺伝子を含む欠失導入用ベクターを用いて、●●●を欠失し、目的遺伝子及び*amdS*遺伝子を含む遺伝子発現カセットをインテグラーゼにより宿主ゲノムの●●●遺伝子座に挿入しております。この挿入により●●●遺伝子が欠失してございます。

続きまして、11ページ目を御覧ください。第1-3、1-4については記載のとおりでございます。

23行目から、第1-5、遺伝子組換え添加物の性質についてです。（1）有効成分はα-アミラーゼです。反応特異性は記載のとおりです。

（2）製造方法の概略は、次のページの図5に示してございますとおりになります。

（3）用途は既存のものと変わりません。有効成分の性質と従来添加物との比較です。既存のα-アミラーゼにはIFO2457株由来のものはありませんが、本添加物は既存のα-アミラーゼと同様にデンプンを分解します。

13ページ目を御覧ください。第1-6-（1）従来の添加物との相違点を表4にまとめております。アミノ酸残基数、推定分子量、生産菌が異なってございます。

14ページ目を御覧ください。（2）組換え体と宿主の相違点です。表5にあるとおり、JPAN004株には、*amyJA126PE096*遺伝子が複数コピー導入されており、α-アミラーゼの高生産性を獲得しています。また、*amdS*及び*pyrG*遺伝子を導入していることとα-アミラーゼの生産性を高めるために複数の遺伝子を欠失していることが相違点でございます。

次のページからの第2、第3、第4-1については記載のとおりでございます。

21ページ目を御覧ください。12行目からが第4-2-（1）挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法に関する事項でございます。*amyJA126PE096*遺伝子は、IFO2457株のゲノムDNAを鋳型としてPCR法によりα-アミラーゼをコードする遺伝子を獲得した後、位置特異的変異導入法によって変異を導入し、さらに●●●遺伝子のデンプン結合ドメインを付加して構築してございます。また、●●●されております。

*amdS*及び*pyrG*遺伝子については、記載のとおりでございます。

（2）は記載のとおりです。

続きまして、22ページ目の（3）を御覧ください。挿入遺伝子の機能についてでございます。まず、*amyJA126PE096*遺伝子ですが、この遺伝子がα-アミラーゼの活性を有するamyJA126PE096をコードしております。

14行目からの記載ですが、本添加物は、α-アミラーゼ活性ドメインとデンプン結合ドメインの2つで構成されてございます。α-アミラーゼ活性ドメインは熱安定性向上の目的で複数のアミノ酸が置換されており、デンプン結合ドメインは酵素活性向上の目的で付加されたものでございます。

続きまして、23ページ目からが安全性に関する事項でございます。1）、2）のとおり、挿入遺伝子の供与体及び遺伝子産物について、アレルギー誘発性に関する知見はありませ

んでした。

続きまして、18行目からが3）物理化学的処理に対する感受性になってございます。図8を御覧ください。人工胃液処理試験の結果です。SDS-PAGE分析で反応開始後30秒以内にバンドが消失し、分解されることが示されております。ウェスタンブロット分析では、本添加物の全長と考えられるバンドは反応開始後30秒以内に消失しましたが、消化断片と考えられる微弱なバンドは、反応開始後3時間でも検出されております。

次に、24ページの図9を御覧ください。人工腸液処理試験の結果です。両分析において6時間の処理においても完全に分解されないことが示されております。

続きまして、16行目からになりますが、加熱処理の結果になります。25ページの図10のとおり、90℃の処理によって完全に失活することが示されてございます。

続いて、4）遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見です。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、①80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として、真菌及びキノコ由来のアレルゲンが認められましたが、真菌由来のものは呼吸器感作性アレルゲンであり、また、キノコ由来のものはこれをアレルゲンとする論文報告が限られており、エピトープレベルの解析には至っていないということが記載されてございます。

この箇所につきまして、資料を皆様に事前に確認していただいた際に、アミラーゼなので、TAKAアミラーゼ等に相同性が出るのは理解できるが、念のため既存のアミラーゼと比較して相同性が高いのか低いのかについての考察を要旨に記載するようにと○○○から御意見をいただきまして、申請者にその記載を求めました。

本日の机上配付資料の2枚目、25ページとページ番号が入ったところを御覧ください。申請者のほうからは、こちらの黄色マーカーのとおり修正案が提出されておりますけれども、その修正案について○○○に御確認いただいたところ、少し書き方が回りくどくなってしまっているのではないかということで、修正案といたしまして、「Asp o 21は*Aspergillus oryzae*由来のTAKAアミラーゼであり、比較対象として既存のα-アミラーゼと同一である」と端的に記載したほうがいいのではないかという御意見をいただいておりますので、このように再修正するよう申請者に伝えたいと考えてございます。

続きまして、要旨に戻っていただきまして、26ページを御覧ください。②連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンの検索ですが、完全に一致するものは検出されてございません。

16行目からになりますが、人工胃液処理試験で消化断片と考えられる微弱なバンドが検出されていますが、本酵素はデンプン糖製造工程で失活及び除去されることから、食物アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられたと考察を記載してございます。

27ページの*amdS*及び*pyrG*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。

32ページを御覧ください。第4-5-（2）になります。最終的に構築された発現ベクターは、

*amyJA126PE096/amdS*遺伝子発現カセットのみを宿主ゲノムに挿入するための遺伝子導入用ベクターであり、遺伝子挿入により宿主に導入される領域が明らか、かつ、9行目の後半に記載されております遺伝子座のシークエンス解析により確認されていることから、発現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。

（3）、（4）は記載のとおりでございます。

続いて、33ページの第4-6、DNAの宿主への導入方法を御覧ください。宿主の標的遺伝子座にマーカー遺伝子発現カセットを挿入した後、遺伝子導入用ベクターを導入し、インテグラーゼの作用によりベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある*amyJA126PE096/amdS*遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入してございます。

続きまして、34ページ目を御覧ください。20行目から第4-7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項です。遺伝子導入用ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を持ちますが、宿主の染色体には導入されていないことがシークエンス解析により確認をされてございます。

続きまして、35ページからが第5です。第5-1は記載のとおりでございます。

14行目から第5-2-（1）になります。挿入領域の塩基配列はシークエンス解析により確かめられ、遺伝子発現カセットが目的の挿入領域にのみ挿入されていること及び目的遺伝子のコピー数が確認されております。

続きまして、40ページ目からが（2）ORFの有無についての記載になります。挿入DNAが組み込まれたそれぞれの遺伝子座及び相同組換えにより欠失した遺伝子の中でターミネーター断片が残存する遺伝子座において、27行目に記載された条件で検索を行った結果、33行目から記載されてございます遺伝子座で、計1,029個のORFが検出されてございます。これらのORFのアレルゲン及び毒性タンパク質の相同性検索を行った結果が41ページに記載されております。

まず、①の条件で検索を行った結果、真菌、キノコ、コナヒョウダニ由来のアレルゲンと相同性を示しました。真菌及びコナヒョウダニ由来のアレルゲンは呼吸器感作性のアレルゲンであり、キノコ由来のアレルゲンと相同性を示した領域は、遺伝子産物である本申請添加物が相同性を示した領域と同じです。さらに、これらORFと既知のアレルゲンとの間に連続した8アミノ酸の一致がないことから、食物アレルギーの懸念は低いとされてございます。また、（2）の条件で検索を行った結果、遺伝子導入により新たに生じたORFで相同性はありませんでした。

続いて、42ページが既知の毒性タンパク質との相同性検索の結果です。タンパク質データベースを用いてE-value<1.0×10^{-5}を指標として相同性検索を行った結果、相同性を示したORFはありませんでした。

続きまして、43ページからの第6は記載のとおりでございます。

続きまして、44ページ、第7-1、諸外国における認可の状況ですが、本製品は、欧州及び北米で販売されており、米国ではGRASの自己認証済み、フランスでは食品用加工助剤

のポジティブリストに収載されてございます。

続いて、45ページの第7-2でございますが、本製品中に組換え体由来のDNAが残存していないことをドットブロット解析により確認をしてございます。

46ページの第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ございます。

続きまして、47ページの第7-4になります。精製方法及びその効果に関する事項です。6行目にタンパク質の純度が高いことが確認されたとされていますが、提出資料では、分子量が●●●なバンドとして示されておりますことから、これらのバンドそれぞれについて要旨に説明を追記することを事前に求めてございます。

机上配付資料を御覧ください。最後の47ページと記載されたページになります。読み上げさせていただきます。「amyJA126PE096のアミノ酸数から推定される分子量は●●●kDaであるが、amyJA126PE096タンパク質は、●●●のバンドとして検出をされた。●●●kDa以上の高分子領域で認められたスメア状のバンドは、amyJA126PE096がグルコシル化した状態のもの、また、約●●●kDaのバンドは、amyJA126PE096のデンプン結合ドメインが取れた状態のものであると考えられた。したがって、これら●●●のバンドは全てamyJA126PE096由来のバンドであることから、試験バッチ中におけるamyJA126PE096のタンパク質純度は高いことが確認できたと」いう考察になってございます。

要旨に戻っていただきまして、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ございます。

説明は以上になります。

○○○　ありがとうございました。

それでは、申請書につきまして、専門委員の先生方から御意見いただきたいと思いますが、この株、まず、アミラーゼにデンプン結合ドメインがついていまして、アミラーゼを取った*Rhizomucor pusillus*、これは病原性の危なそうな感じもありますけれども、この株はキモシンを分離された株でして、チーズを固めるときに使うキモシン、従来ですと仔牛を殺さないと取れなかったのですけれども、仔牛を殺さないで何とかしたいというので、これを見つけたのは有馬先生です。日本の先生が一生懸命探しまして、それでこの*R. pusillus*から同じ基質特異性を持つ酵素をつくることを発見しまして、これで世界中の仔牛を救った男とまで言われた、そういう経緯のある株です。

アミラーゼにデンプン結合ドメイン、デンプンというのは基本は固体ですので、固体が水の中にふわふわ浮いているこの酵素と反応させますと、それがたまたま行き会ったときしか反応しませんので非常に反応性が低くて、そういうときにはデンプン結合ドメインがついているタンパクですと、そうすると常にそのアミラーゼがデンプンのところにいるので格段に活性が上がるというものです。だけれども、これは反応温度を高くしてデンプン

が溶ける温度で実験しているので、というか工業的に使われるようなので、こんな効くのかなとは思うのですけれども、本件では*Aspergillus niger*のデンプン結合ドメインを融合させたもので開発しております。

本件で最後のところ、精製方法とそれからSDS-PAGEのところで説明があったと思いますが、本日、問題になりそうなところも実はそこでして、皆さんお手元のCDもしくはiPadで資料2-18を開けていただけますでしょうか。ここに問題のSDS-PAGEのパターンが載っております。よろしいでしょうか。やはりこれを見ながらでないと、そもそも説明を聞いても何のこっちゃと分かりづらいと思いますので、このパターンを見ながら、まず何が見えているのかと、それから何が問題になのかを説明したいと思います。

これはバンドが幾つかあって、まず一番下にしゃきっとしたバンド、これが大体●●●kDa、それから、その上に少し薄いバンドがありまして、これが●●●ちょっと。それから、もっとずっと上にブロードで濃いバンドがありまして、これが●●●以上といっているバンドがございます。もともとこのタンパク質は分子量としては●●●とかそのくらいに行くはずなのかな。アミノ酸数から推定される分子量は●●●なのだけれども、実際は●●●kDa以上のところに、それも非常にブロードなバンドとして出ているという点。それから、本来●●●であるはずなのに、一番下にそれよりも明らかに小さい●●● kDaのところに明確なバンドが出ている。

それで、この酵素製剤で純度は●●●%以上であって、つまり、ここに見えているメジャーなバンドは全てこの標的の目的のタンパク質であると主張しているわけです。ほんまかいなということでして、まず、彼らの説明は、●●● kDa以上のところに出ているスメアなバンドは、このタンパク質がグリコシル化した状態のもの。つまり、糖鎖のおかげで●●● kDaよりずっと大きくなっていると主張しております。私はこれは大きさからいって二量体なのではないかと実は思ったりもするのですけれども。

それから、●●● kDaのバンド、これはデンプン結合ドメインが取れてしまってアミラーゼ本体だけになったものがこれぐらいになっているというふうに主張しております。デンプン結合ドメインが取れただけでこれだけこの差ができるのであったら、そのデンプン結合ドメインはめちゃくちゃ糖鎖がつくのではないかとも思えるわけでして、それについては、糖鎖がここにいっぱいつきやすいというようなことを予備の回答でいただいております。

この辺につきまして、何かいろいろと突っ込みどころがありそうな気がしますので、この点については申請者を直接お呼びして質問をぶつけまして、こちらの疑問を氷解したいと思います。この物そのものは既にアメリカ、フランスなどで問題なく発売されておるので、安全は安全なのだろうと思いますけれども、資料2-18にありますSDS-PAGEのこれでいいのかというところで、ここで納得がいけばいいのではないかなと。大体そんなふうにも考えております。

申請書につきまして、先生方から御意見を、これはページ数は多いですが全体そんなに

ポイントは多くないと思いますので、どこからでもお願いしたいと思います。

それから、この宿主は、*Aspergillus niger* BO-1株由来のこの株はこれまでにも何度も同じグループから宿主として出てきておりまして、宿主に関しては安全性の審査は既に済んでいると考えてよろしいかと思います。幾つか遺伝子が欠失しておりますが、これは●●●というものでして、この辺については何度も審査済みでございます。

これを発現カセット、かびの場合は発現カセットを染色体上に何コピーか入れますと、実はそのコピー数の効果が如実に効いてくるのがかびというものでございまして、そのために今回も●●●の遺伝子座に挿入しております。この挿入した結果がちゃんとカセットがきっちり入っているということは、これは次世代シークエンサーで完全延長が確認されておりますので、導入方法等は、これも今までに何回も紹介されておるものです。なので、議論すべき点は割と限られるようにも思います。

それから、通常であれば、*A. niger*の培養液をSDS-PAGEにかけますとまさに●●●kDaのところにぼんとアミラーゼのバンドが出るのですけれども、この株については●●●しておりますので、この株の場合には出ないと考えられます。

私のほうから議論する前に説明しておきたいことはこのくらいなのですが、先生方、どこでも結構です。御質問等ございますでしょうか。あと、○○○、私はこのくらいで、何か付け加えることはございますでしょうか。

○○○　もう座長の説明でほぼ網羅されていると思います。ポイントは本当にSDS-PAGEのバンドぐらいかなと私も思っておりますので、どうぞよろしくお願いします。

以上です。

○○○　ありがとうございます。

それでは、先生方、人工胃液、人工腸液のところ。人工腸液では6時間でも残るとか、加熱のデータ等が出ておりますが、○○○、これは大体こんなものでよろしいでしょうか。

○○○　ウェスタンブロットで少し人工胃液で残るのですけれども、量的には少ないので、量的なところからいえばそれほど大きい問題ではないかと思うのですけれども、1つウェスタンで気になるのは、ここで●●●という抗体を用いているので、抗体をつくるときに製剤で抗体をつくったのかと思うのですけれども、そうするとそこの中にほかタンパクがあっても見られてしまうのではないかという気がして、そこでこの酵素をより精製したようなものがあって、それに対する抗体をつくって、それでウェスタンをしているとかいうようなことがないかどうか。あればよりいいのですけれども、抗体を製剤でつくっているというのが少し気にはなります。

○○○　この抗体は普通のアミラーゼではなくてちゃんとデンプン結合ドメインもついた形でつくっていると彼らからの回答はいただいています。だけれども、それをちゃんと精製して資料2-18にあるように、これよりもちゃんともっときれいにしたものでつくったのかどうか、それは○○○、直接お聞きになってください。

○○○　分かりました。

人工胃液に関しては若干残るのですけれども、量的な形では何とか許されるぐらいかと思うのですけれども、いずれにしましても複数のバンドが見えるということで、糖鎖がついているとかいうのですけれども、証拠になるところが書かれていないので、やはりその辺り、何か根拠になるようなデータを出してほしいと思います。

○○○　ありがとうございます。

ほかにございますでしょうか。

○○○　まず今のところに関係していることとして、追加的な質問があります。●●●kDaのバンドはデンプン結合ドメインが取れた状態ということですが、このデンプン結合ドメインってタンパク質なのでしょうか。そうではなくてやはり糖鎖なのでしょうか。

というのは、社内文書17には●●●ですが、その中で●●●について、この文書の14ページ目の、●●● とあるのですが、この結果からの考察かなと思ったりするのだけれども、詳細な結果がよく分かりません。その辺でどういう結果から考察したのか疑問に思っています。今回のこの製品に関してはここがキーになるので聞いてみたいと思っています。

○○○　それは先生のほうから直接聞いてください。私もいろいろ聞こうかと思っているのですけれども、それは本当か、ちゃんと答えてほしいと、こう言っていただければと思います。

ほかに先生方、どうぞ。

○○○　これは形式の問題かもしれないのですけれども、1つここの食安委での評価とダイレクトに関係しないかもしれないのだけれども、安全性審査資料の3ページ目の摂取量のところに「α-アミラーゼの典型的な添加量はデンプン1ｔ当たり0.55kg」と書いてあって、その後、「この製品中のこのタンパク質の重量比率は1%TOSである」となっています。この点について社内文書2を見ると、●●●。この製品はα-アミラーゼ製品となっていますがどういうことなのか？という疑問があります。今回の評価対象であるα-アミラーゼは製品としてはこの製品のみなのでしょうか？。安全性審査資料の12ページの図5の製品製造の概略の題は「amyJA126PE096製品製造の概略」というふうになっていますが、では、●●●は何なのか？。あるいはこれはamyJA126PE096の製造の概略であってamyJA126PE096製品の製造にはこの先の工程があるのか？。いずれにしても、これは今回の安全性評価において評価する対象物が何なのかということにも関係しますので、確認してみたいなと思っています。

○○○　そこも直接お願いできますか。私はそこは実はあまり気にならなかったので、先生のほうからお願いします。

○○○　ここの調査会では気にならないんじゃないかなと思います。ただ、厚労省側かもしれないけれども、管理の問題を考えたときにこれって大きな問題です。

○○○　勉強になりましたので、よろしくお願いいたします。

ほかに先生方。

では、問題点はほぼ絞られたようにも思います。その場で何か思い付いたらでもよろし

いので、直接この申請者と早くディスカッションしたほうがいいように思いますので、申請者を呼んでいただけますでしょうか。

（申請者入室）

○○○　お忙しいところ、待機していただき、ありがとうございます。

自己紹介をお願いいたします。会社名とお名前だけで結構です。

○○○　ノボザイムズジャパンの○○○と申します。よろしくお願いいたします。

○○○　同じくノボザイムズジャパンの○○○と申します。よろしくお願いいたします。

○○○　ありがとうございます。

それでは、摂取量に関すること、○○○、まずそこからお願いできますか。

○○○　確認させていただきたいというほどのことではないのですけれども、ちょっと御教示いただきたいことと、あと、どういうことで書き分けているかということに関して確認させていただきたいことがあるのです。1つは、この製品と言っていいか分からないのだけれども、この酵素添加物に関して、どうも書き分けとしては、製品と書くとほかのものをいっぱい入れた製品のことを書いているのかなと読んだのですけれども、社内文書2で、結局これで製品と出しているときに、●●●なのだと書いてあって、社内文書2で取り上げている●●●だと思うのですけれども、1つは、今のところ製品はこれだけなのかということと、●●●こういう形で実際に使うのだろうか。α-アミラーゼだったらこれを使えばいいのではないかと思わないわけでもないのだけれども、その辺の基本的なことを教えていただきたい。

それから、提出していただいた安全性審査資料の12ページの図5はamyJA126PE096製品製造の概略となっているのですけれども、これには結局、●●●、それとも実はこれはamyJA126PE096製造の概略図なのだということなのか、その辺りを御説明いただければと思います。

○○○　まず最初の御質問の社内文書2にあります●●●ですけれども、この申請に関しましては、遺伝子組換えのJPAN004株から生産されるα-アミラーゼということで申請はしているのですけれども、●●●になります。

ちょっとそこら辺を詳しくは要旨のほうでは書いていなかったのですけれども、今のところ製品として上市されるようなものはこの製品ということで書いています。つまり、●●●の中で使われるものが現実的には上市される予定です。

○○○　では、これでごっそり入っている、●●●ですかね。これは既に日本では使っていいものなわけですね。

○○○　はい。このほかに入っています●●●と思うのですけれども、●●●となっています。ただ、この1つだけですね。α-アミラーゼのみ安全性審査を経ておりませんので、この製品を上市するためには、このα-アミラーゼの安全性審査を経る必要があるというところで申請をさせていただいております。

○○○　安全性審査とは関係ないことで恐縮なのですけれども、これはやはり実際にこの

目的で使うときは混ざって使うのがいいわけですね。
○○○　そうですね。ちょっとそこら辺は、●●●これはいわゆるデンプン糖製造に用いられるわけですけれども、例えば使われる用途のところでも、この図では描いてありませんけれども、糖化工程とかに使われるのですが、液化、糖化というデンプン糖をつくる工程でこの製品を入れると、基本的には耐熱性が高い酵素が多いので、そのまま複数の工程にわたって、最初の液化、糖化の工程で働いて、効率よくデンプン糖の製造ができるようになるという形になっています。
○○○　細かなことで恐縮なのですけれども、審査資料の43ページにこのものの製剤と書いてあるのだけれども、製剤と製品を書いてないものの選り分けというのはちゃんと考えて資料はつくっていますね。
　僕は、この資料だけ読んでいるとあまり問題に感じていないのですけれども、実は審査報告案、評価書がちょっとごっちゃになっているのですね。御覧になっていないでしょうけれども、だから、ちょっとその辺は、製剤というのはこの場合はどれのことを言っていますか。
○○○　製剤というのは最終的な製品になると思います。ただ、添加物とかほかの製品等も含めたものになると。
○○○　では、そのほかのものを沢山入れたものも製剤の一つ。
○○○　そうですね。基本的には。
○○○　分かりました。こういう考えで使っているということは分かりました。
○○○　1点御説明させていただきますと、●●●で書かせていただいているところです。
○○○　ありがとうございます。
○○○　それでは、申請書の23ページ、24ページ、人工胃液、人工腸液のところで、ウェスタンでもバンドが幾つも見えておるのですが、抗体をどうやってつくったかの話なのだけれども、この酵素はこの製剤よりももっときっちり精製したもので純品と確認できるものを使ってこの抗体をつくっておるものなのでしょうか。それとも、多少の不純物の混ざった製剤でつくっておるのか。抗体をつくる基になったものについてお聞きしたいのですが。
○○○　このいただいた御質問は以前ほかの品目でも聞かれたことがあるかと思います。実際は純品、このα-アミラーゼだけに対して反応する抗体ではありませんで、試験バッチというものを直接ウサギに注入して、出てきた血清を基につくっている抗体ですので、基本的に試験バッチで発現しているタンパク全てに反応するというような抗体になっています。
○○○　ということは、必ずしもアミラーゼではないものにも反応し得るということでいいのかな。
○○○　そうですね。一番安全マージンというか、この酵素製品自体、いろいろなタンパクが混ざっているところがありますので、弊社ではそのようにつくっております。

○○○　ありがとうございました。
　○○○、よろしいですか。
○○○　そうすると、例えば人工胃液の中で●●● kDaぐらいが少し残るのですけれども、これが酵素の残りなのか不純物なのかというのは正確には分からないということですかね。
○○○　まさにおっしゃるとおりでして、これが本当にα-アミラーゼの消化断片なのかというのは、はっきりとはこのデータでは断定できないところです。ただ、SDS-PAGEのほうでは基本的にしっかり切れているところ、消化されているということは確認できているのでというところで説明させていただいております。
○○○　抗体もペプチド抗体を使うとか工夫すればできるかとは思うのですけれども、切る場合は分からないということですね。
○○○　まさにおっしゃるとおり、そこはなかなか難しいところであります。
○○○　それでは、本日の本命の質問なのですが、添付資料2の18にあるSDS-PAGEのパターンについてお聞きしたいと思います。純度は●●●％以上ということは、このSDS-PAGEのバンドで見えている●●●ということになりますね。御説明ですと、そうすると一番下の●●●kDaのバンドはアミラーゼの本体だけでデンプン結合ドメインが取れたもの。上のほうにある幅広の一番濃いバンドが糖鎖がいっぱいついた製品のアミラーゼのバンドということで、まず1つは、そんなに簡単にデンプン結合ドメインは取れるものですか。
○○○　これは社内でも様々な実験とか試験をやっておったのですけれども、簡単に取れないことはないと思います。これがいわゆる酵素活性の重要なところに関わってきますので、弊社内ではかなり調べたのですけれども、やはり取れてしまうということはあるというところです。簡単に取れるかというと、どの程度を簡単に取れるというかというところがあると思うのですけれども、取れていることはまず間違いなく取れているだろうというのは確認できています。どれくらい簡単かというところはちょっと、今はっきりとは申し上げられないところであります。
○○○　つまり、ペプチド結合が切断されたものということですね。α-アミラーゼとデンプン結合ドメインの間には通常はふにゃふにゃのリンカーがあるもので、リンカーがないとデンプンに結合してα-アミラーゼは働けないので、通常そこが弱点になるから、切りやすいというのは私も理解できないわけではないかなと思うのだけれども、●●●kDaのバンドが製品のα-アミラーゼに由来するということは確認しておられるのですか。
○○○　●●● kDaのところはα-アミラーゼ、要旨のほうにも書かせていただいておりますけれども、●●● kDa以上の高分子領域にあるものが糖鎖がついたα-アミラーゼとスターチバインディングドメインがグリコシル化したもので、大体その●●● kDaある薄いものが糖鎖がついていないα-アミラーゼとスターチバインディングドメインであろうということです。●●● kDaのものに関しましては、これはデンプン結合ドメインが切れたα-アミラーゼだけのバンドであるというふうに、その可能性が高いという形で社内のデータ

は示しております。
○○○　その社内のデータというのは、MS解析なりで確認されたのですか。ウェスタンブロットなり何なり。口頭で結構なのだけれども、どのような手法を用いて●●● kDa、●●● kDa、●●● kDa超のそれぞれのバンドについて帰属を明らかにしたのか。口頭で結構ですけれども、どうやって確認したのか御説明いただけますか。
○○○　SDS-PAGEに流しまして、ゲルを切り出した後に消化酵素で分解してそれを液クロとタンデム質量分析にかけまして、ペプチド配列を決定して、それらは全てこのamyJA126PE096の配列であるということを確認しております。
○○○　そういうデータをきっちりお持ちなのですね。
　それから、●●● kDaのものがデンプン結合ドメイン。デンプン結合ドメインはアミノ酸の数としては●●●とかそのくらいだけれども、それが切れただけでこんなに分子量が変わってしまうということは、この部分が全部糖鎖という説明をされているのですけれども、糖鎖の部分がペプチド部分の3～4倍の分子量があるということになりますけれども、それでよろしいのですか。
○○○　まさにここら辺も参考資料17に、かなり似たデンプン結合ドメインについて説明がされている参考資料ですけれども、やはりリンカーとデンプン結合ドメインを結合型糖鎖が非常に多くつく。特につくということで、SDS-PAGEの質量にも影響を与えるというような形で報告がされていまして、社内でいろいろ試験等をやって検討した結果、やはりリンカーとデンプン結合ドメインのところにかなり多くの糖鎖がついていて、今、α-アミラーゼのほうというよりは完全にリンカーと結合ドメインのほうに多くくっついて、それが取れたらもう本当に●●●kDaという形になってしまうということで結果が見られると思います。
　したがって､御質問のところで言いますと､結合ドメインのほうに全部ついているのか、それでこんなに糖鎖の違い、分子量の違いがあるのでしょうかというところで言うと、そうである可能性が非常に高いと回答させていただきたいと思います。
○○○　なるほど。菌類でつくこの糖鎖はアスパラギンにつくN-結合糖鎖とセリンとスレオニンにつくO-結合糖鎖、あとGPIアンカーと3種類しか知られていなくて、N-結合糖鎖は●●●なので、可能性があるとしたらO-結合糖鎖だけなのだけれども、●●●、それはちょっと難しいのかな。
　だけれども、文献とか、実験的にある程度このデンプン結合ドメインに山ほど糖鎖がついているというのを確認なり強く示唆するような実験結果は何かお持ちですか。
○○○　いろいろ社内の研究結果、これは研究員と話し合っていろいろ確認した結果なのですけれども、まさにそうであるというふうな示唆するデータが研究の中で得られているということでした。ですので、今回の専門調査会でもそういうふうに言っているところです。
○○○　ありがとうございます。

○○○、追加で御質問ございますか。
○○○　今の御説明だと、アミラーゼ本体には糖鎖はほとんどくっついていなくて、デンプン結合ドメインとリンカーの部分に結構くっついていますよということなので、一応それを補足するようなデータを参考資料みたいな形でお示しいただくことはできますかね。
○○○　いろいろ社内のほうで検討させていただきまして、それを示唆するというか、サポートするような情報、データ等を提出させていただきます。
○○○　では、そこをよろしくお願いいたします。推定の分子量よりもいっぱい糖鎖で太っているというのは炭素と窒素と水素の割合を見るとか、そんなのでも結構推定ができるのかなと。いろいろな推定の仕方があろうかと思いますけれども、社内でいろいろ検討されているということであれば、その中で出しても差し支えないデータでお示しいただければと思います。では、その点よろしくお願いいたします。
先生方、ほかに何かございますでしょうか。○○○、どうぞ。
○○○　すみません。お願いいたします。46ページの表12に試験バッチの分析値が出ているのですけれども、これの生データの部分は社内文書17のほうに載っているようなのですけれども、試験バッチの●●●というのが社内文書17の6ページによりますと●●●というふうに書いてあるようなのですが、それは間違いないのでしょうか。私の読み違いでしょうか。
○○○　社内文書17ですか。
○○○　はい。17の6ページの2.2、●●●と書いてあるので、この●●●。
○○○　そういうことになります。試験バッチというのはいわゆる毒性試験に供試するためにつくるバッチでして、ほかのものに比べて、もちろん発酵後に添加剤等をなるべく含まないような形でつくっているものになります。どれを試験バッチにするかというのはいろいろ勘案して決められるのですけれども、この●●●としたということだと思います。
○○○　社内文書17の11ページ目に6.2で微生物分析の結果が出ているのですけれども、試験バッチが●●●で、ほかのものは入っていないのですよね。
○○○　そうですね。
○○○　一番上に●●●があるのですけれども、●●●感じで、どうしてこういうふうになるのだろうなとちょっと思ったのです。
○○○　ちょっと一回社内で確認させていただきたいのですけれども、試験の条件下とかがこれは全部同じ時期にやられたのかというのも確認しなければいけませんので、ちょっと社内で確認させてください。
○○○　あともう一つ、●●●ものがありますけれども、●●●ではないかなと思いました。確認をしていただければと思いました。
○○○　確認させていただきます。
○○○　ほかの先生方、御質問等ございますでしょうか。よろしいですか。
では、お疲れさまでした。

○○○　ありがとうございました。失礼します。

（申請者退室）

○○○　それでは、議論を再開したいと思います。

まず、●●●の件は、これはそれぞれ普通そんなに素直に足し算の結果にはならないかなとも思うのだけれども、彼らはそこを調べて回答してくるということなので、●●●で実際の製剤をつくっているとは思えないので、そのままきれいに足し算したとおりにはならないかなとも思うのだけれども、検討しましょう。

それから、SDS-PAGEのこれでそれぞれのバンドがちゃんと本来のアミラーゼに由来しているかどうか。これを裏付けるデータを出していただけるということなので、それを確認するということになりますけれども、それ以外の点で本件について質問、疑義等ございますでしょうか。

それでは、この件については後ほど彼らから割と単純に回答が得られると思いますので、それが前提にはなりますけれども、本件については既に欧米で売られていることもありますし、安全性には特に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。

（同意する委員あり）

○○○　では、後ほどこの2点の宿題については、彼らから資料が来たところで確認させていただくということにはなりますが、先に評価書案について検討したいと思います。事務局からよろしくお願いいたします。

○○○　それでは、評価書案について御説明をさせていただきます。右上に資料と記載した評価書案の束の資料をお手元に御準備ください。18ページ目からがJPAN004株のアミラーゼに関する評価書案になります。

23ページ目を御覧ください。「Ⅰ．評価対象添加物の概要」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。1-1-（1）名称はα-アミラーゼ、（2）製造方法は培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造され、生菌はろ過により除去されます。（3）用途及び使用形態ですが、デンプン糖製造において主に液化の工程で原料のデンプンをデキストリンまで分解する加工助剤として使用されます。（4）は記載のとおりでございます。

2-（1）でございます。宿主は*Aspergillus niger* BO-1株です。（2）DNA供与体の種名です。*amyJA126PE096*遺伝子は、*Rhizomucor pusillus* IFO2457株と*A. niger* BO-1株。*amdS*遺伝子及び*pyrG*遺伝子の供与体は記載のとおりでございます。（3）挿入DNAの性質です。*amyJA126PE096*遺伝子は、α-アミラーゼをコードし、*amdS*遺伝子は選択マーカーとして使用されます。

3の食経験等は記載のとおりでございます。

4の宿主の構成成分ですが、*A. niger*は、オクラトキシンA及びフモニシンを産生する可

能性があるが、BO-1株からオクラトキシンA及びフモニシンが産生されないことは分析により確認をされています。

5、遺伝子組換え添加物の性質は記載のとおりです。

6-（1）amyJA126PE096と従来のα-アミラーゼとの相違点は、生産菌、アミノ酸残基数及び分子量が異なる点です。

（2）JPAN004株と宿主との相違点は、JPAN004株には*amyJA126PE096*遺伝子が複数コピー導入され、α-アミラーゼの高生産性を獲得している点、*amdS*及び*pyrG*遺伝子を導入している点、並びにα-アミラーゼの生産性を高めるため複数の遺伝子を欠失している点です。

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をしてございます。

第2、宿主に関する事項、第3、ベクターに関する事項は、記載のとおりでございます。

27ページ、第4でございます。1は記載のとおりでございます。

2-（1）クローニングまたは合成方法です。IFO2457株のゲノムDNAを鋳型として、PCR法によりα-アミラーゼをコードする遺伝子を得た後、位置特異的変異導入法によって変異を導入しています。さらに、BO-1株ゲノムより得たグルコアミラーゼのデンプン結合ドメイン配列を付加して目的遺伝子を構築しております。BO-1株由来のα-アミラーゼ遺伝子の分泌シグナル配列が付加されております。*amdS*及び*pyrG*遺伝子はPCR法により得られています。

（2）につきまし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。まず①*amyJA126PE096*遺伝子です。当該遺伝子がコードするamyJA126PE096は、デンプンのα-1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、α-アミラーゼ活性ドメイン及びデンプン結合ドメインより構成されています。α-アミラーゼ活性ドメインは熱安定性向上の目的で複数のアミノ酸が置換されており、デンプン結合ドメインは酵素活性の向上を目的に付加されています。

続いて、a、供与体である*Rhizomucor pusillus*のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、それを示唆する報告はございませんでした。

b、遺伝子産物を有効成分とする酵素製剤についても、アレルギー誘発性を示唆する報告はございません。

c、物理化学的処理に関する事項です。（a）で人工胃液中で消化性を調べる目的でSDS-PAGE分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、SDS-PAGE分析において試験開始後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います。

ウェスタンブロット分析では、遺伝子産物の全長と考えられるバンドは試験開始後30秒以内に消失しましたが、消化断片と考えらえる微弱なバンドは試験開始後3時間まで検出されました。

次に（b）人工腸液です。こちらについては、両分析の結果、6時間でも分解されないこ

とが示されたとしています。

続いて（c）加熱処理ですが、pH5.5で90℃・30分の処理で失活することが示されております。

d、既知のアレルゲンとの構造相同性です。遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるために、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アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、真菌及びキノコ由来のアレルギーが認められましたが、いずれも安全性に影響を有する可能性は低いと考えられ、連続する8アミノ酸が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかったとしています。

（2）*amdS*遺伝子、（3）*pyrG*遺伝子については記載のとおりです。

30ページの336行目からですが、申請添加物の人工胃液処理試験において消化断片と考えられる微弱なバンドが検出されたが、当該酵素はデンプン糖製造工程で失活、除去されることから、当該酵素等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としています。

3、4、5の（1）、（2）は記載のとおりでございます。

5-（3）388行目になります。意図する挿入領域は遺伝子導入用ベクターのFRT-F配列からFRT-F3までの遺伝子発現カセットを含む領域でございます。(4) は記載のとおりです。

続いて、6、導入方法に関する事項です。宿主の標的遺伝子座にあらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した後、遺伝子導入用ベクターを導入し、インテグラーゼの作用によりベクター上のインテグラーゼ認識配列間にある目的遺伝子発現カセットを宿主ゲノムに挿入しています。この際、*amdS*遺伝子による選抜を行った後、本添加物の生産性を指標として形質転換体を選択しています。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性についてですが、遺伝子導入用ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を持っていますが、宿主の染色体には導入されていないことをシークエンス解析により確認しています。

32ページ、409行目からが第5です。1は記載のとおりです。

2-（1）ですが、JPAN004株の各標的遺伝子座への目的遺伝子発現カセットの導入を調べる目的でシークエンス解析を行った結果、設計どお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ており、挿入領域近傍の塩基配列及び制限酵素による切断地図も明らかになっています。

（2）ORFの有無です。挿入DNAの結合部位及び相同組換えの異種遺伝子断片が残存する遺伝子座においてORF検索を行った結果、合計で1,029個検出されております。これらのORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するため、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アミノ酸で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、真菌、キノコ及びコナヒョウダニ由来のアレルゲンが検出されましたが、いずれも安全性に影響を有する可能性は低いと考えられたとしています。

また、連続する8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンが宿主の染色体塩基配列から得られたORFに検出されましたが、遺伝子導入により新たに生じたもので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、E-value<1.0×10^{-5}を指標として相同性検索を行った結果、相同性を示したORFはありませんでした。

第6については記載のとおりでございます。

第7-1、諸外国における状況です。本添加物の製品は、欧州、北米を中心に販売されており、フランスではポジティブリストに掲載され、米国ではGRASとして認証されています。

第7-2、ドットブロット解析により、本添加物製剤中に組み換えDNAの残存がないことが確認をされております。

第7-3、第7-4、第7-5については、記載のとおりでございます。

評価書案の説明は以上でございます。

○○○　ありがとうございました。

それでは、評価書案につきまして、御意見、御指摘等ございますでしょうか。細かい字句等にお気づきでしたら、後ほど事務局までお伝えいただければと思います。

○○○　今の議論を踏まえまして、評価書案のライン301とライン336にウェスタンブロット分析の全長バンドよりも短いバンドについて、消化断片と考えられると書いてあるのですが、この書き方は違うほうがよろしいでしょうか。よろしくお願いします。

○○○　あえて触れなくてもいいかと思います。

○○○　消化断片とここには書いてあるのだっけ。

○○○　ええ。今、評価書には消化断片と299行目に書いてあるのですけれども、ここは消化断片ということを触れなくてもいいのかと思うのです。

○○○　僕もそれに賛成です。

○○○　ありがとうございます。先ほどの申請者からの説明でも、はっきりと消化断片とは言えないという説明がありましたので、その説明を踏まえて、こちらは消化断片という記載を修正するように事務局で対応させていただきます。

○○○　○○○、ありがとうございました。

ほかにお気づきの点等ございますでしょうか。○○○、どうぞ。

○○○　1個確認させていただきたいのですけれども、2（3）bで文献検索を行ったと書いてあるところにPubMed検索と書いてあるのですけれども、こういう場合はPubMedに掲載されている論文だけで確認するのでよしとされているのでしょうか。PubMedに載っていない論文も数多くあるように感じまして、ちょっと御教示いただければと思います。

○○○　まずPubMedは最大なので、取りあえずPubMedはちゃんと見てくださいよということであって、それをやっていれば最小限の注意義務は果たしたと普通は見ます。

あとそれ以外にこの業界で、業界的にはこれを知らないともぐりだよねというようなものが抜けていたら、それはそれでまた問題になりますけれども、取りあえずこれで私は気に

はなからなかったです。
○○○　かしこまりました。業界によってはPubMedに掲載されないようなジャーナルも多かったりすると思いまして、ちょっと気になったので御確認させていただきました。
　以上です。
○○○　あらゆる論文を全部見ろとも言えないことがありますので、メジャーな文献検索エンジンを見ていただければ、まあいいかなというふうに、少なくとも最小限の注意義務は果たしているかなと考えるのです。あとは個別の案件について、そちらをキーワードにしてこの文献を調べていただいて、それで抜けると困るのですけれども、その辺のところかなと思います。
○○○　ありがとうございます。
○○○　事務局からどうぞ。
○○○　たびたび事務局からすみません。本評価書案の中で、先ほど○○○から意見がありました製品と製剤という言葉が混在してございます。製品と製剤のところは事務局のほうで再度確認をさせていただいて、事実に合った正しい書き方に修正させていただきたいと思います。
○○○　そこはよろしくお願いします。基本的には一緒だということだったので、この文書を評価書案として見たときに矛盾があったりとか、同じ言葉が違う使われ方をしていない、そこだけお気遣いいただければと思います。
　先生方、ほかにございますでしょうか。よろしいでしょうか。
　それでは、いただきました修正については、事務局で修正して、私と関係する先生のほうで確認した後に食品安全委員会に報告し、パブリックコメント等の手続に入りたいと思います。また、この点、今回は宿題が残っていまして、申請者のほうからの回答が来たところでチェックさせていただこうかと思っております。
　議題（1）については終わりたいと思います。
　議題（2）その他ですが、事務局からございますでしょうか。
○○○　特にございません。
○○○　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。
　皆様、お疲れさまでした。いろいろありましたけれども、2021年の調査会はこれで終了でございます。先生方、よいお年をお迎えください。本気で来年はもっといい年だといいよねと思います。
　それでは、これで終わりたいと思います。お疲れさまでした。