

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 JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼに係る食品健康影響評価（令和 5 年 8 月 22 日付け厚生労働省発生食 0822 第 4 号）については、令和 5 年 9 月 20 日に開催された第 240 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. JPAo006 株を利用して生産されたリパ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 5 年 11 月 28 日（火）開催の食品安全委員会（第 922 回会合）の翌日の令和 5 年 11 月 29 日（水）から令和 5 年 12 月 28 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

JPAo006 株を利用して生産された
リパーゼ

令和5年（2023年）11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
I. 評価対象添加物の概要.....	5
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 of 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遺伝子を含む。）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.....	12
5. 構築された発現ベクターに関する事項.....	12
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	13
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項.....	13
第5. 組換え体に関する事項.....	13
1. 宿主との差異に関する事項.....	13
2. 遺伝子導入に関する事項.....	13

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.....	14
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.....	14
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.....	14
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	14
2. 組換え体の残存に関する事項.....	14
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項.....	14
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事項.....	15
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	15
<参照>.....	16

<審議の経緯>

- 2023年8月22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0822第4号）、関係書類の接受
- 2023年8月29日 第911回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2023年9月20日 第240回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2023年11月28日 第922回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

- 山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
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>

- | 2023年9月30日まで | | 2023年10月1日から | |
|--------------|--------|--------------|--------|
| 中島 春紫（座長） | | 児玉 浩明（座長） | |
| 山川 隆（座長代理） | | 佐々木 伸大（座長代理） | |
| 安達 玲子 | 佐々木 伸大 | 伊藤 政博 | 柴田 識人 |
| 岡田 由美子 | 近藤 一成 | 岡田 由美子 | 手島 玲子 |
| 小野 道之 | 樋口 恭子 | 小野 道之 | 樋口 恭子 |
| 小野 竜一 | 藤原 すみれ | 小野 竜一 | 藤原 すみれ |

<第240回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

- 児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

要 約

「JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼ」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 oryzae* IFO4177 株を宿主とし、*Thermomyces lanuginosus* CBS586.94 株及び *Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のリパーゼ遺伝子のハイブリッド遺伝子を導入することで作製した JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、トリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素であり、製パンに使用される。本添加物はトリアシルグリセロールだけでなく、小麦粉に含まれるリン脂質やガラクト脂質といった極性脂質のエステル結合も加水分解して乳化作用を有する生成物を遊離し、パン生地の安定性向上に寄与する。

「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及び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、「JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼ」については、人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：JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼ
用途：製パンにおける生地強度等の付加
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 oryzae* IFO4177 株を宿主とし、*Thermomyces lanuginosus* CBS586.94 株及び *Fusarium oxysporum* DSM2672 株由来のリパーゼ遺伝子のハイブリッド遺伝子を導入することで作製した JPAo006 株を利用して生産されたリパーゼである。本添加物は、トリアシルグリセロールのエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させる酵素であり、製パン工程に使用される。本添加物はトリアシルグリセロールだけでなく、小麦粉に含まれるリン脂質やガラクト脂質といった極性脂質のエステル結合も加水分解して乳化作用を有する生成物を遊離し、パン生地の安定性向上に寄与する。

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：リパーゼ (lipHL1232 製品)^a
生産菌：*Aspergillus oryzae* JPAo001 株
有効成分：リパーゼ
EC No.：EC 3.1.1.3
CAS No.：9001-62-1

(2) 製造方法

lipHL1232 製品は、培養工程、ろ過等の工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

lipHL1232 製品は、パンの製造工程において乳化剤の代替として直接パン生地に添加され、パン生地の強度及び弾性の付加を目的として使用される（参照 1）。

(4) 摂取量

lipHL1232 製品が全てのパン類に含まれ、最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.0018 mg TOS/kg 体重/日である（参照 2、

^a JPAo001 株を利用して生産されたリパーゼ（平成 29 年 7 月 4 日食品安全委員会決定）

3)。

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. oryzae* IFO4177 株である。*A. oryzae* IFO4177 株は、清酒麹から分離された野生株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

リパーゼ (*lipHL2120*) 遺伝子は 2 つのリパーゼ遺伝子のハイブリッドであり、その供与体は、*T. lanuginosus* CBS586.94 株及び *F. oxysporum* DSM2672 株である。*amdS* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株、*URA3* 遺伝子の供与体は、*Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

lipHL2120 遺伝子は、リパーゼ (*lipHL2120*) をコードする。*amdS* 遺伝子はアセトアミダーゼをコードし、*URA3* 遺伝子はオロチジン 5' -リン酸デカルボキシラーゼをコードし、選択マーカーに用いた。

A. oryzae IFO4177 株に、*lipHL2120* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を含む遺伝子導入用ベクター (pJPV028) をプロトプラスト法により宿主のゲノム DNA に導入した。さらに、作製過程で γ 線照射による *cpa* 遺伝子クラスター及び *afl* 遺伝子クラスターの欠失により、シクロピアゾン酸及びアフラトキシンの生産能が欠失している (参照 4)。

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. oryzae は、食品製造用酵素の製造に長年安全に利用されている (参照 5)。国内では、*A. oryzae* は、麹菌として味噌、醤油、醸造酒などの発酵食品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. oryzae においては、アフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、シクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を産生する株の報告がある (参照 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

(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：lipHL2120

有効成分：リパーゼ

EC No.：EC 3.1.1.3

CAS No.：9001-62-1

(2) 製造方法

lipHL2120 は、JPAo006 株を生産菌として、培養工程、ろ過等の製造工程を経た上で、製剤化される。生産菌は、ろ過等の精製工程を経て除去される。

(3) 用途及び使用形態

lipHL2120 の用途及び使用形態は、既存のリパーゼと変わらない。lipHL2120 は、乳化剤の代替として製パン工程で使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来への添加物との比較

lipHL2120 は、既存のリパーゼである lipHL1232 と同様に、トリアシルグリセロールの 1 及び 3 位のエステル結合を加水分解して脂肪酸を遊離させることに加え、リン脂質のエステル結合も加水分解する。

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へ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への添加物

lipHL2120 と従来への lipHL1232 との相違点は、アミノ酸残基数、至適温度及び至適 pH である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo006 株と宿主との相違点は、JPAo006 株には *lipHL2120* 遺伝子が複数コピー導入され lipHL2120 の高産生性を獲得している点、並びに *amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子を導入している点である。

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へ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. oryzae* IFO4177 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. oryzae は、一般的に非病原性であり（参照 7）、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（以下「BSL」という。）1 に相当する（参照 8）。また、*A. oryzae* IFO4177 株は、シクロピアゾン酸及びコウジ酸については極めて低値ではあるが、その産生が確認され、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンは検出限界未満であることが確認された（参照 6）。

A. oryzae 由来の酵素であるアルカリ性セリンプロテアーゼ及び TAKA アミラーゼは、アレルゲンデータベース（参照 9）に記載されており、いずれも呼吸器

系感作が報告されているが、これは特定職種での高頻度ばく露が起因と考えられる。*A. oryzae* IFO4177 株は食品添加物の生産菌として長年使用され、安全性に問題を生じる事例は報告されておらず、アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられる。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

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. oryzae 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. oryzae の近縁種である *A. fumigatus* は、日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。また、*A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生することが知られている。

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 pJPV028 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pUC19 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 pUC19 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 pUC19 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

lipHL2120 遺伝子の供与体は、*T. lanuginosus* CBS586 株及び *F. oxysporum* DSM2672 株である。*amdS* 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。*URA3* 遺伝子の供与体は、*S. cerevisiae* FL100 株である。

(2) 安全性に関する事項

T. lanuginosus は、自然界に広く存在する高温菌であり、食経験は特に知られていないが、他の糸状菌と比べて特に病原性で問題となる菌種ではない（参照 10）。*F. oxysporum* は、土壌中などに普遍的に生育しており、植物病原菌として知られているが、病原性が見られるのは本菌種の分化型であり、かつ限られた宿主植物種に対して病原性を示す（参照 11）。

A. nidulans の食経験は認められていないが、*amdS* 遺伝子は選択マーカーとして長年利用されてきた実績を有する。

S. cerevisiae はパン酵母やアルコール発酵酵母として食品製造に安全に使われてきた長い歴史があり、有害生理活性物質を生産することは知られていない。

T. lanuginosus、*F. oxysporum*、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* は、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL2 及び 3 の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない（参照 8）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）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又は合成方法に関する事項

lipHL2120 遺伝子は、*T. lanuginosus* CBS586.94 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られたリパーゼをコードする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て得られた遺伝子及び *F. oxysporum* DSM2672 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られたリパーゼをコードする遺伝子の断片の配列を結合して得られた。

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

URA3 遺伝子は、*S. cerevisiae* FL100 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により得られた。

(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 の塩基数及び塩基配列並びに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 *lipHL2120* 遺伝子

lipHL2120 遺伝子がコードする lipHL2120 は、トリアシルグリセロールの1及び3位のエステル結合並びにリン脂質及びガラクト脂質のエステル結合を加水分解する。

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

T. lanuginosus 及び *F. oxysporum* 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。その結果、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

lipHL2120 を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

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

lipHL2120 の人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析を行った。その結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが示された (参照 12)。

(b) 人工腸液に対する感受性

lipHL2120 の人工腸液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE 分析を行った。その結果、試験開始後 6 時間においても完全には分解されないことが示された (参照 12)。

(c) 加熱処理に対する感受性

lipHL2120 の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH6 の各温度帯で 30 分処理した後の活性を測定した。その結果、80°C の処理によって完全に失活することが示された (参照 13)。

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

lipHL2120 と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベース^cを用いて相同性検索を行った。その結果、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は検出されなかった。また、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは見いだされなかった (参照 14)。

^b PubMed (検索日 : 2021 年 12 月)

^c ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 21) (検索日 : 2021 年 11 月)

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し、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、選択マーカーとして使用された。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。

③ *URA3* 遺伝子

URA3 遺伝子がコードするオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼは、一般的にウリジン要求性を相補する選択マーカーとして使用され、pJPV028 を大腸菌で増幅する際に *pyrF* 変異を相補する選択マーカーとして使用された。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから、lipHL2120、アセトアミダーゼ及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ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

lipHL2120 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター配列及び同 *na2* 遺伝子のプロモーター断片に、*A. nidulans* Glasgow 野生株のトリオースリン酸異性化酵素をコードする遺伝子のプロモーター断片を連結させた *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. nidulans* の *amdS* 遺伝子の野生型プロモーター配列である。*URA3* 遺伝子のプロモーターは、*S. cerevisiae* FL100 株由来の野生型のプロモーターである（参照 15）。

(2) ターミネーターに関する事項

lipHL2120 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株に由来する *amg* 遺伝子のターミネーター配列である。*amdS* 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* Glasgow 野生株由来のターミネーター配列である。*URA3* 遺伝子のターミネーターは、*S. cerevisiae* FL100 株由来の野生型のターミネーターである（参照 15）。

(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

(1) 及び (2) の他に挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は組み込まれていない。

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 pUC19 に、*na2* プロモーター断片、*na2/tpi* プロモーター断片、*lipHL2120* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*amdS* 遺伝子断片及び *URA3* 遺伝子断片から構成される *lipHL2120/amdS/URA3* 遺伝子発現カセットを挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV028 を作製した。pJPV028 中には、pUC19 由来の機能的なアンピシリン耐性遺伝子の配列は残存していない。

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 pJPV028 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（参照 15）。

(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

遺伝子導入用ベクター pJPV028 の全配列を対象としたオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）検索を 6 通りの読み枠で実施した。その結果、158 個の ORF が検出された（参照 14）。検出された ORF と既知アレルゲンとの同源性検索として、80 アミノ酸以上で 35% 以上一致するアレルゲンを検索した結果、ナマズ科パンガシウス科の一種であるカイヤンのグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼのアレルゲン Pan h 13 と同源性を示した。しかしながら、その ORF は本来の読み枠とは逆方向であり、転写される可能性は低いものと考えられた。また、pJPV028 中に検出された ORF とアレルゲンとの間に連続した 8 アミノ酸の一致はなかった。

pJPV028 中に検出された 158 個の ORF と既知毒性タンパク質との同源性検索として、NCBI データベース^dを用い、E-value < 1.0×10^{-5} を指標にして検索を行ったところ、毒性タンパク質に指標を超える同源性を示した ORF はなかった。

遺伝子導入座における ORF 検索は、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 pJPV028 全体である。

(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 pJPV028 は、構築の過程において精製されていることから、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

^d NCBI データベース（検索日：2021 年 12 月）

6. DNAの宿主への導入方法に関する事項

pJPV028を宿主ゲノムへプロトプラスト法を用いて導入した。

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pJPV028には、pUC19由来の機能的なアンピシリン耐性遺伝子の配列は残存しておらず、抗生物質耐性遺伝子が含まれない（参照15）。

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

JPAo006株は、*lipHL2120/amdS/URA3* 遺伝子導入用ベクターpJPV028が導入されている。

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

JPAo006株の染色体上でのpJPV028の導入位置を調べる目的でシークエンス解析を行った。その結果、pJPV028は染色体上の1か所に複数コピーが挿入されていることが確認された。さらに、定量PCR法を用いた解析により、複数コピーの*lipHL2120*遺伝子が導入されていると推定された（参照16）。また、挿入領域近傍の塩基配列は明らかになっている。

(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ORFの有無を調べる目的で、挿入DNAの5'近傍配列及び3'近傍配列について、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66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、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アミノ酸配列で35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは、認められなかった。また、連続した8アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンはなかった（参照17）。

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、NCBIデータベース^dを用いてE-value $<1.0 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った。その結果、66個のORFのうち、宿主ゲノムと挿入配列を跨ぎ相同性を示したORFはなかった（参照17）。

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

lipHL2120 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に長年安全に利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

lipHL2120 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年安全に利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、米国食品用公定化学品集（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

lipHL2120 製品は、2010 年以前から欧米で販売が開始されている。米国において、GRAS の自己認証済みであり、カナダにおいて食品添加物のポジティブリストに（参照 18）、フランスにおいて食品用加工助剤のポジティブリストに収載されている（参照 19）。

2. 組換え体の残存に関する事項

lipHL2120 製品中に組換え体由来の DNA の残存がないことを PCR 法により確認した（参照 20）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

lipHL2120 製品の製造原料は、食品用酵素の製造に長い間安全に使用されてきたものであり、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含まれるとは考えにくい。試験バッチの分析値はわが国の食品、添加物等の規格基準を満たしている（参照 21）。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

lipHL2120 製品は、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

lipHL2120 製品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が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAo006株を利用して生産されたリパーゼ」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、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 食品用酵素データ集－取り扱い手法と実践－: 株式会社シーエムシー出版; 2013年7月31日.
2. 厚生労働省. 2020. 令和元年国民健康・栄養調査報告.
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/eiyuu/r1-houkoku_00002.html [accessed Jan. 25th 2021].
3. Product Data Sheet (社内文書)
4. *Aspergillus oryzae* ***株に関する情報 (社内文書)
5. 坂口謹一郎、山田浩一 麹菌の形態と其の分類に就て (其の1) 東京帝国大学農学部農芸化学教室 昭和18年5月27日受理.
6. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Appl Microbiol Biotechnol 2018;102(22):9481-9515. (社内文書)
7. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 1992;36(5):569-572.
8. 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」.
https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_2020101-1.pdf. [accessed May 31 2021].
9. Search Results with *Aspergillus oryzae* from Allergen Nomenclature (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee).
10. Singh S, Madlala AM, Prior BA. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. Fems Microbiology Reviews, Review 2003;27(1):3-16.
11. Mehrabi R, Bahkali AH, Abd-Elsalam KA, Moslem M, Ben M'barek S et al. Horizontal gene and chromosome transfer in plant pathogenic fungi affecting host range. FEMS Microbiol Rev 2011;35(3):542-554.
12. Digestibility of lipHL2120 protein in a test batch PPW26090 (社内文書)
13. Analytical method for temperature and pH activity profile and temperature stability of lipase (社内文書)
14. Sequence homology of ORFs in the expression plasmid pJPV028 to toxins and allergens (社内文書)
15. 遺伝子導入用ベクターpJPV028のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
16. Copy number determinaton of the lipHL2120 genein the GM production strain (社内文書)
17. Sequence homology of ORFs in the flanking regions of the pJPV028 insertion on the genome of JPAo006 to toxins and allergens (社内文書)
18. List of Permitted Food Enzymes (Lists of Permitted Food Additives).
<https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/lists-permitted/5-enzymes.html> [accessed May 16, 2018].

19. 仏国の食品用加工助剤ポジティブリスト.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000020667468> [accessed Feb 17, 2020].
20. Absence of residual DNA in the product (社内文書)
21. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from JPAo006 (社内文書)