

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

(第245回) 議事録

1. 日時 令和6年2月28日(水) 9:58~12:17

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

3. 議事

(1) 遺伝子組換え食品等の安全性評価基準改正の検討について

- ・JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ
- ・*Saccharomyces cerevisiae* NS470 (CBS 615.94) 株を利用して産生された α -ガラクトシダーゼ

(2) その他

4. 出席者

(専門委員)

児玉座長、伊藤専門委員、岡田専門委員、小野道之専門委員、小野竜一専門委員、
佐々木専門委員、柴田専門委員、手島専門委員、樋口専門委員、藤原専門委員

(専門参考人)

中島専門参考人

(食品安全委員会)

川西委員、脇委員

(事務局)

中事務局長、及川事務局次長、前間評価第二課長、今井評価情報分析官、
奥藤課長補佐、山口係長、今村技術参与、田地技術参与

5. 配布資料

資料 食品健康影響評価に関する資料

- ①JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ
- ②*Saccharomyces cerevisiae* NS470 (CBS 615.94) 株を利用して産生された α -ガラクトシダーゼ

6. 議事内容

〇〇〇 おはようございます。少し定刻よりも早いですけれども、皆様おそろいですので、ただいまから第245回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を開催したいと思います。

本調査会は、議事次第にありますように、「食品安全委員会の公開について」に基づいて、非公開で行います。

本日は、専門参考人として、〇〇〇に御出席をいただいております。

また、本日は、Web会議システムを併用して行います。

本日の議題は、新規品目であります「JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミンナーゼ」、「*Saccharomyces cerevisiae* NS470 (CBS 615.94) 株を利用して産生された α -ガラクトシダーゼ」の安全性についての審議です。

それでは、事務局から資料の確認をお願いします。

〇〇〇 それでは、事務局から配付資料を説明いたします。

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、そして、机上配付資料といたしまして1と2-1から2-4までがございます。

資料の不足等がございましたら、事務局まで御連絡ください。

また、本日は、「JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミンナーゼ」の申請者であるノボザイムズジャパン株式会社の方、「*Saccharomyces cerevisiae* NS470 (CBS 615.94) 株を利用して産生された α -ガラクトシダーゼ」の申請者であるケリー・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予定としております。

以上です。

〇〇〇 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、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します。

〇〇〇 事務局におきまして、専門委員の皆様にご提出いただきました確認書を確認したところ、平成15年10月2日付け委員会決定の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。

〇〇〇 本日は、Web会議で参加される専門委員もいらっしゃいますので、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説明をお願いします。

〇〇〇 Web会議形式の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。

2点目、発言の際は、赤い挙手カードを提示していただくか、Web会議画面の挙手ボタンを押してください。座長よりお呼びしますので、マイクをオンにしてお名前を発言いただいた上で、御発言をお願いします。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、音声接続不良時や通信環境に問題がある場合は、カメラをオフにしたり、再入室

することにより改善する場合があります。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。万が一全く入室できなくなった場合は、事務局までお電話ください。

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、青い同意カードを挙げていただくか、手で丸をつくるなど、意思表示をお願いいたします。

以上がWeb会議における注意事項となります。よろしくお願いいたします。

〇〇〇 それでは、新規品目である「JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ」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します。

〇〇〇 それでは、「JPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ安全性審査資料」と記載されました黄色の紙ファイルを御用意ください。

2ページ目を御覧ください。第1、比較対象として用いる従来の添加物の項目です。

1- (1) 名称、有効成分はトランスグルタミナーゼです。生産菌は *Streptomyces mobaraensis* です。反応特異性はタンパク質またはペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、アミン化合物の第1級アミノ基またはタンパク質もしくはペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基をアシル受容体とするアシル転移反応を触媒します。

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

(3) 用途及び使用形態です。トランスグルタミナーゼは、タンパク質間で架橋構造を形成することによるゲル化及び接着等の性質から、蒲鉾のような水産加工品、ハム・ソーセージなどの畜肉加工品などのタンパク質を含む多くの食品で食感改良、保水性向上、歩留まり向上などの多岐にわたる目的のために用いられています。

なお、加工助剤として用いられるトランスグルタミナーゼは加熱を伴う製造工程中で失活されますが、失活した酵素タンパク質は最終食品に残存しています。

(4) 摂取量は、既存のトランスグルタミナーゼ製品が全て魚介（練り製品）、魚肉ハム・ソーセージ並びに畜肉のハム・ソーセージ類の製造に用いられ、かつ100%残存すると仮定した場合、日本人の一日最大摂取量が36 μg TOS/kg 体重/日と算出されております。

続いて、3ページの第1-2、宿主及び導入DNAに関する項目です。

(1) 宿主は、*Bacillus licheniformis* Ca63株で、自然界から分離された菌株です。

(2) DNA供与体等は、4ページの表1を御覧ください。まず、有効成分であるトランスグルタミナーゼをコードする *tgsSM-1* 遺伝子の供与体は *Streptomyces mobaraensis* NBRC 13819株です。それ以外にもプロモーター、ターミネーターの供与体及び性質は記載のとおりとなっております。

続きまして、5ページの(3)挿入DNAの性質及び導入方法です。JPBL015株の作製には、DNAの挿入だけではなく欠失も伴っております。図1に示されていますとおり、宿主であ

るCa63株に目的遺伝子を挿入するため、図1の3行目に記載されている●●●の遺伝子座にマーカー遺伝子を挿入後、●●●の遺伝子座に残存したマーカー遺伝子は欠失導入用ベクターで除去します。残りの●●●の遺伝子座のマーカー遺伝子を新たなマーカー遺伝子等で置換し、最終的に目的遺伝子である *tgsSM-1* 遺伝子発現カセットを挿入しているという方法でございます。

6ページの図2に *tgsSM-1* 遺伝子発現カセットの模式図が示されております。これらの遺伝子座のほかにも、遺伝子の挿入を目的としてマーカー遺伝子、プロモーター、ターミネーターが挿入されていましたが、生産菌構築過程で特定の酵素をコードする遺伝子の挿入は行われず、マーカー遺伝子は欠失導入用ベクターを用いて欠失させるため、プロモーター及びターミネーターの断片として染色体に残存するというところでございます。このことについては第4-6でも御説明させていただきます。

続きまして、10ページ目の第1-3を御覧ください。利用経験や食経験についてでございます。*Bacillus licheniformis* は、動物や人間の食べ物の中にも存在している菌で、同種は長年にわたって食品等の製造に安全に使われてきた経験がございます。また、今回のCa63株についても、申請者において50年以上にわたり食品用酵素の生産菌として使用されてきた実績がございます。

第1-4、宿主の構成成分等です。*Bacillus licheniformis* が有害生理活性物質及び栄養阻害物質等を生産するという報告はなく、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程のバイオセーフティーレベル2及び3には分類されておりません。

第1-5、組換え添加物の項目です。(1) 製品名はトランスグルタミナーゼ (*tgsSM-1*) で、生産菌が *Bacillus licheniformis*、有効成分は従来のトランスグルタミナーゼと同様です。

(2) 製造方法は、11ページの図4のとおり、培養工程、ろ過工程等の製造工程を経た上で製剤化されます。生産菌はろ過等の精製工程を経て除去されており、製品中に生産菌の混入がないことを確認しています。

(3) 使用形態、(4) 有効成分の性質は、既存のトランスグルタミナーゼと変わりません。

12ページを御覧ください。第1-6-(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点として比較表を表4に示してございます。アミノ酸残基数及び至適温度、至適pHは同じで、生産菌が従来品は *Streptomyces mobaraensis*、本申請品は *Bacillus licheniformis* となっております。また、従来品は、日本を含む世界各国で20年以上の販売実績がございます。

(2) 組換え体と宿主との相違点は、JPBL015株には、*tgsSM-1* 遺伝子が複数コピー導入されており、トランスグルタミナーゼ (*tgsSM-1*) の生産能を獲得している点と、*tgsSM-1* 遺伝子の導入過程で複数の遺伝子を欠失している点でございます。

13ページを御覧ください。第2-5、近縁種の病原性についてです。*Bacillus licheniformis* の近縁種は *Bacillus subtilis* と *Bacillus pumilus* でございます。これらも非病原性及び非毒

素生産性と見られており、毒性物質を生産することが知られている *Bacillus cereus*等とは明確に区別されているということでございます。

続きまして、14ページからが第3、ベクターに関する事項です。

15ページの6行目(4)のとおり、今回のベクターはエリスロマイシン耐性遺伝子を持っているということでございます。

16ページからが第4、挿入DNA等に関する事項になっております。

17ページの第4-2-(1)挿入遺伝子のクローニングもしくは合成方法を御覧ください。*tgsSM-1*遺伝子はPCRで増幅することにより得られ、Ca63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。

18ページの(3)挿入遺伝子の機能に関する事項を御覧ください。*tgsSM-1*遺伝子はトランスグルタミナーゼ活性を有する*tgsSM-1*をコードします。トランスグルタミナーゼは、タンパク質及びペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、リジン残基または各種1級アミンとの間でアシル転移反応を触媒する酵素でございます。

アミノ酸配列は図6のとおりで、●●●番目のアミノ酸までがCa63株由来の分泌シグナル配列です。

また、図7のとおり、本申請品目のアミノ酸配列は、既存のトランスグルタミナーゼと100%相同性を有しているということでございます。

アミノ酸配列から推定される分子量は約●●●kDaでありまして、これはSDS-PAGE分離に引き続くCBB染色による分析でも同じ値となっているということでございます。

19ページの29行目から1)挿入遺伝子の供与体について食物アレルギー誘発性を示唆する報告はなく、文献も見つかっていないという記載になってございます。

2)遺伝子産物のアレルギー誘発性についてでございます。本申請品目を有効成分とする酵素製品について、食物アレルギー誘発性を示唆する報告はなく、文献も見つかっていないということでございます。

45行目からが3)遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性について、になっておりますが、こちらについては事前に申請者から修正が入ってございますので、机上配付資料1をお手元に御準備ください。机上配付資料1を1ページめくっていただきますと、19ページと記載されたところが出てきます。こちらの19ページの47行目からが人工胃腸液に対する感受性の記載になっております。今回の申請品目である*tgsSM-1*と同一のアミノ酸配列を有する従来品が日本でも20年以上の販売・使用実績があり、これを用いた製品について、食物アレルギー誘発性を示唆する報告がないということから、今回の*tgsSM-1*での人工胃腸液試験は行っておりません。

机上配付資料1の20ページ目をそのまま御覧ください。加熱処理に対する感受性についてでございます。こちらは*tgsSM-1*で試験を行っておりまして、その結果が図8に示されてございます。pH6.0、7.0、8.0の3つの条件で各温度帯での活性を測定した結果、70℃の処理で完全に失活することが明らかになったとしてございます。

一度黄色の紙ファイルにお戻りください。黄色の紙ファイルの申請資料の20ページ目を御覧ください。4) 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性についてでございます。アレルギー誘発性の可能性を調べるため、①、②の条件で相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンは検出されませんでした。これらの結果から、tgsSM-1が食物アレルギー誘発性を有するとは考え難いとしてございます。

25ページ目を御覧ください。第4-5- (2) 目的外のORFの有無に関してでございます。遺伝子の導入用ベクターにおいて相同組換えにより宿主に導入される領域は明らかで、これらの遺伝子座のシーケンス解析により確認がされていますことから、導入用ベクターの全配列を対象としたORF解析は実施しておりません。宿主ゲノムとの境界部位を含む遺伝子導入座位のORF検索については、第5-2- (2) で説明をさせていただきます。

26ページ目を御覧ください。第4-6、DNAの宿主への導入方法に関する事項でございます。宿主ゲノムの●●●の標的遺伝子座にそれぞれマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより挿入し、●●●を選抜してございます。その後、この●●●の標的遺伝子座のうち●●●の遺伝子座のマーカー遺伝子を除去するため、欠失導入用ベクターを菌体内に導入し、●●●してございます。●●●、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するというところでございます。

最後に、今回のトランスグルタミナーゼ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することで、残っておりました●●●の遺伝子座に目的の遺伝子の発現カセットが挿入されるということでございます。

28ページ目の第4-7を御覧ください。遺伝子導入用ベクターはエリスロマイシン耐性を持ちますが、先ほどのループアウトにより脱落するため、宿主の染色体には導入されないとしてございます。

29ページの第5-2- (1) 制限酵素による切断地図に関する事項を御覧ください。JPBL015株の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ておまして、その結果、●●●の標的遺伝子座にトランスグルタミナーゼ遺伝子発現カセットがそれぞれ●●●コピー挿入されているということが示されました。また、●●●の遺伝子座からはマーカー遺伝子が削除されているということが示され、さらに挿入領域には抗生物質耐性遺伝子が存在していないということもここで確認をしてございます。

続きまして、33ページの第5-2- (2) ORFの有無についてでございます。JPBL015株の挿入領域とそれらに隣接する宿主内在性配列において、6通りの読み枠で終始コドンと終始コドンに挟まれた長さ30アミノ酸以上の領域をORFと定義をして検索した結果、合計306個のORFが検出されてございます。

34ページを御覧ください。これらの検出されたORFと既知のアレルゲンとの相同性検索を行った結果、①の条件では、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は検出されておりません。

16行目からの記載ですけれども、1つの遺伝子座におきまして検出された1つのORFが、

マツの一種が有します既知アレルゲンと相同性を示したという結果が出ましたけれども、こちらにつきましては宿主染色体の塩基配列から得られたORFでございます、今回の遺伝子導入で新たに生じたものではないということでございます。

続きまして、②の条件では、一致するORFは検出されてございません。

続きまして、35ページの2) 既知の毒性タンパク質との相同性検索の結果を御覧ください。NCBIデータベースを用いて、*E*-valueを 1.0×10^{-5} 未満を指標としてデータベース検索を行った結果、23行目からの4. の記載になりますけれども、1つのORFがデータベース中の硝酸細菌の一種であるシノリゾビウム属由来のトキシン-アンチトキシン系タンパク質に相同性を示しましたが、このORFは宿主の染色体の塩基配列から得られたものでございまして、遺伝子導入により新たに生じたものではございません。それ以外につきましては、データベースのタンパク質にヒットしたORFはございませんでした。

続きまして、36ページの第6、製造原料、製造器材につきましては、全て長年安全に使用された実績があるものだとさせていただきます。

37ページ、第7-1、諸外国における認可等の状況ですが、JPBL015株を利用して生産されるtgsSM-1は●●●年以降に欧州で販売が開始されておりまして、デンマークでは食品用加工助剤として承認がされているものでございます。

38ページ目を御覧ください。第7-2、組換え体の残存に関する項目です。製品中に組換え体由来のDNAが残存していないことをPCR解析により確認をさせていただきます。

続きまして、39ページ、第7-3、非有効成分に関する項目でございます。表10のとおり、食品添加物等の規格基準を満たすことを確認させていただきます。

40ページ目を御覧ください。第7-4、精製方法及びその効果に関する項目でございます。酵素製品中におけるtgsSM-1タンパク質の純度は極めて高いとしておりまして、添付の資料では●●●%の純度であるという記載がございます。

第8でございます。第2から第7までの事項によりまして安全性の知見が得られているとさせていただきます。

説明は以上になります。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、トランスグルタミナーゼの審議に入りたいと思います。

既に流通している市販品と同じアミノ酸配列を持つものを組換え体として産生したという形になっております。

それでは、申請資料の審議に入りたいと思いますけれども、取りあえず第1から第3、ベクターに関する事項までのところ、申請書の2ページから15ページにかけてですが、コメントや意見がありましたらお願いいたします。

よろしいですか。後から戻ってもらっても構いませんので、それでは、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のところ、申請書でいきますと16ページから28ページです。従来かなり高頻度で使われている宿主で、非常によく使われる遺伝

子座のところに、今まで何度か見たことがあるマーカー遺伝子等を用いた組換え体の作製方法になっております。何かお気づきの点がありましたらお願いします。

〇〇〇、何かお気づきの点がもしあれば。

〇〇〇 特にはございません。この株、有名なよく使われている株ですし、また、まずマーカーを導入して除去して置換するという少々手の込んだ方法ですが、この株については何度も行われている方法で、使われているマーカー、それから挿入に使った遺伝子座等々も以前に何度も審議したものですので、遺伝子組換え方法等は問題ないと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、最後のところです。第5から第8で組換え体に関する事項から添加物に関する事項の辺りまで、申請書の29ページから40ページにかけて、何かお気づきの点がありましたらお願いします。

今回、審議のポイントとしましては、人工胃腸液試験の実施を省略化しておりますけれども、加熱処理試験に関しましては、事前に指摘がありまして、申請者のほうに指摘したところ、今回、机上配付資料という形で皆さんのほうに届いていると思います。

この人工胃腸液試験を省略化したことについて、〇〇〇、何かコメントがもしありましたらお願いいたします。

〇〇〇 今回のものは既存のものと同配列も一緒ということと、それから、加熱試験をして●●●℃で失活しているということが入っていますし、あと、アミノ酸の相同性試験も行っていきますので、分解性試験を省略したということはよろしいのではないかと思います。

〇〇〇 アミノ酸配列が同一で同じものをつくっているという形ですので、私も省略できると思います。

全体を通して何かコメントがありましたらお願いいたします。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 私も昨年の10月から参加させていただいている関係でちょっと質問したかったのですが、前回の会議に出たときには、別の申請のとき、アレルギーの検索とかを最新のものにしてくださいというような御意見があって、今回の場合は特に気にしなくてもよろしいというふうに考えていいのでしょうか。21年とか22年に検索しましたというデータが出ていたところがちょっと気になったのです。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。

今回は2点ありまして、1点は既存のものと同配列が同一であるということで、その点が1つ。あと、これはちょっと事務局とも現在検討中ですが、申請時の段階では最新版でやっているのですが、そこから実際にこの委員会に上がるまでに時間がかかってしまって2年を超えてしまったみたいなケースが結構ありますので、その扱いをどうするかというのは検討事項ではあるのですが、今回は基本的には市販されているものと同配列ということで、特に最新版のデータベースで検索し直してくださいとい

うことは必要がないかなと考えております。

ほかにコメント等がありましたらお願いします。

〇〇〇、よろしくお願いします。

〇〇〇 すみません。私は門外漢でありあまりよく分かっていないのですが、今の御指摘はすごく大事だと思うのですが、2年かかった理由みたいなことは一方で明らかになるのでしょうか。

〇〇〇 ちょっと聞き取りにくかったので、もう一度お願いします。

〇〇〇 2年かかってしまったというのは、どういう理由だというようなことは明らかにならないのでしょうか。

〇〇〇 事務局から。

〇〇〇 〇〇〇、ありがとうございます。

事務局のほうに既に審査をしてほしいと希望されている案件が何件か来ておりまして、事務局のほうでは順番にその中身を事前の確認という形で確認させていただいているのです。やはり順番に処理ということになりますので、来た時点で来たものをすぐに確認できないという事情がございまして、それで少し時間がたってしまうということで、今回のものが2年ずっと放置されていたということではないです。検索が2年以上前になってしまったのは、事前の確認とかの手続で少し時間がかかってしまったということがございます。

〇〇〇 ありがとうございます。あまり本質ではないのですが、デンマークで承認されているということなのですが、そういう承認されているという事実があれば、何かその番号なりそれを証するようなものがあるかないかなとちょっと思いましたけれども、でも、そういうこともあるのですね。分かりました。

〇〇〇 承認されたということ自体は事務局のほうで確認されているかと思えます。

ほかにコメントありますでしょうか。どうぞ。

〇〇〇 どうも御審議ありがとうございます。担当委員の〇〇〇ですが、私自身は、この製品自体、ロジックからいって特段に問題がないなと思っているのですが、今まであまりそういう書き方をしていない部分で、2ページ目、第1-1- (3) 用途及び使用形態で最後のところに「なお、加工助剤として用いられるトランスグルタミナーゼは加熱を伴う上記の工程中で失活されるが、失活した酵素タンパク質は最終食品に残存する」という説明になっていて、失活した酵素タンパク質は最終食品に残存するとわざわざ書いてあるというのは、私はこの調査会に関わって初めて見たものなのだけれども、その点について、これをわざわざ書き加えた意味というのは、問い合わせたことはありましたか。

〇〇〇 事務局、〇〇〇です。

特段今回のこの件で理由というのは聞いておりませんが、全く同じ記載ではありませんが、製品が食品中に残存するのか、例えば何らかの方法で取り除かれるのかというのは、書いている申請書も多くありますので、今回のものだけということではないのかなと事務局では考えております。

〇〇〇 分かりました。この製品は比較対照の既存製品として、既存物質ではあるもののアミノ酸配列が同じものとの比較なので、そういう意味では問題ないのだけれども、何かひょっとして深い意味があるのかなと思って聞いたままで、特段にないということが確認できれば、もうそれで了解です。ありがとうございます。

〇〇〇 トランスグルタミナーゼは食うものに直接入ってしまっているの、多分それを何となく意識して文章をつくっているのではないかなと想像します。

ほかにありませんでしょうか。

それでは、特段安全性上の問題点はないということで、その点について皆さんの同意をいただきたいのですけれども、それで評価書のほうに進んでもよろしいかどうか、丸をつくってもらうか、同意のカードを挙げてもらうか、よろしくをお願いします。

(同意の意思表示あり)

〇〇〇 では、全員同意されたということでよろしいですね。

本件については、特に安全性上問題がないということでありますので、引き続き、評価書案の審議に入りたいと思います。

事務局から説明をお願いします。

〇〇〇 ありがとうございます。

それでは、評価書案の説明をいたします。

右上に「資料」と記載されました冊子をお手元に御準備ください。食品健康影響評価に関する資料でございます。こちらの1ページ目からが本品目の評価書案になります。

6ページ目をお開きください。Ⅰ．評価対象添加物の概要でございます。本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63株を宿主として、*Streptomyces mobaraensis* NBRC 13819株由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子を導入することで作製したJPBL015株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼです。本添加物は、タンパク質またはペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、アミン化合物の第1級アミン基またはタンパク質もしくはペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基をアシル受容体とするアシル転移反応を触媒する酵素であり、タンパク質を含む食品の食感の改良、保水性向上、歩留まり向上などのために使用されます。

続いて、67行目からⅡ．食品健康影響評価でございます。

まず、第1の1、従来の添加物について、(1) 名称はトランスグルタミナーゼ、基原は*Streptomyces mobaraensis*でございます。

(2) 製造方法は、培養、ろ過等の工程を経て製造され、生産菌は、除菌ろ過により除去されます。

(3) 用途及び使用形態は、タンパク質間で架橋構造を形成することによるゲル化及び接着剤等の性質から、蒲鉾のような水産加工品、ハム・ソーセージなどの畜肉加工品などのタンパク質を含む多くの食品で食感の改良、保水性向上、歩留まり向上などの多岐にわたる目的のために用いられます。なお、加熱を伴う食品の製造工程において、トランスグル

タミナーゼは活性を失いますが、失活した酵素タンパク質は最終食品に残存します。

7ページの90行目から(4) 摂取量ですが、既存のトランスグルタミナーゼ製品が全て本添加物を用いたtgsSM-1製品に置き換わり、かつ最終製品中に100%残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は36 µg TOS/kg 体重/日となります。

続きまして、97行目から2の(1) 宿主は*Bacillus licheniformis* Ca63株、(2) DNA供与体は*Streptomyces mobaraensis* NBRC 13819株です。

(3) 挿入DNAの性質及び導入方法ですが、tgsSM-1遺伝子は、*Streptomyces mobaraensis* NBRC 13819株由来のトランスグルタミナーゼをコードします。宿主ゲノムの標的遺伝子座に相同組換えによりFRT-F/FRT-F3配列を含むマーカー遺伝子発現カセットをあらかじめ挿入し、tgsSM-1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これら標的遺伝子座に相同組換えにより導入しました。その際、標的遺伝子の欠失が確認されました。

3、宿主の利用ですが、*Bacillus licheniformis*は、食品や食品用酵素の製造において、長年にわたり安全に使用されており、Ca63株は50年以上にわたり食品用酵素の生産菌として安全に用いられています。

4、構成成分ですが、*Bacillus licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、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ーレベル1に相当すると記載をしております。

8ページの124行目から5、組換え添加物の性質の(1)、(2)は記載のとおりでございます。

132行目から(3) 用途及び使用形態は、従来の添加物と同様に、タンパク質を含む多くの食品で食感の改良、保水性向上、歩留まり向上などの多岐にわたる目的のために用いられています。

(4) 有効成分の比較ですが、tgsSM-1製品は、従来の添加物と同様に、食品用加工助剤として用いられています。

続きまして、6の(1) tgsSM-1と従来のトランスグルタミナーゼの相違点は、生産菌です。なお、tgsSM-1と従来のトランスグルタミナーゼのアミノ酸配列は同一です。

(2) JPBL015株と宿主との相違点は、JPBL015株は、tgsSM-1遺伝子が導入されておりトランスグルタミナーゼの高産生性を獲得している点及びtgsSM-1遺伝子導入の過程で複数の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ございます。

続きまして、9ページの頭から第2、宿主に関する事項でございます。

1は記載のとおりでございます。

2、病原性等ですが、*Bacillus licheniformis*が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、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ーレベル1に相当します。

続いて、3から5については記載のとおりでございます。

178行目から第3、ベクターに関する事項ですが、遺伝子導入用ベクターpJPV057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、性質については、記載のとおりでございます。

続きまして、10ページ目の203行目から第4の項目でございます。1の(1)は記載のとおりでございます。

(2)安全性に関する事項です。*Streptomyces mobaraensis*は、放線菌である*Streptomyces*属の一種であり、従来の食品添加物であるトランスグルタミナーゼの生産菌として知られています。

213行目から2の(1)挿入遺伝子のクローニングまたは合成方法です。*tgsSM-1*遺伝子は、*Streptomyces mobaraensis* NBRC 13819株よりPCR法により取得しています。また、宿主である*Bacillus licheniformis* Ca63株由来の α -アミラーゼのシグナル配列をコードする遺伝子配列が付加されております。

(2)は記載のとおりでございます。

224行目から(3)挿入遺伝子の機能でございます。*tgsSM-1*遺伝子がコードするtgsSM-1は、タンパク質またはペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、アミン化合物の第1級アミノ基またはタンパク質もしくはペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基をアシル受容体とするアシル転移反応を触媒する酵素でございます。

231行目からa、挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見です。*Streptomyces mobaraensis*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、アレルギー誘発性を示唆する報告はありませんでした。

11ページの236行目から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でございます。tgsSM-1を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はありません。*Streptomyces mobaraensis*由来のトランスグルタミナーゼのアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はありませんでした。

242行目から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です。(a)人工胃腸液に対する感受性について、tgsSM-1と同一のアミノ酸配列を有する従来のトランスグルタミナーゼは我が国において20年以上の使用実績があることから、tgsSM-1の消化性試験は実施しなかったとしております。

(b)加熱処理に対する感受性について。tgsSM-1の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH6.0、7.0及び8.0の3つの条件で各温度帯で30分処理した後、活性を測定した結果、70°Cの処理によって完全に失活することが示されたとしております。

253行目からd、遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見ですが、遺伝子組換えtgsSM-1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、アレルゲンデータベースを用いて相同検索を行った結果、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検出されませんでした。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は検出されませんでした。

260行目からの記載ですが、以上のことから、遺伝子組換え*tgsSM-1*タンパク質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ございます。

続きまして、3、4、5については、記載のとおりでございます。

13ページに行っていただきまして、316行目、6、DNAの宿主への導入方法でございます。宿主ゲノムの標的遺伝子座及び特定の遺伝子座にそれぞれマーカー遺伝子発現カセットを相同組換えにより挿入し、形質転換体を選抜しています。

次に、欠失導入用ベクターを菌体内に導入することにより、特定の遺伝子座のマーカー遺伝子を除去しています。さらに、標的遺伝子座のマーカー遺伝子を部位特異的組換えにより別のマーカー遺伝子及びFRT-F/FRT-F3配列に置換しております。

最後に、*tgsSM-1*遺伝子発現カセットを持つ遺伝子導入用ベクターpJPV057を菌体内に導入し、インテグラーゼの作用により、標的遺伝子座に*tgsSM-1*遺伝子発現カセットを挿入しております。

7、抗生物質耐性マーカー遺伝子に関して、遺伝子導入用ベクターpJPV057は、エリスロマイシン耐性遺伝子を持ちますが、宿主の染色体には残存せず、生産菌株に抗生物質耐性マーカー遺伝子が残存していないということをシーケンス解析により確認をしております。

続きまして、339行目から第5の組換え体に関する項目でございます。1は記載のとおりでございます。

2の(1)制限酵素による切断地図に関する事項です。JPBL015株の染色体上への*tgsSM-1*遺伝子発現カセットの導入位置を確認する目的で、シーケンス解析を行った結果、標的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ました。また、挿入領域の各構成要素及び制限酵素による切断地図は明らかになっています。

続きまして、14ページ、(2) ORFの有無の項目でございます。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、各標的遺伝子座における挿入DNA並びにこれらの5'近傍配列を含む領域、3'近傍配列を含む領域及び異種遺伝子断片が残存する遺伝子座領域についてORF検索を行った結果、6つの読み枠において、終始コドンから終始コドンまでで終結する連続する30アミノ酸以上のORFが合計306個検出されたとしてございます。

また、ORFと既知のアレルゲンとの相同性の有無を調べる目的で、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、新たに生じるORFの中で、連続する80アミノ酸配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは検出されておられません。なお、1つのORFが、マツの一種が有する既知のアレルゲンと相同性を示しましたが、当該ORFは宿主染色体の塩基配列から得られたORFであり、遺伝子導入により新たに生じたものではないことから、食物アレルギー誘発性の懸念は小さいと考えられたとしてございます。

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は認められませんでした。

さらに、これらのORFと既知の毒性タンパク質との相同性の有無を調べる目的で、タンパク質データベースを用いて *E*-valueが 1.0×10^{-5} 未満を指標として相同性検索を行った結果、新たに生じるORFの中で、データベース中の気とのタンパク質と相同性を示したORFは認められなかったことから、毒性を有する可能性は低いと考えられたとしてございます。

なお、特定の遺伝子座において1つのORFが、硝酸細菌の一種であるシノリゾビウム属由来のトキシン-アンチトキシン系タンパク質に相同性を示しましたが、当該ORFは宿主染色体の塩基配列から得られたORFであり、遺伝子導入により新たに生じたものではなかったとしてございます。

383行目の第6、製造原料等に関する事項については記載のとおりでございます。

15ページ目、394行目、第7の1、諸外国における認可、食用等に関する事項ですが、トランスグルタミナーゼ製品は、日本を含む世界各国で20年以上にわたり販売され、食品用加工助剤として用いられています。また、tgsSM-1製品は欧州で販売が開始されており、デンマークで食品用加工助剤として承認されているとしてございます。

続きまして、第7の2、組換え体の残存については、PCR法によりDNAの残存がないことを確認したとしてございます。

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。

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、コメントを賜りたいと思います。なお、細かい字句の修正等については、後ほど修正箇所を事務局までお伝えいただきたいと思います。どうでしょうか。

どうぞ。

〇〇〇 10ページの230行目の括弧内は参照7になっていて、参照先として参照7で正しい可能性があるのですが、ちょっと確認して下さい。もう一つ11ページの251行目の参照6は食品添加物公定書で、公定書にはこんなことを書いているはずはないと思うので、ちょっとそこは参考文献を適切に訂正したほうが良いように思いました。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。そうですね。参照6は明らかに間違いですので、事務局のほうで再度確認をさせていただいて、修正をさせていただきます。

〇〇〇 ほかにありますでしょうか。

では、私のほうから、7ページの88行目の先ほど〇〇〇がおっしゃった部分になるのですが、失活した酵素タンパク質は最終食品に残存すると。これは外に出ていく書類なので、最終食品に残存するのではないかといった誤解が生じても困るので、念のためといたしますか、従来の添加物と同様にとか、何かちょっと一言入れておいたほうがよろしい

かなと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。追記をさせていただきます。

〇〇〇 それから、*Bacillus*の省略形がいっぱい出てくるのですけれども、厳密には1回目はフルスペルで書くべきかと思うのです。その意味だと、173行目のところは近縁種にはと書いて*B.*になっているので、そこは*Bacillus*かなと読み取れるのですが、そのほかの270行目とかに出てくるところはそうは読み取れないので、初発で出てくるところはフルスペルにしてもらったほうが無難かなと思いますので、どこで1回目に出てくるかを確認していただいて、訂正等をしていただけたらと思います。

〇〇〇 ありがとうございます。*Bacillus*自体が最初に出てくるところをフルで書くのではなくて。

〇〇〇 ではなくて、普通、学名は*Bacillus*何とかというので1セットになっていて、1回目にそれがちゃんと書いてあれば、2回目は*B.*何とかでいいのですけれども、1回目は書くべきなのですよ。でないと、*B*で始まるほかの属と区別がつかないということになって、この*B*は何の*B*なんだみたいな話になって。

〇〇〇 分かりました。それでは、もう一度その点は事務局で確認をさせていただいて、初めて出てくるところにつきましてはフルで書かせていただくように修正をいたします。

〇〇〇 それと、298行目にオープンリーディングフレームと出てくるのですが、19ページの355行目のところにORFの注釈が出てくるので、こちらのほうがいいですね。最初に出てきたときのほうが。

〇〇〇 ありがとうございます。これは多分、毎回なのですけれども、(2)で書かれているものは安全性評価基準に基づいたタイトルのような形になっておりまして、文章中で初めて出てくるのが、先ほど先生がおっしゃられたところで、そこは以下「ORF」とするという書きぶりになっております。この評価書だけではなくて、これまでの評価書もタイトルの的にここは全て。

〇〇〇 タイトルなのですね。でも、以下「ORF」とするが、この下のORFがすぐここに出てきてしまうので、若干ちょっとねという感じはするので、ちょっと工夫してもらったほうがいいですかね。

〇〇〇 少し事務局で検討させていただきます。

〇〇〇 あと、334行目のところにエリスロマイシン耐性遺伝子は宿主の染色体には存在しないのですけれども、生産菌の染色体には存在しないほうがいいのかなどは思ったのですが、宿主にしている理由はないですよ。生産菌ですよ。もともと宿主にはないのだけども、生産菌にもないことを確認していますという流れで書いたならそうかもしれないのですけれども、消していた文章がループアウトで脱落するためとあるので、流れとしては生産菌ですよ。

〇〇〇 そうですね。ここで実際に書きたいのは、最終的な生産菌にはないということを書きたかったのですが、この文章につきましても事務局でもう一度確認をさせていただいて、

誤解を与えないように修正をさせていただきます。

〇〇〇 私からは以上です。

ほかの先生方で何かコメント等がありましたらお願いします。

〇〇〇 私はこの調査会の担当委員をやっていて、何回か同じ発言をしたことがあるのですが、その間に委員の入替えなんかがあるので、初めての方もいるかもしれないので申し上げておくのですが、食品安全委員会の食品健康影響評価というのは、遺伝子組換え食品等評価書、これが最終的に外向けに公表するものです。一方で調査会での審議はこの調査会の場合は、通常議論するのは申請会社から資料として提出していただいた審査資料を基に議論し、この資料を追加・削除・訂正等してファイナライズするように議論をしますので、公表文書としてこの食品等評価書というのが重要であって、旧来これをあまりこの調査会では時間をかけて議論、確認しないという審議方法をとってきています。食品安全委員会では通例本委員会を火曜日にやるのですが、そのときに私は本委員会の担当委員として事務局と一緒にこの食品等評価書のみを説明して通知書として承認を仰ぐわけですが、その場で間違いが見つかる結構訂正は大騒ぎになります。ですので、ぜひとも気がついた点に関しては、それまでに少なくとも御指摘いただいて、小さな事でも、一応指摘していただければ大変助かります。

〇〇〇 ちなみに、ほかの調査会ではこの評価書の方を議論するそうです。うちの調査会は申請書を一生懸命確認してその中身の議論をやるのですが、ほかの調査会はこの評価書をずっと一からやるという流れでやっているそうで、このスタイルでやっているのはこの調査会だけだそうです。事務局からは、一度ほかの調査会に合わせたやり方をやってほしいと言われていましたので、そのうち簡単そうな案件について一度やってみたいとは思っております。ちょっと今回は簡単そうな案件、次のものが面倒くさそうな案件なのであれですが、ということで、やり方が結構ほかの調査会は違うんだということを皆様御理解いただけるとありがたいと思います。

では、もし、今、〇〇〇がおっしゃったように気がついた点がありましたら、後ほど事務局にお伝えいただければと思います。

今回修正がちょっと入りますので、そのいただいた修正については、事務局で修正した後、私のほうで確認し、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。

それでは、トランスグルタミナーゼについては、これで審議終了とさせていただきます。

続きまして、新規品目であります「*Saccharomyces cerevisiae* NS470 (CBS 615.94) 株を利用して産生された α -ガラクトシダーゼ」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します。

〇〇〇 それでは、申請者から提出されている申請書についての説明をさせていただきます。なお、今回、申請書につきまして、事前の確認等を行ってありましたところ、申請書に多数の修正が入っております。その結果としまして、机上配付資料2-1から2-4として

配付をさせていただいているところがございます。今回につきましては、分かりやすさの観点から机上配付資料2-1を基に説明をさせていただければと存じます。

それでは、お手元に机上配付資料2-1を御用意ください。

そうしましたら、2ページをお願いします。本品目、*Saccharomyces cerevisiae* NS470株を利用して生産された α -ガラクトシダーゼということなのですが、従来の添加物についてでございます。名称が α -ガラクトシダーゼ、有効成分も α -ガラクトシダーゼとなっております。

製造方法につきましては(2)でございますが、生産菌株を培養した後、前処理工程、一次固液分離、濃縮、精製とろ過を経て酵素を回収するというところでございます。生産菌株につきましては製造化工程で専用のフィルターでのろ過によって分離、除去されるということでございます。

続いて(3)用途及び使用形態でございますけれども、 α -ガラクトシダーゼについては、糖分子等から成る分子鎖に側鎖として α -D-ガラクトシド結合した非還元末端側のガラクトースの分解活性を持つ酵素であるということでございます。テンサイ糖の製造工程において障害物質となるラフィノースを分解させることによって砂糖の収率向上のために利用されているほか、増粘安定剤として用いられる食品添加物のグァーガムの品質向上にも用いられるということでございます。

続いて(4)摂取量でございます。3ページに摂取量の計算結果が記載されてございまして、まず砂糖・甘味料類の製造において、これが全てテンサイ糖由来であると仮定をしまして、それにガラクトシダーゼが使用され、全量残存するという仮定がされた場合、摂取量の推計が0.76mg/kg 体重/日ということで推定されているところがございます。

また、グァーガムの製造にも使われますので、グァーガムの製造に対して α -ガラクトシダーゼの使用率が100%であり、 α -ガラクトシダーゼが100%残存すると仮定した場合については、一日最大摂取量について0.518mg TOS/kg 体重/日という結果で推計されているところがございます。

続いて、4ページをお願いいたします。宿主及び導入DNAについてでございます。まず宿主でございますけれども、宿主が*Saccharomyces cerevisiae* YT6-2-1 L株(SU50株)ということでございます。

続いて、DNAの供与体の種名、株名または系統名及び由来でございますけれども、まず挿入遺伝子の α -gal遺伝子については、マメ科植物であるグァーの市販品種に由来するということでございます。また、*leu2*遺伝子につきましては*Saccharomyces cerevisiae*に由来するということございまして、テトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子については、*E.coli*由来のpAt153プラスミドに由来するということでございます。

続きまして、挿入DNAの性質についてでございますけれども、 α -gal遺伝子については α -ガラクトシダーゼをコードするというところでございまして、そのほかにつきましては、次のページ、表2に一覧として記載がされてございます。

続きまして、DNAの挿入方法についてでございます。*α-gal*遺伝子発現カセットを制限酵素で処理することで単離をしまして、その後、テトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子、そして*leu2*遺伝子を含むプラスミドであるpUR2770に組み込むということをやっております、その結果、遺伝子導入用ベクターでありますpUR2774Gを構築したということでございます。

この遺伝子導入用ベクターを線状化して、スフェロプラスト法によってその全長を宿主である*Saccharomyces cerevisiae* YT6-2-1 L株に導入したということでございます。

続きまして、同6ページの5、遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料でございます。遺伝子組換え添加物につきましては、名称がα-ガラクトシダーゼ、製品名がBiogalということでございます。有効成分もα-ガラクトシダーゼとなっております。

また、下のほうの(2)製造方法でございますが、これは●●●がされてございます。

続いて、8ページをお願いいたします。用途及び使用形態でございます。Biogalにつきましても、従来のガラクトシダーゼと同様であるということに記載されてございます。

(4)有効成分の性質及び従来の添加物との比較でございますけれども、従来の添加物との比較につきましては表3として表形式でまとめられてございます。従来の添加物としてここで挙がっているものが*Aspergillus niger*由来のものということなのですけれども、至適pHが4.5、至適温度が50℃から55℃、そして、50℃/8時間の処理で80%の活性残存を示すということでございますけれども、本品目Biogalにつきましては、至適pHが●●●、至適温度が●●●℃、そして、●●●℃を超えると急速に活性が低下するということに記載されているところでございます。

続きまして、6、遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と組換え宿主の相違点でございます。まず、遺伝子組換え添加物と従来の添加物の比較でございますけれども、既存添加物である、ここでは*Mortierella vinacea*由来のガラクトシダーゼ、そして、酵母*Saccharomyces carlsbergensis*及びヒト由来のα-ガラクトシダーゼの成熟アミノ酸配列の比較によりまして、N末端側には保存領域が存在することが確認されているということに記載がございます。グァー由来のα-ガラクトシダーゼと*Mortierella vinacea*由来のα-ガラクトシダーゼの相同性については43%であるということですのでここには記載がございます。

続きまして、10ページをお願いいたします。宿主に関する事項でございます。宿主については、*Saccharomyces cerevisiae* YT6-2-1 L株ということでございます。この*Saccharomyces cerevisiae*なのですけれども、厚生労働省GILSPリストの別表第1の宿主に記載されてございまして、病原性がなく、安全に長期間利用した歴史があるまたは特殊な培養条件下では増殖するが、それ以外では増殖が制限されるものということで判断されているということでございます。また、この*Saccharomyces cerevisiae*については、パン酵母ですとかアルコール発酵用の酵母として、または食品そのものとして世界中で安全に使われてきた経験があるというふうに記載されているところでございます。

続きまして、12ページをお願いいたします。ベクターに関する事項でございます。この

うち（４）薬剤耐性に関する事項でございますけれども、ベクターであるプラスミド pUR2770の構築に用いられましたpJDB207というプラスミドにつきましては、*E.coli*由来のpAt153に由来する配列が含まれているということでございます。そのため、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含まれるということで記載されております。

続きまして、14ページをお願いいたします。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でございます。*α-gal*遺伝子の供与体についてはマメ目マメ科のグァーの市販品種由来ということでございまして、*leu2*遺伝子は*Saccharomyces cerevisiae*、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子については*E.coli*由来のpAt153由来ということでございます。

安全性に関する事項でございますけれども、pAt153の由来である*E.coli* B株及びその由来株につきましては、国立感染症研究所や日本細菌学会のバイオセーフティーレベル分類においてバイオセーフティーレベル1に位置づけられているなど、病原性がないことが確認されていること。そして、安全に長期間利用した歴史があるということから、GILSPの基準を満たすとされているということで記載されてございます。

続きまして、2の（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。*α-gal*遺伝子発現カセットについては、グァー由来の*α-gal*遺伝子のうちシグナル配列をコードする部分を*Saccharomyces cerevisiae*のインペルターゼ遺伝子由来のシグナル配列を含む合成フラグメント配列と置換することで合成されたということでございます。

続きまして、18ページをお願いいたします。挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する事項でございます。挿入遺伝子である*α-gal*遺伝子のアレルギー誘発性についてでございますけれども、グァーの種子につきましてはクラスタ豆またはグァー豆と呼ばれておりまして、インドやパキスタンを主な産地といたしまして、古くから一般的に食されているということでございます。その胚乳粉末加工品については、グァーガムとして日本をはじめ世界各国において食品添加物として認可され、安全に使われているということでございます。

グァーガムのアレルギー誘発性については、PubMedによる文献検索が行われておりまして、アレルギー性が報告されております。その報告の多くは職業性鼻炎及び職業性喘息であるということでございまして、これらの論文においては、染料を繊維に付着させるためにグァーガムを使用しているようなカーペット製造工場の従業員、または錠剤の硬化剤としてグァーガムが使用されているような製薬工場の従業員といった職業的に10年以上の長期間にわたって暴露された事例であるということでございまして、通常使用でのアレルギー性の報告はないということでございます。

19ページをお願いいたします。遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見でございます。遺伝子産物についてPubMedによる文献検索が行われておりまして、そのアレルギー誘発性を示唆する報告はないということでございます。

続いて、20ページをお願いいたします。遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性についての知見でございます。まず、人工胃液に対する感受性でございますが、こちらの α -ガラクトシダーゼについて人工胃液処理試験を行った結果、試験開始10分後のサンプルにおいて α -ガラクトシダーゼのバンドが消失しているという結果が記載されてございます。

続いて、21ページが人工腸液に対する感受性でございます。結果といたしましては、試験開始360分で52%まで減少するという、すなわち360分経過後でも残存するというところで結果が記載されているところでございます。

続いて、22ページ、加熱処理に対する感受性でございますけれども、結果といたしましては、60℃以上の加熱で完全に失活するというところで記載されております。

続いて、23ページをお願いいたします。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ございます。こちらの α -ガラクトシダーゼと80アミノ酸以上の配列に対して35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンについて検索が行われておりまして、既知のアレルゲンが検出されなかったということで結果が記載されてございます。

続いて、24ページをお願いいたします。発現ベクターにおけるオープンリーディングフレームについてでございます。遺伝子導入用ベクターpUR2774Gの全配列において、終始コドンから終始コドンまでの連続する8アミノ酸以上のORFについては516個が見いだされたということでございます。これらと既知のアレルゲンとの構造相同性について、Allergen Onlineデータベースを用いて相同性検索が行われておりまして、その結果、ORFと相同性を示す既知のアレルゲンが11種見つかったということでございます。しかし、いずれのORFも交叉反応を示すおそれのある基準である、相同性50%以上かつE-valueが 1×10^{-9} 以下を満たしていなかったという考察がこちらに記載されてございます。

続きまして、27ページをお願いいたします。抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項でございます。こちらの遺伝子導入用ベクターについては、先ほどから御説明させていただいているとおりテトラサイクリン耐性遺伝子、そしてアンピシリン耐性遺伝子が含まれております。いずれの遺伝子につきましても、GILSPを適用できる選択マーカー遺伝子として厚生労働省より認められているということから、ヒト及び動植物に対する病原性や有害な生理活性等を有することはないと考えられるということで考察がこちらには記載されているところでございます。

続いて、28ページをお願いいたします。組換え体に関する事項のうち、遺伝子導入に関する事項でございます。本組換え体について、次世代シーケンス解析が行われております。その結果、挿入遺伝子のコピー数については、約●●●コピーが導入されているということでございまして、それが*Saccharomyces cerevisiae*●●●番染色体上の●●●か所に導入されたと考えられたというふうに申請書には記載されてございます。

続いて、29ページの(2)をお願いいたします。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でございます。導入遺伝子の5'及び3'末端側の近傍配列の両境界領域において新規のORFが形成されていないかということを確認す

るために、6フレーム全てにおいて開始コドンから終始コドンまでの8アミノ酸以上のORFがこちらでは検索されてございます。その結果、5'末端側において3個、3'末端側において2個、合計5個のORFが確認されたというふうに記載されてございます。これらについてAllergen Onlineデータベースを用いて相同性の検索がされておりまして、その結果、これらのうち2つのORFについては、合計4つの配列との相同性を示したということでございます。いずれのORFについても交叉反応性を示すおそれのある基準である、相同性50%以上かつE-valueが 1×10^{-9} 以下を満たしていなかったという考察がこちらには記載されております。

また、連続する80アミノ酸以上の配列に関して35%以上のアミノ酸相同性を示す配列及び連続する8アミノ酸とは相同性を示す配列については確認されなかったということでございます。

なお、毒性タンパク質との相同性検索については、現時点においても記載はされていないところでございます。

続きまして、31ページをお願いいたします。第7、遺伝子組換え添加物に関する事項でございます。まず、諸外国における認可、食用等に関する事項でございます。EUにおきましては、現在、食品添加物としての承認申請手続を進めているところでございます。また、●●●におきましては、現在、●●●ということでございます。

続いて、組換え体の残存に関する事項でございますけれども、遺伝子導入用ベクター特異的プライマーを用いたリアルタイムPCR法によって組換え体の残存に関しては確認されてございまして、生産菌株由来のDNAが残存していないことについては確認されているところでございます。

続きまして、製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項でございますけれども、Biogalについては、食品添加物公定書に定める項目に適合することがそれぞれ確認されているということで記載されてございます。

申請資料の説明については以上になるのですが、こちらの2-1の修正に当たって行った確認、質問及びその回答につきましては、机上配付資料2-2として配付させていただいているところでございます。事前にいただいております質問につきましては、回答を御紹介させていただきます。

机上配付資料2-2の、ページ番号が振られていなくて大変恐縮なのですが、3枚目、5ページをお願いいたします。(1)と記載されているものでございまして、宿主の酵母菌の遺伝子型(接合型を含む)を示すこと。また、要旨ではSU株となっておりますけれども、別添資料8においてはSU50株となっていることについて確認すること。そして、親株であるAH22株とSU50株の遺伝子型を示すことというふうに御指摘いただいております。こちらの回答にあるとおり、株名については要旨修正の上、遺伝子型等は回答として示されているところでございます。

続いて(2)導入された α -gal遺伝子はイントロンを除去されたものであるか回答するこ

とということをごさいますして、回答としては、イントロンは存在しませんということ、こちらは記載のとおり回答があったところをごさいます。

また、(3)として記載がされているものの上のほうです。5ページの●●●とは何かということについては、●●●と記載を変更したと回答がごさいます。

そして、1個飛ばしまして(4)食経験のあるグァーガムに含まれる α -ガラクトシダーゼと組換え酵母に作らせた α -ガラクトシダーゼ、本申請品目については、同等のものと考えてよいか、糖鎖が異なるのではないかというようなことで質問をいただきまして、この回答につきましては次のページにごさいます。糖鎖修飾の可能性につきましては、 α -ガラクトシダーゼのタンパク質サイズについては、39.8kDaということなのですけれども、SDS-PAGEの結果、成熟タンパク質のサイズから想定されるバンドサイズと同じであったということで、糖鎖修飾が行われていないと想定されたという回答がごさいます。

続いて、同ページの下の方、EUではこれまで本品目は加工助剤として流通していたということなのですけれども、今般食品添加物として承認手続を進めているということですが、理由は何かということでご質問いただきまして、回答は次のページにごさいます。EUにおいては、現在、酵素のポジティブリスト化を進めているということでごさいます。そのポジティブリスト制度化の対応のための登録であるというふうなことで回答が来てごさいます。

次のページをお願いいたします。22ページの4-3-(1)において、 *α -gal*遺伝子プロモーターについて、ガラクトース-1-リン酸ウリジントランスフェラーゼのプロモーターであるという説明が当初されていたのですけれども、これは間違いではないかということで、確認したところ、修正いたしましたということで回答がごさいます。

続きまして、机上配付資料2-3を御覧ください。これが机上配付資料2-2で回答し切れなかった部分に対して、昨日時点での確認状況を報告いただいたものでごさいます。指摘事項の8と記載されているもの、これがアンピシリン耐性遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子についてなのですけれども、こちらの両耐性遺伝子については、生産菌株に導入されているということが分かってごさいますので、この考察につきましては、評価基準に基づきまして、当該添加物の製造工程において、遺伝子及びその産物が安全性に問題のない程度まで除去されることが明らかであるかどうかについての考察を追記いただきたいということ、もしこれが除去されない場合については、同基準に基づいて考察を追記してくださいということでご指摘しているのですけれども、現時点においても、現在確認を行っているところというふうにご報告がごさいます。

続きまして、(1)と記載されている中ほど、下の方に同ページにごさいますけれども、製品Biogal中の α -ガラクトシダーゼの純度について申請書類に記載がごさいませんでしたので、示すことというふうにご質問いただきましたが、これについても現時点において確認中という回答が来てごさいます。

また、組換え体におけるORF検索について、これは先ほど御紹介したとおり、開始コード

ンから終始コドンまでをORFと定義して検索がされてございまして、これは終始コドンから終始コドンまでとして検索を実施することは可能かというふうに、これも要請しているのですけれども、こちら確認中というふうに回答がされてございます。

また、本添加物が活性を有したまま食品に残留する可能性はないかというふうな御質問もいただいておりますけれども、こちらの回答については、本品は●●●℃で急送に失活するということとして、反応後加熱によって失活させる加工助剤としての使用が主に想定されているものですので、糖類の製造であれば濃縮工程での加熱、グァーガムの製造工程であればグァーの夾雑酵素や抽出後、濃縮、粉末化の工程において加熱工程があるため、また、最終食品の製造工程でも、大腸菌、カビを対象とした加熱殺菌がある場合がほとんどであるということでございますので、本添加物が活性を有したまま食品に残留する可能性はないと考えられますというふうな回答が来てございます。

また、机上配付資料2-3の2ページ目なのですけれども、培養工程でアンピシリン及びテトラサイクリンは本品目の製造に関して使用していないという理解でよいかという質問もいただいております、これについては、培養工程では使用していないと回答が来てございます。

また、これは先ほど対応されていたところなのですけれども、有効成分の性質及び従来の添加物との比較については、表形式でまとめることということで、このとおり表形式でまとまってございます。また、アミノ酸残基数についても比較を行うことというふうに事前に御意見いただいております、成熟アミノ酸残基数についても、こちらのほうの回答書においては追記がされているところでございます。

表の下でございましてけれども、遺伝子組換え添加物と従来の添加物において、*Mortierella vinacea*由来のガラクトシダーゼのN末端には保存領域が存在するとありますけれども、括弧内の数値が*Mortierella vinacea*由来のガラクトシダーゼのものになっていないため、これは修正することということ。そして、アミノ酸配列をそれぞれ示すことということで、これも事前に御質問をいただいております、こちらの回答は、同ページ及び次のページにかけてアミノ酸配列について示していただいているところでございます。

そして、次のページになりますけれども、*α-gal*遺伝子がターミネーターを持たないという説明が本文中でされていたのですけれども、この説明は違うのではないかということ御指摘をいただいております。このことについては、現在確認中ということで回答が来てございます。

また、ORFの検索で引っかかったものについての考察において、交叉反応性を示すおそれのある基準を相同性50%以上かつ10⁻⁹以下ということで考察が記載されていますけれども、これは一体何の基準か出典を示すことということで、これもまた事前に御質問いただいております、これについてもまだ確認中であるというふうな回答が来ているところでございます。

本件につきまして、概要の説明は以上となります。

本件につきましては、従来品目と比べて新たに安全性を損なうおそれが認められず、ヒトの健康を損なうおそれがないと判断するに当たりまして、不足すると思われる事項等があるかと思われまますので、それを中心に御意見等をいただきたく、どうぞよろしく願いいたします。

〇〇〇 ありがとうございます。

非常に赤の多い資料になってしまっておりまして、直前に配付された修正版で皆さん大変時間のない中見ていただいた形になりまして、申し訳ありませんでした。

それでは、非常に多数の修正と事前指摘事項がございますけれども、一応流れに沿って皆さんの御意見を伺いたいと思います。第1から第3、机上配付資料2-1の2ページから13ページにかけて、意見、コメントがありましたらお願いいたします。

どうぞ。

〇〇〇 やはり同じ α -ガラクトシダーゼとはいうものの、相同性の観点からも熱耐性とかも大分違って、特性が大分違うということで、そのまま同じものとして扱っていいのかというのは大分疑問が残るのではないかと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。一応、今回、相同性が四十何%ぐらいで、私も自分でパソコンを動かして確認しましたがけれども、そんなに相同性が高くないということもあります。ただ、これは α -ガラクトシダーゼとしてこの酵素とヒトの酵母と *Mortierella vinacea* みたいなものと比較したという学術論文がありまして、その中では α -ガラクトシダーゼとして議論されているというのは添付資料にありましたので、一応そこについては私も確認したということになります。

その扱いについては、次回までにちょっと整理して、また皆様にお諮りすることになるところが裏のほうの議論としてはありましたので、それについては次回、皆様に御意見を伺えたらと思います。

そのほかございますでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 〇〇〇です。

今の〇〇〇の御質問にも関係するのですが、14ページ辺りにもあったと思うのですが、グァー由来の α -Galにつきまして、グァー自体がインドやパキスタンでは食経験があるということになっていると思うのですが、そういった地域では α -Galを含むようなものを食べていたという認識なのですか。

〇〇〇 今回、申請者をお呼びしていますので、食経験については後ほど直接聞いていただけますでしょうか。

〇〇〇 分かりました。多分その辺の食経験等の関係で安全性という意味は一つ評価できるのかなと思ひまして質問させていただきました。ありがとうございます。

〇〇〇 そのほかにごございますでしょうか。

私のほうから1点、6ページ目の5の(1)に本添加物の名称、基原及び有効成分とあるのですが、この基原とあるのは*Saccharomyces cerevisiae*になっていまして、この基原が結構厄介なのですけれども、ここは生産菌としておいてもらったほうが、より間違いないかなと思いますので、基原ではなくて生産菌という形にしておいていただけるとありがたいと思います。

それでは、後から戻っても構いませんので、次に第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で、机上配付資料2-1の14ページから28ページにかけて、意見、コメントがありましたらお願いいたします。

人工胃腸液試験の結果が出ておりますけれども、この点について、〇〇〇、〇〇〇、何かコメントがありましたらお願いいたします。

〇〇〇 質問をもう一度お願いします。

〇〇〇 20ページ辺りから人工胃腸液試験の結果が出ておりますけれども、これについてコメントがありましたらお願いいたします。

〇〇〇 人工胃腸液試験に関しては、胃液で早く分解するということが出されていますので、腸液では少し時間がかかりますけれども、胃液では時間が早いということで、早く消化されると考えてよろしいかと思えます。

〇〇〇 そのほかございますでしょうか。

〇〇〇 細かいところですが、16ページの図3、それから17ページの図4、プラスミドの絵が出ています。*leu2*とありますが、これは*leu2d*の間違いではないかと思えます。これは別物として、*leu2*の遺伝子は1コピー入れればロイシンのない培地で普通に生えてこられますけれども、*leu2d*というのはプロモーターに傷が入っていて、非常にプロモーター活性が弱くなっていて、多コピーになったときようやく生えてこられるというものですので、だからわざわざ多コピー導入したくてこれを使ったのだと思うのですけれども、なので、多分これは間違いだと思います。

以上です。

〇〇〇 ありがとうございます。後で申請者に指摘してあげていただけると。

〇〇〇 そうさせていただきます。

〇〇〇 そのほかございませんでしょうか。

それでは、第5の組換え体に関する事項から最後までで、机上配付資料の29ページから32ページにかけてコメントがありましたら、お願いいたします。今回、毒性タンパク質の評価をしていませんので、これはちょっとガイドライン上から足りないということなので、次回やっていただくしかないかなと思っております。

それから、ORF検索の交叉する基準というのが出てくるのですけれども、この辺り、〇〇〇や〇〇〇は、こういう数値を見たことがあるとかないとかありましたら、コメントいただけましたらありがたいと思います。

〇〇〇 23ページにも出てきているのですけれども、相同性50%以上かつ10⁻⁹以下という

この数字は、私自身は見たことがないので、これはどこの基準かというの示してほしいと思います。

〇〇〇 私も見たことがない基準なので、これは後で、まだ回答が出てこないかもしれませんが、一応聞いてみたいと思います。

それから、ちょっと戻りますけれども、18ページ、第4の2の(3)に挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見が書かれていますが、記載の内容でいかどうかというのを確認してくださいということみたいなのですけれども、グァーガムに関してですね。食経験があるということであれば、特に問題はないかなと思いますけれども、先ほど柴田先生からの質問もありましたので、ちょっと聞いてみたいと思います。

あとは大体、事前に発出されている質問事項になるかと思いますが。

〇〇〇 ちょっと私、こういうほうの常識がなくて、確認してみたいなと思っていることとしては、摂取量の数字は、これはどういう計算をしているかによるのだけれども、合計すると体重キログラム当たりミリグラム単位ぐらいになる量なのですね。全体の話としては、申請者は一応これを加工助剤として使われるとしています。例えばグァーガムの場合でもそう言っているのだけれども、その辺はもう一度きちんと確認したい。体の中に残ってしまう可能性で、今回の場合は、胃液ではよく分解する。でも、腸液では分解しない。あと、今まで私が調査会で評価しているものの記憶でいくと、腸液では残ってしまうものは今までも結構ある。そのときは、熱分解で大体分解されるということは確認するというようなことだったと思います。今回の場合は、これは単純に摂取量を計算すると加工助剤とすると比較的大きな数字になります。既存物質との比較ということで考えると、既存物質の食経験はあるといったって、既存物質での食経験というのは、別の使い方で使われた場合である可能性もあるので、やはりこれから使う可能性のあるものとしては、加熱のところで分解するような条件であってほしいなと思いますので、一応その辺は確認したいなと思っています。

以上です。

〇〇〇 では、申請者のほうに直接確認していただいて。

それでは、申請者をお呼びしてもらってよろしいでしょうか。

〇〇〇、お願いします。

〇〇〇 ちょっと細かいことなのですけれども、今回、コピー数をNGSだけで決めているのですが、これまで割とリアルタイムか何かをしてもらっていたような気がするのですが、複数種でやっていたらよいとするということでもいいのでしょうか。

以上です。

〇〇〇 もう一回お願いします。

〇〇〇 すみません。コピー数がショートリードとロングリード2種類で検討されて、●●●コピーぐらいだということになっています。これまでNGSだけではなくて、マルチコピーの場合はリアルタイムか何かで一応確認していたような気がするのですが、この

NGSの定量設定がどれぐらいかがはっきりしないというところもあるのですが、この場合は2種類ぐらいでやっているの、NGSだけでもよしとするという理解でよろしいでしょうか。

〇〇〇 　ここら辺は結構NanoporeのNGSがExtra-long readと書いてあって、これの精度が僕はいま一つつかみ切れていないのですけれども、〇〇〇、何か御存じですか。

〇〇〇 　最近Nanoporeの性能は大分上がっているの、信頼性は高いのではないかなと思って見ておりました。それで、一応ショートリードのほうと想定されるコピー数はそごがないということだったので、よいのかなというふうに思っております。

　　以上です。

〇〇〇 　私もロングとショートを今回2通りやっているの、コピー数についてはそのくらいでもよろしいかなとは思っております。私もNanoporeはどのぐらい精度が上がっているのかどうかちょっと興味があるので、少し聞いてみたいとは思っていたのですけれども、では、後ほどそこら辺も少し聞いてみたいと思います。

〇〇〇 　もう一点いいですか。31ページの組換え体の残存のところ、26行目です。リアルタイムPCR法によりと書いてあるのですけれども、別添12はきっとリアルタイムではない気がするのですが、これは単純に書き間違えているということでしょうかね。

〇〇〇 　では、その点も後ほど直接お聞きいただいて、お願いします。

〇〇〇 　分かりました。ありがとうございます。

〇〇〇 　それでは、申請者が入られるまでちょっとお待ちください。

（申請者入室）

〇〇〇 　それでは、説明者の方は自己紹介をお願いします。会社名とお名前をお願いいたします。

〇〇〇 　ケリー・ジャパンの〇〇〇と申します。よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 　私、ケリー・ジャパンの〇〇〇と申します。よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 　申請のお手伝いをさせていただいておりますSCC Japanの〇〇〇と申します。よろしくお願ひいたします。

〇〇〇 　同じくSCC Japanの〇〇〇と申します。どうぞよろしくお願ひいたします。

〇〇〇 　それでは、申請者の方に少しお聞きしたいことがありますので、答えられるところはお願ひしたいと思います。

　　まず、〇〇〇のほうから食経験についてお願ひいたします。

〇〇〇 　私から、申請書のページ14、18につきまして、グァーに関する食経験のお話を書かれていたかと思ひます。恐らくこの中では、グァーに含まれる α -Galにつきまして食経験があるかどうかという点がポイントなのかなと考へているのですけれども、ここで書かれていらっしゃるような点、グァーに含まれる α -Galを特に日本で食経験があるのかどうかという点につきましては、いかがなのでしょう。

〇〇〇 　これは遺伝子組換えの酵素ですので、まだ日本での許可を取れていません、基

本的に日本においての食経験と言われると、恐らくないと思われま

〇〇〇 グァー自体としても日本では食経験がないと思っていいのですか。

〇〇〇 グァーガムですか。この酵素を使って処理したグァーガム。

〇〇〇 いや、例えば、今、インドやパキスタンではグァーの種子の食経験があると資料には書かれていたと思うのですけれども。

〇〇〇 グァーの種子由来のグァーガムというのが食品添加物として認可されていますので、これは日本ももちろん含めて一般的な飲料なりいろいろな食品に使われている増粘多糖類ですので、グァーガムとしての食経験と、あとはそれを酵素分解したグァー種子の酵素分解物というのも添加物として認可されています、販売されていますので、食経験は日本でもございます。

〇〇〇 確認なのですけれども、食品添加物として認可されているグァーガムには α -Galは入っているのですか。

〇〇〇 使用されてはいないと思います。

〇〇〇 ないですね。分かりました。ありがとうございます。

以上です。

〇〇〇 では、続きまして、〇〇〇、*leu2*のところ。

〇〇〇 申請書16ページの図3、それから17ページの図4のところ、少々古めかしいプラスミドの絵ですが、これは*leu2*遺伝子になっていますけれども、*leu2d*の間違いではないかと思うのですが、いかがですか。

〇〇〇 図3及び図4でdが入っていないくて、表3のほうでは*leu2d*となっているというような御指摘ということによろしいでしょうか。

〇〇〇 そういうことです。*leu2*と*leu2d*は別物です。

〇〇〇 こちらのdは、すみません、古いものを持ってきたところがあって、入っていないのかなと思うのですけれども、これは表3の*leu2d*が正しい情報です。では、図のほうを適宜修正させていただければよろしいでしょうか。

〇〇〇 正しく記載していただければと思います。

〇〇〇 それでは、次に、〇〇〇のほうから。

〇〇〇 御説明ありがとうございます。この製品に関する用途、使用形態辺りのことと安定性の関係に関しての確認をさせていただきたいのですけれども、用途としては、幾つかの用途、種類としては幾つか書かれていて、加工助剂的に使われる場合、中にはこれは加熱をきちんとしていると分かるものもあるのですけれども、例えば植物由来のオリゴ糖や多糖類に作用させというふうに使ったときに、60℃以上だったら10分間の加熱で大体分解するというデータですが、そういう処理をちゃんとやっているのか。あるいはグァーガムの場合、私もこの辺はよく分からないのですけれども、品質向上を目的に用いる場合は、それだけの加熱条件でちゃんと製造工程で加熱しているということなのだろうかということを確認させてください。

というのは、もし新たな使用ということで用いるならば、食経験がないということになってきます。その辺り、これは一旦食品添加物として認められると、一応想定される使用方法はどれでも使えるということになりますから、使用経験に関しては確実なことは言えなくなってくるので、いずれにしてもこちらからの今までの質問の中で、加熱していますよというように回答は来ているようではありますけれども、60℃以上の加熱はそれぞれされているのかを確認したいと思います。

〇〇〇氏 まず、基本的には加工助剤ですので、工程中で必ず失活して使っていただくことを前提としております。例えばグァーガムの製造工程ですと、基本的には濃縮して粉末化という工程が必ず入りますので、そこで高熱にさらされることが間違いないと思われま

す。糖類の精製に関しましても、基本的には酵素を反応させた場合には失活した工程が入りますし、その後、精製と濃縮という工程が入ってきますので、基本的には加熱されていくものと思われま

す。〇〇〇 それが60℃以上であるかとか、それから、今の説明、これは詳細に聞くと長くなってしまいますので適当なところだと思うのですが、60℃以上で10分間以上さらされているような使い方になっているのでしょうか。加工助剤って簡単におっしゃるのだけれども、最終製品に残らないことが確認されている場合と確認していない場合もいろいろあるのではないかと思います。そのような視点から、使い方の中で60℃以上の加熱がされていることの確認をしているのか、あるいは加熱を保証をするような使い方がされているのかを確認したいです。

〇〇〇 そうしたら、ほかにも多分未回答のものが多数ありますので、次回、修正版を出される時に一般的な使用形態に当たってどのくらいの熱を実際にかけることが多いということについて、少し記載を足していただくようお願いいたします。よろしいでしょうか。

〇〇〇 承知しました。

〇〇〇 それから、〇〇〇のほうから一言お願いいたします。

〇〇〇 リアルタイムのほうでよろしいですかね。

〇〇〇 そうです。

〇〇〇 31ページの26行目ですけれども、組換え体の残存に関する事項のところ、リアルタイムPCR法により残存していないことが確認されたとなっていて、資料12となっていますが、資料を見る限りですと、リアルタイムではなくて半定量PCRだと思えるのですが、これは単純なミスですか。それとも別にやられているということですかね。

以上です。

〇〇〇 御指摘いただきありがとうございます。別添資料12のほうは改めて確認をさせていただいて、適切な記載になるように修正をさせていただきます。

〇〇〇 分かりました。

〇〇〇 それから、NGSに関して、今回Nanoporeを使われていますけれども、次回でもいいのですが、今回使われたNanoporeは結構進歩が激しく進んでいるというふうに聞いていますので、どのくらいの精度で読めるものなのか、申請書に書かなくてもいいのですけれども、回答でも構わないので、少しNanoporeの精度について回答をお願いできたらと思っております。

〇〇〇 承知いたしました。

〇〇〇 それから、1点、事前に発出している質問事項ですけれども、この交叉反応性を示すおそれのある基準で相同性50%以上かつ*E-value*が 1.0×10^{-9} 以下という基準について、何か公的な基準の書類みたいなものはあるのでしょうか。

〇〇〇 こちらはアイルランドのほうで実施をしてもらったのですけれども、その担当者の変更とかもありまして、当時やったときにどういう基準で何をベースにしたかというのがはっきりしなくて、改めてこちらも適切なガイドライン等を参照しながら確認して、適切な形でもう一度やってみたいなと考えております。

〇〇〇 50%以上、 10^{-9} 以下というのは結構厳しめなので、何かしらの基準がないと、ちょっとこの数値を受け入れることはできないかなというふうに思っております。

〇〇〇 たしかAllergen Onlineのサイトでは50%で 10^{-7} で推奨されていたかと思うのですが、ちょっとその数字でやり直して、これが実際に 10^{-9} で実施したものかを確認の上、もし 10^{-9} で実施したものであれば、Allergen Onlineの推奨の値で再提出をいたします。

〇〇〇 そのようにお願いいたします。

そのほか、先生方から何か全体を通して申請者に聞いておきたいことがありましたら。

〇〇〇、どうぞ。

〇〇〇 酵母の親株の遺伝型を示してくれとお願いいたしまして、御回答いただきました。AH22株とSU50株。Mating type型で*leu2*遺伝子がこの二重変異。あと、*HIS4*と*CAN1*が入っておりますので、これはヒスチジン要求性でカナバニン耐性の変異が入っているということですのでよろしいですね。この書き方が酵母の遺伝学の上では正式の書き方ですので、宿主の説明のところでもこのようにきちんと書いていただければと思います。

お聞きしたいことは、この標的の遺伝子が●●●番染色体の●●●の領域に多コピーが入っているということですが、この多コピーは導入したプラスミドDNAのみがタンデムで多コピーになっているのか、それとも●●●で多コピーになっているのか。恐らくこの領域、●●●していますので、ここに組み込むことで多コピー化を狙ってこういう組換え体の構築の仕方をしたのだと思うのですけれども、そうしたら導入したときに●●●で多コピーになっているのか、それとも導入したプラスミドの領域のみが多コピー化しているのか、お調べになっていると思うのですが、いかがでしょうか。

〇〇〇 すみません。こちらは詳細を確認させていただいて、また回答という形でお示しさせていただいてもよろしいでしょうか。

〇〇〇 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。

〇〇〇 申請者さんのほうから何か聞いておきたいことがありましたら、この際ですのでお聞きしたいと思いますけれども、何かありますでしょうか。

〇〇〇 オープンリーディングフレームの解析のところになるのですが、実施しているのが2021年のデータベースを使っているのですが、そちらに関しては特段御意見等がございますでしょうか。

〇〇〇 今回もう24年ですので、再提出されるときは、できればやり直していただけたらと思います。あと、判定基準も現在の通常のほかの多くのやり方とちょっと違いますので、やり直していただけるとありがたいなと思います。

〇〇〇 分かりました。そうしますと、導入遺伝子というかタンパク質のところと、導入用のベクター全体のオープンリーディングフレーム、あと導入部位のジャンクションのところと3つやっているのですが、そちらは基本的に直したほうがよろしいということでしょうか。

〇〇〇 そのようにお願いします。特にジャンクションのところは、上流何ベース、下流何ベースと普通は記載していただくのですが、今回記載がないようなので、どのようにしてORFを調べたかという配列の特徴についても記載をお願いいたします。

〇〇〇 はい。ありがとうございます。

〇〇〇 それでは、ほかに先生方はコメント等ありませんでしょうか。たくさんあるかもしれないかもしれませんが、後ほど事務局に寄せていただいても構いませんので、では、一応これで質疑応答のほうは終わりとさせていただきます。

説明者の方、どうもありがとうございました。では、退室をお願いいたします。

(申請者退室)

〇〇〇 それでは、審議に戻ります。

非常に修正箇所が多くて、非常に読みにくい申請書になっておりますけれども、今の回答を踏まえた上で、全体を通して何かコメントがありましたらよろしくをお願いいたします。

〇〇〇 酵母の遺伝学は少々特殊な事情がございますので、共通認識として、僭越ながら少々解説させていただきます。

酵母は一倍体と二倍体どちらも安定でございまして、実用の酵母はほとんどが二倍体、清酒酵母等々は二倍体です。ビール酵母などだと三倍体のものがございまして、真核生物ですから雄雌がございまして、**a**と**α**といいます。なので、この株は**a**型で一倍体ということになります。二倍体であれば**a/a**の形で記載します。

それから、酵母の遺伝学の場合はローマ字3文字プラス数字というのが遺伝子の名前なので、ロイシンの遺伝子、生合成系の2番目の遺伝子**leu2**で、大文字3文字であればこれが優性、小文字3文字で劣性ということになります。そういうルールがございまして、これで見えます。

それから、**2μm**という話が出てきましたけれども、真核生物で安定なプラスミドという

のはほとんど存在しないのですが、*Saccharomyces cerevisiae*は極めて例外でして、どうか、サッカロ属とクロイペロ属くらいしか安定なプラスミドというのは真核生物で見つかりません。*Saccharomyces cerevisiae*は、文字どおり長さ2 μ m、約6,000bpのプラスミドが核の中に大体数十コピー安定して存在しています。なので、このプラスミドを宿主、ベクターに使うと、そうすると自動的にこの数十コピーになりますので、これをベクターに使うケースが大部分です。酵母の場合は相同組換えしか起こらないので、非相同組換えはめったに起こりません。ですから、プラスミドに酵母の染色体のどこでも一部を入れて強引に形質転換しますと、そうすると狙ったとおりのところにまず間違いなく入ります。

それから、先ほどのleu2と3と112、これはかなり初期の頃の話でして、1か所の転移変異ですとバックミュレーションがよく出るのですけれども、2か所変異が入ったこの株のおかげでロイシンの遺伝子のバックミュレーションはほとんど出ないということで、かなり昔になりますが、もてはやされてみんなで使っていた株になります。

それから、先ほどの2 μ m、これはサークルの意味でcirと言っていて、通常の株はこの2 μ mのプラスミドがございましてcir⁺、申請者がもともとの親株のAH22株もcir⁺、彼らが使っているのはSU50株、これは2 μ mのプラスミドを失った株を使っているということでcir⁰となっています。

それから、先ほどの●●●というのはそのまま、非常に大量に生産しなければいけない酵素でも染色体にだけ1コピーあれば足りまして、そこから安定なメッセンジャーRNAをばんばんつくって、それでどんどんやればいいのですけれども、●●●になりますので、染色体の上で1コピーでは足りません。ですから、ほぼ真核生物の場合は、どの真核生物でも染色体のどこかに●●●の遺伝子が並んでいます。

そういうことになっていまして、酵母の場合は●●●。きっちり同じ配列で並んでいませんので、正確に何コピーかというのはいまだによく分からなくて、かれこれ●●●ということになります。

ここに導入するということで、酵母の場合、プラスミド、環状のまま入れたのでもそこで組み替えて入ってくれるので、それでいいのですけれども、この株の場合は栄養要求マーカーのleu2の遺伝子のdというのは、先ほど説明したとおりプロモーターにかなり傷がついていて1コピーでは十分にロイシンを合成できませんので、多コピー導入した株を無理やり選ぶので便利というふうに使われているものになります。これを多コピーで存在する●●●に突っ込むということで、このプラスミドにも、●●●遺伝子のことを●●●というのですけれども、その一部が組み込まれていて、わらわらと入るようになっている。

通常、プラスミドのままでも酵母にはそのままで入りますので、プラスミドで入れているのであれば、そのプラスミドの形で数十コピー、タンデムにリピートするとそれ以外にちょっと考えられないのですけれども、今回は線状化して入れておりますので、その場合ですと、もしかするとそこに多コピーある●●●の遺伝子を巻き込んで、●●●とそれから突っ込んだ遺伝子のこれがセットで多コピー化している可能性もございまして。

可能性としては非常に少ないと思うのですが、その辺を確認させていただきかと思っ解説させていただきました。酵母は割と特殊な事情がございますので、僭越ながら解説させていただきました。

以上でございます。

〇〇〇 大変参考になりました。ありがとうございます。

それでは、ほかの先生方からなければですが、ありますでしょうか。大丈夫ですかね。たくさんの御意見と、まだ回答されていない質問がたくさんありますので、専門委員の先生方から提出されました意見や確認事項を指摘事項案として取りまとめ、皆様に御確認いただいた上で、厚生労働省を通じて申請者に対して指摘したいと思います。

それでは、議題（1）についてはこれで終わりたいと思います。

議題（2）のその他ですが、事務局から何かありますでしょうか。

〇〇〇 特にございません。

〇〇〇 ありがとうございます。

ちょっと時間をオーバーしましたが、本日の議題についてはこれで終了といたしたいと思います。

以上をもちまして、第245回「遺伝子組換え食品等専門調査会」を閉会いたします。皆様どうも御協力ありがとうございました。