



府食第232号
平成30年4月10日

厚生労働大臣
加藤 勝信 殿

食品安全委員会
委員長 佐藤 洋



食品健康影響評価の結果の通知について

平成29年9月6日付け厚生労働省発生食0906第3号をもって厚生労働大臣から食品安全委員会に意見を求められた添加物「GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法（平成15年法律第48号）第23条第2項の規定に基づき通知します。

なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

G00X-1 株を利用して生産された
グルコースオキシダーゼ

2018年4月

食品安全委員会

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	7
6. 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物 及び組換え体と宿主等の相違点	7
第 2. 宿主に関する事項	8
1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	8
2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項	8
3. 寄生性及び定着性に関する事項	9
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 ...	9
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	9
第 3. ベクターに関する事項	9
1. 名称及び由来に関する事項	9
2. 性質に関する事項	9
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	10
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	10
2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項	10
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	12
4. ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項	13
5. 構築された発現ベクターに関する事項	13
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	14
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	14
第 5. 組換え体に関する事項	14
1. 宿主との差異に関する事項	14
2. 遺伝子導入に関する事項	14

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	15
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	15
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	15
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項	15
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	15
2. 組換え体の残存に関する事項	15
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	15
4. 精製方法及びその効果に関する事項	15
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	15
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	16
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	16
<参照>	17

＜審議の経緯＞

- 2017年9月6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0906第3号）、関係書類の接受
- 2017年9月12日 第665回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2017年9月29日 第164回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年1月25日 第170回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年2月27日 第686回食品安全委員会（報告）
- 2018年2月28日から3月29日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2018年4月4日 遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
- 2018年4月10日 第692回食品安全委員会（報告）
（同日付け厚生労働大臣に通知）

＜食品安全委員会委員名簿＞

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
吉田 緑
山本 茂貴
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

＜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＞

2017年9月30日まで		2017年10月1日から	
澤田 純一（座長）		中島 春紫（座長）	
小関 良宏（座長代理）		小関 良宏（座長代理）	
岡田 由美子	中島 春紫	児玉 浩明（座長代理）	
橘田 和美	樋口 恭子	岡田 由美子	手島 玲子
児玉 浩明	飯 哲夫	橘田 和美	樋口 恭子
近藤 一成	山川 隆	近藤 一成	山川 隆
柘植 郁哉	和久井 信	鈴木 秀幸	吉川 信幸
手島 玲子		柘植 郁哉	

要 約

「GOOX-1 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」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* BB-56(*pyrG*)株を宿主として、*Acremonium chrysogenum* NBRC30055 株由来のグルコースオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した GOOX-1 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、マルトース、マルトオリゴ糖、ガラクトース等に作用する酵素であり、グルコン酸の製造、乾燥卵白製造時の着色防止又は製パン時のグルテン形成を目的として使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*A. oryzae* 由来のオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が導入されている。

「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、挿入遺伝子により発現す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、「GOOX-1 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

名称：GOOX-1 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ
用途：グルコン酸の製造、乾燥卵白製造時の着色防止又は製パン時のグルテン形成
申請者：天野エンザイム株式会社
開発者：天野エンザイム株式会社

本添加物は、*Aspergillus oryzae* BB-56(*pyrG*) 株を宿主として、*Acremonium chrysogenum* NBRC30055 株由来のグルコースオキシダーゼ (*AchGOX*) 遺伝子を導入して作製した GOOX-1 株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼである。本添加物は、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、マルトース、マルトオリゴ糖、ガラクトース等に作用する酵素であり、グルコン酸の製造、乾燥卵白製造時の着色防止又は製パン時のグルテン形成を目的として使用される。

なお、本生産菌には、選択マーカーとして、*Aspergillus oryzae* 由来のオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ遺伝子が導入されている。

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：グルコースオキシダーゼ

基原：*Aspergillus niger*

有効成分：グルコースオキシダーゼ

IUB No. : EC 1. 1. 3. 4

CAS No. : 9001-37-0

(2) 製造方法

グルコースオキシダーゼは、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌はフィルタープレス及び精密ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

グルコースオキシダーゼは、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化する酵素であり、酸味料及び pH 調整剤として使用されるグルコ

ン酸の製造や、乾燥卵白の製造時における脱グルコースによる着色防止を目的として使用される。また、反応生成物の過酸化水素が酸化剤としてグルテン S-S 結合の形成に寄与することを利用して、製パン時の改良剤として使用される。

(4) 摂取量

グルコースオキシダーゼが、全てのグルコン酸、乾燥卵白及びパンの製造において使用されると仮定した場合の最大一日摂取量は 0.0266 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日である (参照 1~5)。

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* BB-56(*pyrG*)株である。*A. oryzae* BB-56(*pyrG*)株は、*A. oryzae* BB-56 株に突然変異誘導を行い、ウリジン要求性とした株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコースオキシダーゼ (*AchGOX*) 遺伝子の供与体は *Acr. chrysogenum* NBRC30055 株、オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は *A. oryzae* KBN616 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

AchGOX 遺伝子は、グルコースオキシダーゼ (AcGO) をコードする。*pyrG* 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、選択マーカーとして用いた。

AchGOX 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を含む遺伝子断片を、プロトプラスト法により宿主ゲノムに導入した。

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、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。日本においても、麹菌として味噌、醤油及び醸造酒などの発酵食品の製造に広く用いられている (参照 6~8)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae は、一般的には非病原性であるが、一部の *A. oryzae* が、マイコトキシンである3-ニトロプロピオン酸、シクロピアゾン酸及びコウジ酸を

低レベルだが産生するとの報告がある（参照 9～12）。

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：AcGO

有効成分：グルコースオキシダーゼ

IUB No. : EC 1. 1. 3. 4

CAS No. : 9001-37-0

(2) 製造方法

AcGO は、*A. oryzae* GOOX-1 株を生産菌として、培養、濃縮及びろ過等の工程を経て製造される。生産菌は、加熱処理により不活化後、フィルタープレス及び精密ろ過により分離除去される。また、フィルタープレス後の脱塩濃縮液を pH 処理することにより、夾雑酵素を失活させている。

(3) 用途及び使用形態

AcGO の用途及び使用形態は、従来のグルコースオキシダーゼと同様であり、グルコン酸の製造、乾燥卵白製造時の着色防止又は製パン時のグルテン形成を目的として使用される。

なお、AcGO はこれらの製造工程における加熱殺菌又は精製により失活又は除去されることから、最終食品中に残存する可能性は低いと考えられる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

AcGO は従来のグルコースオキシダーゼと同じく β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、従来の GO と比べて広範囲の糖に作用する酵素である（参照 13、14）。従来品と比較してアルカリ領域での安定性が高く、高温領域での熱安定性が低い。

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

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

AcGO と従来のグルコースオキシダーゼとの相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なることにより、酵素活性の至適条件が異なる点及び AcGO はグルコオキシダーゼに比べマルトース、マルトオリゴ糖、ガ

ラクトース等の広範囲の糖に作用する点である。

(2) 組換え体と宿主

GOOX-1 株と宿主との相違点は、GOOX-1 株には *AchGOX* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子が導入され、AcGO を発現する点及びウリジン非要求性となっている点である。

以上 1～6 から、本添加物及び本添加物の生産菌と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、第 2 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* BB-56(*pyrG*)株である。

本株は、*A. oryzae* BB-56 株を紫外線照射による変異処理後、5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) 耐性株を分離しウリジン要求性変異株を選抜することにより得た (参照 15)。*A. oryzae* BB-56 株は、食品用酵素の生産菌として利用されている。

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 は食品中に常在し、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 (BSL) 1 に相当する非病原性の微生物である (参照 16)。

一部の *A. oryzae* が、マイコトキシンであるシクロピアゾン酸、コウジ酸及び3-ニトロプロピオン酸を低レベルであるが産生するとの報告がある (参照 9～12)。しかしながら、これらのマイコトキシンの毒性は低～中程度であり、通常の酵素生産条件下でヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは考えにくい (参照 17)。

Aspergillus 属が生産する酵素である α -アミラーゼは、アレルゲンデータベース^aに収載されており、*A. oryzae* 由来の α -アミラーゼの吸入による感作成立やアレルギー症状を惹起する可能性を示唆する報告がある (参照 18、19)。しかしながら、*A. oryzae* BB-56 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、*A. oryzae* BB-56(*pyrG*)株においても、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられる。

^a Allergen Database for Food Safety (ADFS、国立医薬品食品衛生研究所)

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は知られていない。

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 の近縁種には、*A. fumigatus*、*A. flavus*、*A. sojae* 及び *A. parasiticus* がある。このうち、*A. flavus* 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（参照 20）。なお、*A. oryzae* は、アフラトキシン合成遺伝子クラスターの欠落及び変異により、アフラトキシン非生産性であると報告されている（参照 21、22）。また、*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。

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

AchGOX 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を含む挿入 DNA 断片の作製には、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となっている（参照 23）。

(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となっている。

(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となっており、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

AchGOX 遺伝子の供与体は、*Acr. chrysogenum* NBRC30055 株であり、*pyrG* 遺伝子の供与体は、*A. oryzae* KBN616 株である。

(2) 安全性に関する事項

AchGOX 遺伝子の供与体である *Acr. chrysogenum* NBRC30055 株は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当し、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。また、GILSP 遺伝子組換え微生物として認定されている（参照 24、25）。

pyrG 遺伝子の供与体である *A. oryzae* KBN616 株は、*A. oryzae* に属し、国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当し、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない（参照 24）。

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

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

AchGOX 遺伝子は、*Acr. chrysogenum* NBRC30055 株の遺伝子ライブラリーよりグルコースオキシダーゼをコードする遺伝子の断片をプローブとして単離し、塩基配列を決定した。*Acr. chrysogenum* NBRC30055 株より RNA を抽出後、RT-PCR により *AchGOX* 遺伝子を得た（参照 26）。

pyrG 遺伝子は、*A. oryzae* KBN616 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR により得た。

(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

AchGOX 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の塩基数、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 27）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

AchGOX 遺伝子が発現する AcGO は、 β -D-グルコースを D-グルコノ-1,5-ラクトンへ酸化するほか、マルトース、マルトオリゴ糖、ガラクトース等に作用する酵素である。*pyrG* 遺伝子が発現するオロチジン-5'-リン

酸デカルボキシラーゼは、オロチジン-5'-リン酸をウリジン-リン酸に変換する脱炭酸酵素である。

① 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

AchGOX 遺伝子の供与体である *Acr. chrysogenum* NBRC30055 株について、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なかった。

pyrG 遺伝子の供与体である *A. oryzae* KBN616 株については、*A. oryzae* 由来の α -アミラーゼに関する情報として、その経口摂取による感作成立やアレルギー症状を惹起する可能性を示唆する報告があるが、本菌株は醤油製造用麹菌として安全に用いられており、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられる。

② 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

Acr. chrysogenum 由来のグルコースオキシダーゼ及び *A. oryzae* 由来のオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^bを行った結果、いずれもアレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

③ 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事項

AcGO 及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼと既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35% 以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは見いだされなかった（参照 28）。

④ 遺伝子産物の有害タンパク質との構造相同性に関する知見

AcGO 及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ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、データベース^cを用いて検索を行った結果、両者とも既知の毒性タンパク質との相同性は認められなかった（参照 29）。

⑤ 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

AcGO の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-

b データベース : PubMed

c MvirDB (検索日 : 2017 年 1 月 31 日)

PAGE 分析及びウェスタンブロット分析（参照 30）を行った結果、試験開始後 0.5 分以内に分解されることが確認された（参照 31）。

b. 人工腸液に対する感受性

AcGO の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析（参照 30）を行った結果、試験開始後 60 分でも分解されないことが確認された（参照 32）。

c. 加熱処理に対する感受性

AcGO の加熱処理に対する感受性について確認するために、本添加物の使用時の加熱条件（70℃・30 分及び 100℃・10 分）で処理した後、人工胃液及び人工腸液での消化性を SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を用いて確認した。その結果、AcGO の加熱後の人工胃液処理では、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析ともに、試験開始後 0.5 分以内に分解されることが確認された。AcGO の加熱後の人工腸液処理では、SDS-PAGE 分析で試験開始後 0.5 分以内に分解された。ウェスタンブロット分析では試験開始後 60 分でも薄いバンドが検出されたが、加熱処理されることで AcGO は人工腸液により分解されやすくなることが確認された（参照 33）。

以上のことから総合的に判断し、AcGO は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

AchGOX 遺伝子のプロモーターは、*A. oryzae* JCM02239 株由来の TAKA アミラーゼ A 遺伝子の改変プロモーターである（参照 34）。

(2) ターミネーターに関する事項

AchGOX 遺伝子のターミネーターは、*A. oryzae* BB-56 株由来のグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子のターミネーターである（参照 35）。

(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
該当する塩基配列はない。

4. ベクターへの挿入 DNA の組み込み方法に関する事項

プラスミド pUC19 に *pyrG* 遺伝子等を挿入することにより中間プラスミドを作製し、これより得られた DNA 断片に *AchGOX* 遺伝子を連結させることにより、遺伝子導入用ベクター pCSAchGOX を作製した (参照 36)。

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

挿入 DNA 断片の塩基数、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 27)。

(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

挿入 DNA 断片の全塩基配列について、目的以外のオープンリーディングフレーム (ORF) の有無を調べた結果、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 81 個見いだされた。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められなかった。また、Motif-based method による検索においても、相同性を示す既知のアレルゲンは認められなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、タンパク質データベース^bを用いて検索を行った結果、相同性を示す既知のタンパク質は認められなかった (参照 37)。

(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、プロモーター、*AchGOX* 遺伝子、ターミネーター及び *pyrG* 遺伝子が連結された直鎖状 DNA 断片である。

(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

挿入 DNA 断片は、電気泳動により単離・純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

挿入 DNA 断片をプロトプラスト法により宿主ゲノムに導入し、ウリジン要求性が消失した株をマーカーとして選抜後、孢子 PCR にて挿入 DNA を確認し、最も高いグルコースオキシダーゼ生産性を示す株を GOOX-1 株とした（参照 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

挿入 DNA 断片に抗生物質耐性遺伝子は含まれていない。

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

GOOX-1 株は、*AchGOX* 遺伝子の導入により AcGO の生産能を有している点に加え、*pyrG* 遺伝子の導入によりウリジン非要求性となっている点で宿主と異なる。

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

挿入 DNA 断片の宿主ゲノム上の導入位置及びコピー数を調べるために、GOOX-1 株のゲノムドラフト解析、サザンブロット分析及びドットブロット分析を行った結果、染色体 1 箇所複数コピー導入されていることが確認された（参照 38～40）。

(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 断片と宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じる ORF の有無を調べるために、挿入 DNA の 5' 近傍配列を含む領域及び 3' 近傍配列を含む領域（それぞれ宿主ゲノム領域の 1,000 bp を含む。）における 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 4 個検出された。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35% 以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは認められなかった。また、Motif-based method による検索においても、相同性を示す既知のアレルゲンは認められなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するためにデータベース^bを用いて検索を行った結果、相同性を示す既

知のタンパク質は認められなかった（参照 37）。

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

AcGO の製造原料及び製造器材は、長年安全に食品用酵素の製造に用いられたものを使用している。

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

AcGO の製造原料及び製造器材は、上記のとおり安全に使用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。

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

AcGO は、海外で販売及び使用されていない。

2. 組換え体の残存に関する事項

AcGO の生産菌の残存の有無を確認するため、培養試験を行った結果、生産菌は確認されなかった。また、AcGO 製剤中の導入 DNA 断片の混入を確認するため、ドットブロット分析を行った結果、DNA は検出されなかった（参照 41）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AcGO の純度試験分析値は、JECFA の食品用酵素の規格値に適合している（参照 42、43）。また、マイコトキシン類（アフラトキシン B1、B2、G1、G2、コウジ酸、シクロピアゾン酸及び3-ニトロプロピオン酸）の分析を行った結果、いずれも定量限界又は検出限界未満であった（参照 44）。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

AcGO 製剤は、培養物の固液分離、除菌ろ過等の精製工程を経ることで得られる。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考えにくい。

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

AcGO において、含有量の変動により有害性が示唆される常成分は知られていない。

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

第2から第7までの事項により、安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「GOOX-1株を利用して生産されたグルコースオキシダーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成16年3月25日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

- 1 添付 1: 厚生労働省. 平成 27 年国民健康・栄養調査報告
- 2 添付 2: 乾燥卵白を用いた食品(群)調査及び添加量調査. (社内文書)
- 3 添付 3: 文部科学省. 日本食品標準成分表 2015 年版(七訂)
- 4 添付 4: 一日あたりのグルコースオキシダーゼ摂取量の推計. (社内文書)
- 5 添付 5: グルコン酸カルシウムを用いた食品(群)調査. (社内文書)
- 6 Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad J C, Gerds M L, Hammes W P, et al. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int J Food Microbiol.* 2012, 154(3), p. 87-97
- 7 Zhao G, Yao Y, Wang C, Hou L and Cao X. Comparative genomic analysis of *Aspergillus oryzae* strains 3.042 and RIB40 for soy sauce fermentation. *Int J Food Microbiol.* 2013, 164(2-3), p. 148-154
- 8 Marui J, Tada S, Fukuoka M, Wagu Y, Shiraishi Y, Kitamoto N, et al. Reduction of the degradation activity of umami-enhancing purinic ribonucleotide supplement in miso by the targeted suppression of acid phosphatases in the *Aspergillus oryzae* starter culture. *Int J Food Microbiol.* 2013, 166(2), p. 238-243
- 9 Tanaka K, Goto T, Manabe M and Matsuura S. Traditional Japanese Fermented Foods Free from Mycotoxin Contamination. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ.* 2002, 36(1), p. 45-50
- 10 Olempska-Beer Z S, Merker R I, Ditto M D and DiNovi M J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms--a review. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006, 45(2), p. 144-158
- 11 Abe K, Gomi K, Hasegawa F and Machida M. Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia.* 2006, 162(3), p. 143-153
- 12 Blumenthal C Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004, 39(2), p. 214-228
- 13 添付 9: *Acremonium chrysogenum* NBRC30055 株由来グルコースオキシダーゼ挿入カセットの *Aspergillus oryzae* BB-56(*pyrG*)への導入・選抜方法. (社内文書)
- 14 世界知的所有権機関. WO 2014/042237 糖質酸化酵素とその製造方法並びに用途(2014).
- 15 Mattern I E, Unkles S, Kinghorn J R, Pouwels P H and van den Hondel

- C A. Transformation of *Aspergillus oryzae* using the *A. niger* pyrG gene. *Mol Gen Genet.* 1987, 210(3), p. 460-461
- 16 添付 7: 国立感染症研究所. 病原体等安全管理規定 別冊 1「病原体等の BSL 分類等」(2010-06).
- 17 アメリカ合衆国環境保護庁(EPA). FINAL RISK ASSESSMENT OF *Aspergillus Oryzae*.
- 18 Nieuwenhuijsen M J, Heederik D, Doekes G, Venables K M and Newman Taylor A J. Exposure-response relations of alpha-amylase sensitisation in British bakeries and flour mills. *Occup Environ Med.* 1999, 56(3), p. 197-201
- 19 Moreno-Ancillo A, Dominguez-Noche C, Gil-Adrados A C and Cosmes P M. Bread eating induced oral angioedema due to alpha-amylase allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2004, 14(4), p. 346-347
- 20 矢部希見子 and 中島廣光. アフラトキシン生合成機構について. *食品衛生学雑誌.* 2011, 52(3), p. 135-147
- 21 山田修. 麹菌 *Aspergillus oryzae* のアフラトキシン生合成遺伝子ホモログ クラスターの解析-麹菌がアフラトキシンを作らない理由-. *日本醸造協会誌.* 2008, 103(9), p. 665-669
- 22 Lee Y H, Tominaga M, Hayashi R, Sakamoto K, Yamada O and Akita O. *Aspergillus oryzae* strains with a large deletion of the aflatoxin biosynthetic homologous gene cluster differentiated by chromosomal breakage. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006, 72(2), p. 339-345
- 23 添付 13: "Cloning vector pUC19c, complete sequence —Nucleotide— (NCBI)". <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L09137>, (cited 2016-02-03)
- 24 添付 8: 国立感染症研究所. 国立感染症研究所 病原体等安全管理規定 (2010-06).
- 25 添付 15: 厚生労働省. 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号に基づき厚生労働大臣が定める GILSP 遺伝子組換え微生物 (2015-06).
- 26 添付 16: *Acremonium chrysogenum* NBRC30055 株由来グルコースオキシダーゼのクローニング. (社内文書)
- 27 添付 17: グルコースオキシダーゼ発現カセットの遺伝子配列及びアミノ酸配列. (社内文書)
- 28 中村亮介, 中村里香 and 手島玲子. アレルゲンデータベース Allergen Database for Food Safety (ADFS)のデータ改訂とアレルゲン性予測ツール

- の信頼性評価. 国立医薬品食品衛生研究所報告. 2009, 12744-49
- 29 Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T. MvirDB-- a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res.* 2007, 35(Database issue), p. D391-394
 - 30 Thomas K, Aalbers M, Bannon G A, Bartels M, Dearman R J, Esdaile D J, et al. A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2004, 39(2), p. 87-98
 - 31 添付 18: SGF (人工胃液) による AcGO 消化試験. (社内文書)
 - 32 添付 19: SIF (人工腸液) による AcGO 消化試験. (社内文書)
 - 33 添付 20: 加熱処理後の AcGO 消化試験 (SGF(人工胃液)及び SIF(人工腸液)) . (社内文書)
 - 34 日本国特許庁. 特許 第 4495904 号 改変プロモーター (2010).
 - 35 世界知的所有権機関. WO2007/139013 フラビンアデニンジヌクレオチド結合型グルコース脱水素酵素 (2007)
 - 36 添付 21:宿主への挿入 DNA 断片 (発現カセット) の構築方法. (社内文書)
 - 37 添付 22:グルコースオキシダーゼ発現カセットの ORF 検索結果. (社内文書)
 - 38 添付 24:GOOX-1 株のゲノムドラフト解析. (社内文書)
 - 39 添付 25:ドットプロットによる GOOX-1 株の染色体上での挿入カセットのコピー数算出. (社内文書)
 - 40 追加添付 2:GOOX-1 染色体ゲノムに対するサザンハイブリダイゼーション. (社内文書)
 - 41 添付 26:組換え体の残存に関する確認試験. (社内文書)
 - 42 添付 27:AcGO (Lot. No. N0851231R)の試験成績書. (社内文書)
 - 43 ECFA. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing.
 - 44 添付 28: AcGO (Lot. No. N0851231R)の各種マイコトキシン類試験検査証明書. (社内文書)