



府食第493号
平成30年7月24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12月19日付け厚生労働省発食1219第2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「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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

「JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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

JPAN001 株を利用して生産された
グルコアミラーゼ

2018年7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
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	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.....	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な 事項	15
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

<審議の経緯>

- 2017年12月19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1219第2号）、関係書類の接受
- 2017年12月26日 第679回食品安全委員会（要請事項説明）
- 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5月25日 第175回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年6月12日 第700回食品安全委員会（報告）
- 2018年6月13日から7月12日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2018年7月18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7月24日 第706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>

(2018年6月30日まで)	(2018年7月1日から)
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山本 茂貴（委員長代理）
吉田 緑	川西 徹
山本 茂貴	吉田 緑
石井 克枝	香西 みどり
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	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>

中島 春紫（座長）	
小関 良宏（座長代理）	
児玉 浩明（座長代理）	
岡田 由美子	手島 玲子
橘田 和美	樋口 恭子
近藤 一成	山川 隆
鈴木 秀幸	吉川 信幸
柘植 郁哉	

要 約

「JPAN001 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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 niger* BO-1 株を宿主として、*Gloeophyllum trabeum* NN055575 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN001 株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して β -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

「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、「JPAN001 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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：JPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼ
用途：デンプン糖製造時の糖化効率の向上
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 niger* BO-1株を宿主として、*Gloeophyllum trabeum* NN055575株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製したJPAN001株を利用して生産されたグルコアミラーゼである。本添加物は、アミロースやアミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解して β -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造において糖化効率の向上を目的として使用される。

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：グルコアミラーゼ（AMG）

基原：*Aspergillus niger* BO-95株

有効成分：グルコアミラーゼ

IUB No.：EC 3. 2. 1. 3

CAS No.：9032-08-0

(2) 製造方法

AMGは、培養工程及びろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

AMGは、デンプン糖の製造において、デンプンの液化後に生成したデキストリンを糖化してグルコースにまで分解することにより、糖化効率を向上させることを目的として使用される。

(4) 摂取量

AMGが全てのデンプン糖製造に使用され、100%最終製品中に残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.055 mg TOS (Total Organic Solids)/kg 体重/日である（参照1～3）。

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. niger* BO-1 株である。*A. niger* BO-1 株は、自然界から分離された *A. niger* C40-1 株に突然変異誘導を行い、グルコアミラーゼの生産性を向上し、夾雑酵素である α -1,6-トランスグルコシダーゼの生産能を欠失した株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコアミラーゼ (*amgGT*) 遺伝子の供与体は、*G. trabeum* NN055575 株である。選択マーカーであるアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子及びオロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amgGT 遺伝子は、*G. trabeum* NN055575 株の野生型グルコアミラーゼと同一のアミノ酸配列をもつグルコアミラーゼ (AMG-GT) をコードする。*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、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をコードし、選択マーカーに用いた。

amgGT 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットを、インテグラーゼにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入した。

なお、生産菌の作製に当たり、あらかじめ 7 個の遺伝子を欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させているが、このうちセルフクローニングに該当しない 3 か所の遺伝子座では、ORF 検索を行い、安全性を検討した（第 5-2-(2) 参照）。

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. niger 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いる。また、*A. niger* は、日本において黒麹菌として焼酎、食酢等の発酵食品の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. niger は、オクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性があるが、*A. niger* BO-1 株がオクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生しないことは分析により確認されている（参照 4）。

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：AMG-GT

有効成分：グルコアミラーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 3

CAS No. : 9032-08-0

(2) 製造方法

AMG-GT は、JPAN001 株を生産菌として、従来の添加物と同様に、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、2 回の除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

AMG-GT は、デンプン糖製造時の糖化工程において、デキストリンをグルコースにまで分解するために使用される。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

AMG-GT は、従来の AMG と同じくアミロース、アミロペクチン等の多糖類の、 α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -D-グルコースを生成する酵素である。従来の AMG と比較してイソマルトース合成活性が低い。

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

AMG-GT と従来の AMG 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点並びに AMG-GT は AMG と比較してイソマルトース合成活性が低く、グルコアミラーゼ比活性が高い点である（参照 5、6）。

(2) 組換え体と宿主

JPAN001 株と宿主との相違点は、JPAN001 株には *amgGT* 遺伝子が複数コピー導入され、グルコアミラーゼの高生産性を獲得している点、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子を導入している点並びにグルコアミラーゼの生産性を高めるため複数遺伝子を欠失している点である。

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、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. niger* BO-1 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. niger は、病原性で問題となる菌種ではないとされており、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（BSL）1 に相当する

(参照 7)。

A. niger は有害生理活性物質であるオクラトキシン A 及びフモニシン B₂ を産生する可能性が示唆されているが、*A. niger* BO-1 株はこれらのマイコトキシンを産生しないことが確認されている (参照 4)。

A. niger は、アレルギー性において特に問題となる菌種ではないとされているが、*A. niger* 由来の酵素として β -キシロシダーゼ、セリンプロテアーゼ及び 3-フィターゼ B がアレルギーデータベース^aに登録されている。これらの酵素は吸入性アレルギーとして報告されており、*A. niger* 由来の酵素によるアレルギーは、特定職種での高頻度暴露が起因と考えられる。*A. niger* は、国内では焼酎等の製造に安全に使用されてきた経験があるが、これらの酵素を原因とするアレルギーと *A. niger* のアレルギー性との関連性を否定できないことから、リスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分に気をつける必要がある (参照 8)。

以上のことから、適切な環境で扱われている限り、*A. niger* BO-1 株によるアレルギー誘発性の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. niger には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

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. niger 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. niger の近縁種には、日和見感染及び気管支アレルギーの原因菌である *A. fumigatus* や、オクラトキシン産性能を有する *A. carbonarius* 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 pJPV001 の作製には、*E. coli* 由来のプラスミド pBluescript SK-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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

^a WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee 検索日：2016 年 4 月 14 日

- (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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-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 pBluescript SK-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
amgGT 遺伝子の供与体は *G. trabeum* NN055575 株、*amdS* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* Glasgow 野生株、*pyrG* 遺伝子の供与体は *A. nidulans* NRRL1092 株である。
- (2) 安全性に関する事項
G. trabeum は、食経験は知られていないが、担子菌に属する褐色腐朽菌として自然界に広く存在しており、産業上有用な酵素を生産することが報告されている（参照 9）。
A. nidulans は、食経験は知られていないが、*A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする *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。
G. trabeum 及び *A. nidulans* はともに、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する。

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
amgGT 遺伝子は *G. trabeum* NN055575 株のゲノム DNA を鋳型として、*amdS* 遺伝子は *A. nidulans* Glasgow 株のゲノム DNA を鋳型として、*pyrG* 遺伝子は *A. nidulans* NRRL1092 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 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、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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *amgGT* 遺伝子

amgGT 遺伝子が発現する AMG-GT は、アミロース、アミロペクチン等の多糖類の α -1,4-D-グルコシド結合を非還元末端から加水分解し、 β -D-グルコースを生成する。

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

G. trabeum のアレルギー誘発性の可能性は低いとしているが、他の糸状菌同様、本菌を扱うときには孢子が飛散しないように十分気をつける必要がある。

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

AMG-GT 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ない。また、*G. trabeum* のグルコアミラ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^b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。

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

AMG-GT の人工胃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を行った結果、両試験において、試験開始後 0.5 分以内に検出限界以下まで分解されることが示された（参照 10）。

(b) 人工腸液に対する感受性

AMG-GT 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を行った結果、両試験において、AMG-GT は試験開始後 6 時間においても残存することが示された（参照 10）。

(c) 加熱処理に対する感受性

AMG-GT の加熱処理に対する感受性について確認した結果、75～80℃ 30 分で失活することが確認された（参照 11）。

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

AMG-GT 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

^b PubMed、検索日：2017 年 3 月

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 アミノ酸以上の配列で 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として Sch c1 (*Schizophyllum commune* 由来のグルコアミラーゼ) が検出された (参照 12)。

S. commune は、一般的に観察される真正担子菌であり、アレルギー性気管支肺真菌症 (ABPM) 等の特定のアレルギー疾患を引き起こすとの報告があり、アレルゲンとしてグルコアミラーゼ (Sch c1) が同定されている (参照 13)。Sch c1、AMG-GT 及び AMG の構造相同性を調査した結果、AMG-GT 及び AMG は Sch c1 に対して 50%以上の相同性を有することが示された。AMG-GT は人工胃液処理に対する感受性が高いこと、AMG-GT の摂取量は AMG より低いと想定されること等から AMG-GT のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

なお、AMG-GT は、グルコース製造過程のカラム精製工程において除去されるため、AMG-GT が摂取される可能性は低い。

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する酵素であり、アセトアミドの存在下でのみ発現する。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 *pyrG* 遺伝子

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、ウリジン要求性を相補する選択マーカー遺伝子として長年使用されてきた。オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼのアレルギー誘発性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、AMG-GT、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

amgGT 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *NA2* 遺伝子のプロモーター配列である。*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *tef1* 遺伝子のプロモーター配列である。*pyrG* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のプロモーター配列である (参照 14)。

^c The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version15

(2) ターミネーターに関する事項

amgGT 遺伝子及び *amdS* 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーター配列である (参照 14)。*pyrG* 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のターミネーター配列である (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

amgGT 遺伝子の転写を安定化させるため、*A. niger* BO-1 株由来の *payA* 遺伝子の 5' 側非翻訳領域 (*payA* 5'UTR 配列) を用いた。また、*amgGT* 遺伝子の転写産物を安定化させ遺伝子発現量を向上させるため、Tabacco mosaic virus の coat protein 遺伝子の 3' 側非翻訳領域 (*CP*3'UTR 配列) を用いた (参照 14)。

そのほか、インテグラーゼ認識配列 (FRT-F / FRT-F3 配列) が用いられている。

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 pBluescriptSK-に、インテグラーゼ認識配列を両端に配した *amgGT* 遺伝子断片、*FLP* 遺伝子等を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pJPV001 を作製した (参照 14)。

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 pJPV001 の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 14)。

(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

各遺伝子座の挿入部位の上流及び下流領域を含む発現カセット配列について、目的以外のオープンリーディングフレーム (ORF) 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 1,074 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^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列で 35%以上が一致する既知のアレルゲンとして、Der f 15 及び Sch c 1 が見いだされた。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として、Sch c 1 が検出されたが、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 (参照 16)。

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、MvirDB データベース（参照 17）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、6 個の ORF に対して相同性が示されたが、いずれのタンパク質も機能から考えて、それ自体が単独で毒性を有するとの報告はなかった。したがって、アレルギー誘発性及び毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられる。

(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 pJPV001 の FRT-F 配列から FRT-F3 配列までの遺伝子発現カセットを含む領域である。

(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 pJPV001 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

あらかじめインテグラーゼ認識配列を導入した宿主に遺伝子導入用ベクター pJPV001 を導入し、ベクター上の *FLP* 遺伝子が発現する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 *amgGT* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットを宿主ゲノムに挿入した。この際、*amdS* 遺伝子による選抜を行った後に、グルコアミラーゼ活性を指標として形質転換体を選択した。

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 pJPV001 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。このことは、サザンブロット解析により確認されている。

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

JPAN001 株は、*amgGT* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットが導入され、グルコ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させている。

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

各遺伝子座への *amgGT* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセットの挿入を確認するためにサザンブロット解析及び次世代シーケンスによるゲノム解析を行った結果、設計通り全長の発現カセットが挿入された遺伝子座及び 1 つの *amgGT* 遺伝子がループアウトした遺伝子座があることが確認された（参照 18、19）。また、挿入領域近傍の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 19）。

(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

JPAN001 株の染色体の *amgGT* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む発現カセット挿入領域及び隣接する配列の ORF 検索の結果は、第 4-5-(2) に記載のとおりである。

遺伝子の欠失操作を行い、断片が染色体上に残存する 3 つの遺伝子座において、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 289 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^oを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。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、MvirDB データベース(参照 17)を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった(参照 20~22)。

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

AMG-GT の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績があり、また、本製品の原料は Food Chemical Codex (FCC) 等の規格に適合している。

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

AMG-GT 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

AMG-GT は、デンマークで EFSA のガイドラインに準拠した酵素剤として承認を受けているほか、米国では 2015 年に GRAS として認証されている

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、AMG-GT の製剤中には組換え体の DNA が残存しないことが確認された(参照 23)。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AMG-GT の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値及び FCC の規定値を満たしている。したがって、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。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

AMG-GT 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て製造されるため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

AMG-GT の製造原料及び製造方法は従来 of 食品用酵素の製造に使用されているものであり、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は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAN001 株を利用して生産されたグルコアミラーゼ」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. 厚生労働省, 国民健康・栄養調査報告 (平成27年)
2. Typical composition (AMG 300L) (社内文書)
3. Novozymes AMG 300L® for efficient starch saccharification (社内文書)
4. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内文書)
5. Comparison of reverse reaction between AMG-GT and AMG proteins in terms of isomaltose formation (社内文書)
6. The comparison of specific activity AMG and AMG-GT proteins (社内文書)
7. 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程 別冊1「病原体等のBSL分類等」平成22年6月
8. Schuster, E. et al., On the safety of *Aspergillus niger* – a review, Applied Microbiological Biotechnology, 2002, 59, 426-435
9. Rasmussen M.L. et al., Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*, Bioresource Technology, 2010, 101 3526-3533
10. Digestibility of AMG-GT protein in toxbatch PPY35872 (社内文書)
11. Temperature and pH activity and stability profiles of glucoamylase produced by *Aspergillus niger*, strain JPAN001 (社内文書)
12. Assessment of sequence homology of glucoamylase expressed by JPAN001 to allergens (社内文書)
13. Toyotome T. et al., Glucoamylase is a major allergen of *Schizophyllum commune*, Clinical & Experimental Allergy, 2013, 44, 450-457
14. 遺伝子導入用ベクターpJPV001の構成及び塩基配列 (社内文書)
15. *A. niger* BO-1株における欠失導入用ベクターを用いたDNA欠失の概要 (社内文書)
16. McCall C. et al., Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs, Veterinary Immunology and immunopathology, 2001, 78, 231-247
17. Zhou C. E. et al., MvirDB - a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications, Nucleic Acids Research, 2007, 35, Database issue, D391-D394
18. サザンブロット解析による発現カセット挿入の確認 (社内文書)
19. JPAN001株の遺伝子導入領域におけるDNA塩基配列 (社内文書)
20. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
21. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
22. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of *** to proteins from MvirDB and allergen (社内文書)

23. Analysis of residual DNA in PPY35872 by means of dot blot hybridization (社内文書)