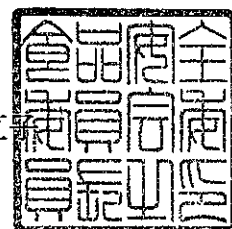




府食第672号  
平成19年7月12日

厚生労働大臣  
柳澤 伯夫 殿

食品安全委員会  
委員長代理 小泉 直



#### 食品健康影響評価の結果について

平成19年1月29日付け厚生労働省発食安第0129011号をもって貴省から当委員会に対し意見を求められた添加物「プロテアーゼ」(申請者:DSM ニュートリション ジャパン株式会社)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)の評価対象ではないと判断しました。  
なお、審議結果については、別添のとおりです。

# 遺伝子組換え食品等評価書

## プロテアーゼ

2007年7月

食品安全委員会

# 目次

	頁
審議の経緯	1
食品安全委員会委員名簿	1
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	1
要約	2
プロテアーゼに係る食品健康影響評価に関する審議結果	3
. はじめに	3
. 申請添加物の概要	3
. 対象添加物に該当するか否かについて	3
1 組換え体 <i>A.niger</i> GEP-44 株の構築について	3
2 「組換え体株 GEP-44 株」が「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することについて	4
食品健康影響評価結果	4
参考文献	4

## 審議の経緯

平成19年1月29日	厚生労働大臣から遺伝子組換え食品の安全性確認に係る食品健康影響評価について要請、関係書類の受理
平成19年2月1日	第176回食品安全委員会（要請事項説明）
平成19年2月13日	第45回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年5月25日	第48回遺伝子組換え食品等専門調査会
平成19年6月7日	第193回食品安全委員会（報告）
平成19年6月7日～7月6日	国民からの意見・情報の募集
平成19年7月10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
平成19年7月12日	第198回食品安全委員会（報告） 同日付で食品安全委員会委員長から厚生労働大臣へ通知

## 食品安全委員会委員

平成18年12月21日から  
委員長 見上 彪  
委員長代理\*1 小泉直子  
長尾 拓  
野村一正  
畑江敬子  
廣瀬雅雄\*2  
本間清一

\*1:平成19年2月1日から

\*2:平成19年4月1日から

## 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

座長	早川堯夫	
座長代理	澤田純一	
	五十君静信	手島玲子
	池上幸江	丹生谷博
	今井田克己	室伏きみ子
	宇理須厚雄	山川隆
	小関良宏	山崎壮
	橘田和美	渡邊雄一郎
	澁谷直人	

## 要 約

### はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、「プロテアーゼ」(*Aspergillus niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ)の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。

### 申請添加物の概要

- 品 目 : プロテアーゼ (*A. niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ)
- 性 質 : 生産性向上
- 申請者 : DSM ニュートリション ジャパン株式会社
- 開発者 : DSM 社

*A. niger* GEP-44 株由来プロテアーゼは、*A. niger* GAM-53 株由来の 7 箇所のグルコアミラーゼをコードする *glaA* 遺伝子を欠失させ、欠失させた箇所に、プロテアーゼをコードする *gepA* 遺伝子を相同組換え法を用いて導入して得られた GEP-44 株を生産菌として製造されるプロテアーゼである。*A. niger* GEP-44 株由来プロテアーゼの製造方法は、従来からの生産菌株を用いた場合と同様な方法で抽出・精製される。

### 食品健康影響評価結果

「GEP-44 株由来のプロテアーゼ」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)の第 1 章 総則 第 3 対象となる添加物及び目的のうち、「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することから、本基準の対象ではないと判断される。

## 遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物「プロテアーゼ」 に係る食品健康影響評価に関する審議結果

はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、「プロテアーゼ」(*Aspergillus niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ)の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 19 年 1 月 29 日、関係書類を受理)

申請添加物の概要

品 目 : プロテアーゼ (*A.niger* GEP-44 株由来のプロテアーゼ)  
性 質 : 生産性向上  
申請者 : DSM ニュートリション ジャパン株式会社  
開発者 : DSM 社

*A.niger* GEP-44 株由来プロテアーゼは、*A.niger* GAM-53 株由来の 7 箇所のグルコアミラーゼをコードする *glaA* 遺伝子を欠失させ、欠失させた箇所に、プロテアーゼをコードする *gepA* 遺伝子を相同組換え法を用いて導入して得られた GEP-44 株を生産菌として製造されるプロテアーゼである。*A.niger* GEP-44 株由来プロテアーゼの製造方法は、従来からの生産菌株を用いた場合と同様な方法で抽出・精製される。

従来からの生産菌株を用いたプロテアーゼは、*A.niger* の培養液から得られる酵素であり、各種たん白質の分解等に用いられ、食品添加物(既存添加物)として幅広い食品に使われている。(参考文献 1)

GEP-44 の宿主は、*A.niger* 野生株 NRRL3122 から化学的変異処理により、グルコアミラーゼをコードする *glaA* 遺伝子のコピー数を多重化(7 コピー)させた *A.niger* GAM-53 株である。なお、*A.niger* GAM-53 株は、オランダ菌株コレクション Centraalbureau voor Schimmelcultures(CBS)(菌類培養中央研究所)において、*A.niger* と同定されている。(参考文献 2)

また、挿入 DNA の供与体は、従来型プロテアーゼ生産株の *A.niger* G-306 株である。(参考文献 3)

対象添加物に該当するか否かについて

### 1. 組換え体 *A.niger* GEP-44 株の構築について

宿主は、*A.niger* 野生株 NRRL3122 由来の GAM-53 株である。

宿主 *A.niger* GAM-53 株から、同株由来の 7 箇所のグルコアミラーゼをコードする *glaA* 遺伝子及びプロモーターのコード領域のほとんどを欠失させた *gla* 座を有する 502 株を構築した。(参考文献 4,5) これらの 7 箇所の *gla* 座は、各々異なる制限酵素部位で標識した。(参考文献 6) この 7 箇所の *gla* 座は、「プラグ部位」とよばれ、種々の遺伝子を含む発現ユニットを組み込むことが可能である。得られた 502 株を化学的に処理し 508 株を構築した。

構築された 508 株に、プロテアーゼをコードする *gepA* 遺伝子カセット及びアセトアミダーゼをコードしている *amdS* 遺伝子カセットを混合した DNA 溶液を混合し形質転換を行った。得られた形

質転換株の中から、*Bam*HI- *gla* 座に *amdS* と *gpaA* 遺伝子カセットが直列に組み込まれている状態で多重化して存在する株を *gla* 及び *gla* の特異的プライマーを用いる PCR 分析により選抜し、712-1 株を構築した。

構築された 712-1 株を 1 回交差相同組換えすることにより、*amdS* 遺伝子が除去された 712-2 株を構築した。

構築された 712-2 株に存在する多重化した *gpaA* 遺伝子カセットを有する *Bam*HI- *gla* 座全体が、更に菌体内で自然に起こった遺伝子変換により、他の制限酵素部位を有する *gla* 座を置換していき、結果として *gpaA* 遺伝子が更に多重化され、生産株である GEP-44 株が得られた。(参考文献6)

2. 「組換え体株 GEP-44 株」が「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することについて

(1) 712-2 株中から遺伝子挿入に用いたベクター由来の DNA 及び *amdS* 遺伝子が除去されていることの確認について

サザンブロット分析により、712-2 株から、発現ベクターである pTZ18R ベクター由来の DNA 及び *amdS* 遺伝子が除去されているかを確認するために、pTZ18R ベクターの線状化 DNA 及び *amdS* 遺伝子をプローブとして用いて確認したところ、712-2 株中にベクター由来の DNA 及び *amdS* 遺伝子が含まれていないことが確認された。

(2) 組換え体株 GEP-44 株に存在する塩基配列について

712-2 株に存在する多重化した *gpaA* 遺伝子カセットを有する *Bam*HI- *gla* 座全体が、更に菌体内で自然に起こった遺伝子変換により、他の制限酵素部位を有する *gla* 座を置換していき、結果として *gpaA* 遺伝子が更に多重化され、生産株である GEP-44 株が得られた。(参考文献6)

従って、その塩基配列は全て *A.niger* 由来である。また、目的以外のタンパク質を組換え体株内で発現するオープンリーディングフレームは含まれていない。

以上に示された科学的知見から、本組換え体生産株 GEP-44 株は発現ベクター及び *amdS* 遺伝子を含んでいないこと、宿主及び挿入遺伝子の供与体は、いずれも *A.niger* 由来であることが、オランダ菌株コレクション(CBS)により確認された。

#### 食品健康影響評価結果

「GEP-44 株由来のプロテアーゼ」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)の第 1 章 総則 第 3 対象となる添加物及び目的のうち、「組換え DNA 技術によって最終的に宿主に導入された DNA が、当該微生物と分類学上の同一の種に属する微生物の DNA のみである場合」に該当することから、本基準の対象ではないと判断される。

#### 参考文献

1. 既存添加物名簿収載品目リスト注解書. 日本食品添加物協会(1999)

2. Identification service statement:Centraalbureau Voor Schimmelcultures(1994)
3. Identification service statement:Centraalbureau Voor Schimmelcultures(2000)
4. Boel E, Hjort I, Svensson B, Norris F, Norris KE, Fill NP. Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs. *The EMBO Journal*(1984)3:1097-1102.
5. Nunberg JH, Meade JH, Cole G, Lawyer FC, McCabe P, Schweickart V, Tal R, Wittman VP, Flatgaard JE, Innis M. Molecular Cloning and Characterization of the Glucoamylase Gene of *Aspergillus awamori*.*Molecular and Cellular Biology*(1984)4:2306-2315.
6. van Dijk PWM, Selten GCM, Hempenius RA. On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strain. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*(2003)38:27-35.