



府食第321号

平成29年5月9日

厚生労働大臣
塩崎 恭久 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1月26日付け厚生労働省発生食0126第1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食品「NZYM-BE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

「NZYM-BE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

NZYM-BE 株を利用して生産された
グルコアミラーゼ

2017年5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	5
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	8
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	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	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	10
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	12
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	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.....	16
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	16
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
1. 変異原性試験	16
2. 13週間強制経口投与毒性試験	16
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	17
<参照>	18

<審議の経緯>

- 2017年1月26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0126第1号）、関係書類の接受
- 2017年1月31日 第636回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2017年2月17日 第157回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2017年3月14日 第642回食品安全委員会（報告）
- 2017年3月15日から4月13日まで 国民からの意見・情報の募集
- 2017年5月2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
- 2017年5月9日 第648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>

澤田 純一（座長）
小関 良宏（座長代理）
岡田 由美子 中島 春紫
橘田 和美 樋口 恭子
児玉 浩明 飯 哲夫
近藤 一成 山川 隆
柘植 郁哉 和久井 信
手島 玲子

要 約

「NZYM-BE 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、グルコアミラーゼの生産性を高めるために、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Rasamsonia emersonii* CBS759.71 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した NZYM-BE 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、 β -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造の糖化工程に使用される。

「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、「NZYM-BE 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

品 目：NZYM-BE 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加工助剤
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、グルコアミラーゼの生産性を高めるために、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Rasamsonia emersonii* CBS759.71 株由来のグルコアミラーゼ遺伝子を導入して作製した NZYM-BE 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、 β -D-グルコースを生成する酵素であり、デンプン糖製造の糖化工程に使用される。

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、デンプンからデンプン糖を製造する際に加工助剤として使用される。デンプン糖製造は、液化、糖化及び精製工程から成り、AMG は糖化工程において添加され、デキストリンをグルコースまで分解する。

(4) 摂取量

AMG が全てのデンプン糖製造に用いられ、100%残存すると仮定した場合の一日最大摂取量は 0.052 mg TOS /日/kg 体重である（参照 1、2、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 株の突然変異株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

グルコアミラーゼ遺伝子 (*amgT* 遺伝子) の供与体は、*R. emersonii* CBS759.71 株である。酸性アミラーゼ (*asaA* 遺伝子) 及び選抜マーカー遺伝子 (*amdS* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子) の供与体は、それぞれ *A. niger* BO-1 株、*A. nidulans* Glasgow 野生株、*A. oryzae* IF04177 株及び *Saccharomyces cerevisiae* FL100 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amgT 遺伝子は、MG-T をコードする。AMG-T は、*R. emersonii* CBS759.71 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。*asaA* 遺伝子は、酸性アミラーゼをコードするが、最終製剤の分析においては検出されず、ほとんど含まれていないと考えられる。*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、選抜マーカーに用いた。*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、大腸菌における選抜マーカーとして用いた。

A. niger BO-1 株染色体に、*amgT/asaA/amdS* 遺伝子カセットを含む DNA 断片及び *amgT/pyrG/URA3* 遺伝子カセットを含む導入用ベクター pHUda211 を、プロトプラスト法を用いて導入した。

なお、生産菌の作製に当たり、あらかじめいくつか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、本操作はセルフクローニングに該当する (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. niger は、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。また、*A. niger* は、日本においても黒麹菌として焼酎及び食酢など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、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 5)。

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-T

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-T は、NZYM-BE 株を生産菌として製造される。製造方法は、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、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-T 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剤の添加物との比較

AMG-T は、アミロースやアミロペクチン等の 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。AMG-T は、従来剤の添加物である AMG と同じ反応特異性を持つが、AMG と比較してタンパク質当たりの酵素活性が 2.5 倍以上である（参照 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剤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剤の添加物

AMG-T と従来剤の添加物である AMG との相違点は、遺伝子の供与体が異なり、アミノ酸配列の相同性が 64% である点、AMG-T は AMG に比べ 2.5 倍以上高い比活性を持つ点である。

(2) 組換え体と宿主

NZYM-BE 株と宿主との相違点は、NZYM-BE 株には *amgT* 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である。また、*asaA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の導入並びにグルコアミラーゼの生産性を高めるため、いくつかの遺伝子を欠失させている点が相違点である。

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剤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。

本株は、自然界から単離された *A. niger* C40-1 株の突然変異株であり、酵素生産の生産菌として長年の使用実績がある。*A. niger* BO-1 株の突然変異株である

A. niger BO-95 株は、安全性審査の終了した AMG-E（グルコアミラーゼ）の宿主として用いられている。

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. niger は広く自然界に存在しており、特に病原性で問題となる菌種ではないとされているが、免疫障害を有する患者に、まれに重篤な肺感染症などの疾患を引き起こすという報告がある（参照 7）。*A. niger* は国立感染症研究所の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）2 及び 3 に相当する病原体等に分類されていない。また、ヒト及び動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられるので、病原体等の BSL1 に相当すると考えられる（参照 8）。

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あるが、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 5）。

A. niger 由来の酵素である β -xylosidase、セリンプロテアーゼ及び 3-phytase B がアレルゲンデータベースに登録されている（参照 9）。これらの酵素は吸入性アレルゲンとして報告されており、喘息患者の血清から特異 IgE が検出されている。また、製パン現場及び家畜飼料工場において産業用酵素として使用されていること、アレルギー疾患の関連が報告されていることから（参照 10、11）、*A. niger* 由来の酵素によるとして報告されたアレルギーは、特定職種での高頻度暴露が起因と考えられる。一方で、*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緯がある。そのため、この三つ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は否定できないが、リスクの低減のため、他の糸状菌と同様、本菌を扱う時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。

以上のことから、本菌が適切な環境で扱われている限り、*A. niger* 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 が腸管内に定着することは知られていない。

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. 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. carbonarius* は有害生理活性物質であるオクラトキシン産性能を有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pHUda81 及び pHUda211 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
amgT 遺伝子の供与体は、*R. emersonii* CBS759.71 株である。*asaA* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子、*amdS* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. niger* BO-1 株、*A. oryzae* IF04177 株、*A. nidulans* Glasgow 野生株及び *S. cerevisiae* FL100 株である。
- (2) 安全性に関する事項
R. emersonii は、 β -グルカナーゼ、セルラーゼ及びキシラナーゼの生産菌として使用されてきた実績がある。また、プーアル茶の発酵パイル中に存在することが知られている（参照 12）。*A. niger* は、広く自然界に存在しており、特に病原性で問題となる菌種ではないとされている。*A. oryzae* は、広く自然界に存在しており、国内で麹菌として味噌及び日本酒などの発酵食品の製造に広く用いられている。*A. nidulans* の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。*S. cerevisiae* は、パン酵母やアルコール発酵用酵母と

して食品製造に安全に使われてきた歴史がある。*R. emersonii*、*A. niger*、*A. oryzae*、*A. nidulans* 及び *S. cerevisiae* は、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

amgT 遺伝子は、*R. emersonii* CBS759.71 株のゲノム DNA を鋳型とし、*asaA* 遺伝子、*amdS* 遺伝子、*URA3* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子は、それぞれ *A. niger* BO-1 株、*A. nidulans* Glasgow 株、*S. cerevisiae* FL100 株及び *A. oryzae* IF04177 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（参照 13）。

（3）挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *amgT* 遺伝子

amgT 遺伝子が発現する AMG-T 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、 β -グルコースを生成する。

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

R. emersonii による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。また、食品用酵素の生産菌として安全に用いられてきた実績がある。なお、*R. emersonii* 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^aを行った結果、ヒットする文献はなかった。

2) 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-T 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。

3) 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

①人工胃液に対する感受性

AMG-T 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、試験開始後 0.5 分以内に検出限界以下のレベルまで分解されることが示された（参照

^a データベース：PubMed、2016年2月

14)。

②人工腸液に対する感受性

AMG-T 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、AMG-T 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 14)。

4) 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-T 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^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す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。

また、連続する 8 アミノ酸以上の配列が AMG-T と Sch c1 で一致していた (参照 15)。

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る (参照 16)。このうち、アレルゲンとしてはグルコアミラーゼ (Sch c1) が同定されている (参照 17)。Sch c1、AMG-T 及び AMG の構造相同性を調査した結果、AMG-T 及び AMG は Sch c1 に対して同程度の相同性 (51 及び 54%) を有することが示された。同様に Sch c1 との構造相同性が高い AMG は国内外にて長年市販品として使用されていること、AMG-T は人工胃液処理に対する感受性が高いことなどから AMG-T のアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられるとしている。

なお、AMG-T が食品製造に用いられる際、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-T が、これを利用した食品を通じて摂取される可能性は低い。

・ *asaA* 遺伝子

asaA 遺伝子は、酸性アミラーゼをコードする。*A. niger* の *asaA* 遺伝子は、食品用遺伝子組換え酵素の生産菌ゲノムに存在し、長年使用されてきた実績があり、アレルギー誘発性及び毒性を有するとは考えられない。

・ *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを分解し、アセトアミドを唯一の窒素源として利用できることにより、選抜マーカーとして使用された。*amdS* 遺伝子は、マーカー遺伝子として長年使用されてきた実績があるが、アセトアミダーゼについて、アレルギー誘発性を示す報告はない。

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース (FARRP version 15)

- ・ *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として使用されている。*pyrG* 遺伝子は、マーカー遺伝子として長年使用されてきた実績があるが、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘発性を示す報告はない。

- ・ *URA3* 遺伝子

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、大腸菌での選択マーカーとして使用された。*URA3* 遺伝子は、マーカー遺伝子として長年使用されてきた実績があるが、オロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼについて、アレルギー誘発性を示す報告はない。

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

amgT 遺伝子のプロモーターは、BO-1 株由来の *NA2* 遺伝子のプロモーター配列である。*asaA* 遺伝子のプロモーターは、BO-1 株由来の *asaA* 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. nidulans* Glasgow 野生株由来の *amdS* 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. oryzae* 野生株由来の *pyrG* 遺伝子の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 *URA3* 遺伝子のプロモーター配列である（参照 13）。

(2) ターミネーターに関する事項

amgT 遺伝子及び *amdS* 遺伝子のターミネーターは、BO-1 株由来の *AMG* 遺伝子のターミネーター配列である。*asaA* 遺伝子のターミネーターは、BO-1 株由来の *asaA* 遺伝子のターミネーター配列である。*pyrG* 遺伝子のターミネーターは、*A. oryzae* 野生株由来の *pyrG* 遺伝子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 *URA3* 遺伝子のターミネーター配列である（参照 13）。

(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 の組込方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pHUda81 は、プラスミド pUC19 に *amgT/asaA/ amdS* 遺伝子発現カセット（それぞれのプロモーター配列、コーディング配列及びターミネーター配列を連結させて構築）を挿入することによって作製された。遺伝子導入用ベクター pHUda211 は、プラスミド pUC19 に、*amgT/pyrG/*

URA3 遺伝子発現カセット（それぞれのプロモーター配列、コーディング配列及びターミネーター配列を連結させて構築）を挿入することによって作製された（参照 18）。

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 pHUda81 及び pHUda211 の塩基数、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 13）。

(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 pHUda81 及び pHUda211 全体について目的以外のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれるかどうか六つの読み枠において ORF 検索を行った。その結果、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 426 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^bを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上が一致する、あるいは連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 19、20）。

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 21）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、遺伝子導入前に除去される配列に含まれる ORF を除いて、データベースにあるタンパク質と相同性を有する 2 個の ORF が検出された。それぞれ、2 個のタンパク質、Nuclear antigen-3B 及び FimV（参照 22、23）、並びに 1 個のタンパク質、Putative glucosyltransferase との相同性が示された。いずれのタンパク質もそれらの機能から考えて、それ自体が単独で毒性を有する可能性は低いと考えられたとしている。

(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 pHUda81 由来の *amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセット領域及び遺伝子導入用ベクター pHUda211 の全領域である。

(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 pHUda81 及び pHUda211 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

amgT/ asaA/ amdS 遺伝子発現カセット及び pHUda211 を宿主ゲノムへプロトプラスト形質転換法を用いて導入した。

amgT/ asaA/ amdS 遺伝子発現カセットについては、*amdS* 遺伝子を選抜マーカー遺伝子として、アセトアミド存在下での生育を指標に導入クローンを選抜した。pHUda211 については、*pyrG* 遺伝子を選抜マーカー遺伝子として、ウリジン非存在下での生育を指標に導入クローンを選抜した。

amgT/ asaA/ amdS 遺伝子発現カセット及び pHUda211 はいずれも宿主で機能する自律複製因子を持たないため、染色体に導入されるものだけが菌体内で維持される。*amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセットは制限酵素消化末端を末端として、pHUda211 はいずれかの位置を末端として、染色体上の任意の位置に多コピーでタンデムに染色体へ導入される（参照 24、25）。

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pHUda81 はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、制限酵素処理によって当該遺伝子は除去されている。遺伝子導入用ベクターpHUda211 は抗生物質耐性マーカー遺伝子を持たない。したがって、生産菌には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在していない。

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

NZYM-BE 株は、*amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセット及び pHUda211 が導入され、グルコアミラーゼの生産性を高めるため、いくつか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

NZYM-BE 株染色体の *amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセット及び pHUda211 の導入部位を調べるために、本株について全ゲノム解析を行った。その結果、宿主ゲノムのそれぞれ別の1箇所に、pHUda211 及び *amgT/asaA/ amdS* 遺伝子発現カセットが多コピーでタンデムに挿入されていることが判明したが、遺伝子導入領域の全配列の解読はできなかった。pHUda211 及び *amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセットのそれぞれの導入位置は、共に機能未知の遺伝子間の領域に位置しており、遺伝子導入により内在性遺伝子は破壊されていないと考えられる。また、導入領域近傍の制限酵素による切断地図及び塩基配列は示されている（参照 26）。

定量 PCR 法を用いてコピー数を解析した結果、複数コピーの *amgT* 遺伝子が導入されていると推定された（参照 27）。

- (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

NZYM-BE 株染色体の *amgT/ asaA/ amdS* 遺伝子発現カセット及び pHUda211 の導入部位のそれぞれ 5' 側接合領域及び 3' 側接合領域における ORF 検索を行った。

その結果、六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 188 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^bを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上が一致するあるいは連続した 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 21) を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、3 個の ORF にデータベースのタンパク質である M protein, serotype 24、Epstein-Barr nuclear antigen 2 及び Mannosyltransferase との相同性が認められたが、それらのタンパク質の機能から考えて、それ自体単独では毒性を有する可能性は低いとしている (参照 28)。

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-T の製造原料及び製造器材は、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、また、本製品の原料は、Food Chemical Codex (FCC) の食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

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-T の製造原料及び製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に安全に用いられている実績を有する。

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-T は、2004 年からフランス及びアメリカなどにおいて使用されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットプロット分析により、AMG-T の製剤中には組換え DNA が残存しないことが確認された (参照 29)。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AMG-T 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-T の精製は、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。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

AMG-T 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、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

(参考)

AMG-T の製造過程における除菌ろ過後の培養液を濃縮したものを被験物質として用いた、変異原性試験及び 13 週間強制経口投与毒性試験に関するデータを確認した。

1. 変異原性試験

(1) 復帰突然変異試験

細菌 (*Salmonella typhimurium* TA98、TA100、TA1535 及び TA1537 株並びに *E. coli* WP2uvrApKM101 株) を用いた復帰突然変異試験を、0、156、313、625、1250、2500 又は 5000 µg/ml の処理濃度にて実施した。その結果、代謝活性化系の有無に関わらず被験物質に関連した異常は認められなかった (参照 30)。

(2) *in vitro* 染色体異常試験

ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験 (最高用量 5,000 µg/ml) を行った結果、代謝活性化系の有無に関わらず被験物質に関連した異常は認められなかった (参照 31)。

2. 13 週間強制経口投与毒性試験

CD ラット (1 群雄雌各 10 匹) に、被験物質を 0.15、0.48 又は 1.47 g TOS/kg 体重/日で 13 週間強制経口投与し、体重及び摂餌量/摂水量の測定、眼科学的検査、血液検査、血液生化学検査、病理組織学的検査等を行った。

その結果、統計学的有意差は認められないが、検体投与との関連が示唆される変化として、中用量投与群及び高用量投与群の雄で副腎皮質細胞の空胞化の発生頻度及びその程度にわずかな増加が認められた。しかし、この変化は炎症や他の変化を伴わず、雌で見られないことから毒性学的意義のある変化とは考えられなかったとしている。したがって、本試験の NOAEL (無毒性量) は、最高用量の 1.47 g TOS/kg 体重/日としている (参照 32)。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「NZYM-BE 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. Typical composition: AMG 300L (社内報告書)
2. Novozymes AMG 300L for efficient starch saccharification (Application sheet) (社内報告書2)
3. 平成26年国民健康・栄養調査報告 (抜粋、厚生労働省)
4. *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 (社内報告書)
5. Analysis of selected strains derived from *A. niger* C40-1 for production of mycotoxins (社内報告書)
6. The comparison of specific activity of AMG and AMG-T proteins (社内報告書5)
7. Schuster E. *et al.*, On the safety of *Aspergillus niger* – a review. Applied Microbiological Biotechnology, 59, 426-435 (2002)
8. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (2010年)
9. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee Allergen nomenclature (*Aspergillus niger*: 2016)
10. Sander I. *et al.*, Allergy to *Aspergillus* –derived enzymes in the baking industry: Identification of β -xylosidase from *Aspergillus niger* as a new allergen (Asp n 14). J. Allergy. Clin. Immunol. 102(2), 256-264 (1998)
11. Shen H. *et al.*, The importance of Serin Proteinases as Aeroallergens Associated with Asthma. Int. Arch. Allergy. Immunol. 119, 259-264 (1999)
12. Zhaang W. *et al.*, Characterization of thermophilic fungal community associated with pile fermentation of Pu-erh tea. International Journal of Food Microbiology, 227, 29-33 (2016)
13. 遺伝子導入ベクターpHUda81並びに pHUda211、及びNZYM-BE株の遺伝子導入領域におけるDNA塩基配列並びに構成 (社内報告書)
14. Digestibility of AMG-T protein in product formulation (社内報告書)
15. Sequence homology of glucoamylase expressed by NZYM-BE to allergens (社内報告書)
16. 亀井ら 臨床検体より *Schizophyllum commune*が分離された症例の検討. 日本医真菌学界雑誌, 40, 175-181 (1999)
17. Toyotome T. *et al.*, Glucoamylase is a major allergen of *Schizophyllum commune*. Clinical & Experimental Allergy, 44, 450-457 (2013)
18. Outline of pHUda81 and pHUda211 construction (社内報告書)
19. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pHUda81 on the genome of NZYM-BE to proteins from MvirDB and allergens (社内報告書)
20. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pHUda211 on the genome of NZYM-BE to proteins from MvirDB and allergens (社内報告書)

21. 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*, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
22. White R. E. *et al.*, EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Investigation*, 122(4), 1487-1502 (2012)
23. Wehbi H. *et al.*, The Peptidoglycan-Binding Protein FimV promotes Assembly of the *Pseudomonas aeruginosa* Type IV Pilus Secretin. *J. Bacteriol.* 193(2), 540-550 (2011)
24. 五味 カビの形質転換系の開発とその利用. *化学と生物* 28, 91-100 (1990)
25. Kelly J. M. *et al.*, Transformation of *Aspergillus niger* by the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *The EMBO J.* 4(2) 475-479 (1985)
26. NZYM-BE株の遺伝子導入領域における制限酵素地図 (社内報告書 1 2)
27. Copy number determination of *AMG-T* gene in NZYM-BE strain (社内報告書)
28. Sequence homology of ORFs in the flanking regions of the inserted expression plasmid on the genome of NZYM-BE to proteins from MvirDB and allergens (pHUda81) (社内報告書)
29. The analysis of residual DNA in AMG-T' s product formulation by means of dot blot hybridization (社内報告書)
30. Amyloglucosidase PPY32789: Test for mutagenic activity with strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (社内報告書)
31. Induction of micronuclei in cultured human peripheral blood lymphocytes (社内報告書)
32. T-AMG, PPY 24900: Toxicity study by oral administration to CD rats for 13 weeks (社内報告書)