

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

DIDK-0176 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ

令和5年（2023年）2月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

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 of 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	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ーを含む。）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ー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	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
6. DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
第5. 組換え体に関する事項	12
1. 宿主との差異に関する事項	12
2. 遺伝子導入に関する事項	12

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	14
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	14
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	15
Ⅲ． 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

<審議の経緯>

2021年11月8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1105第2号）、関係書類の接受

2021年11月16日 第839回食品安全委員会（要請事項説明）

2022年1月28日 第221回遺伝子組換え食品等専門調査会

2022年11月28日 第230回遺伝子組換え食品等専門調査会

2023年2月7日 第888回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

山本 茂貴（委員長）

浅野 哲（委員長代理 第一順位）

川西 徹（委員長代理 第二順位）

脇 昌子（委員長代理 第三順位）

香西 みどり

松永 和紀

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>

2022年3月31日まで

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 小野 竜一

岡田 由美子 近藤 一成

小関 良宏 樋口 恭子

小野 道之 藤原 すみれ

2022年4月1日から

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 佐々木 伸大

岡田 由美子 近藤 一成

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

<第221回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

<第230回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

要 約

「DIDK-0176 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Ogataea polymorpha* RB11 株を宿主として、*Fusarium heterosporum* 株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製された DIDK-0176 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、ケーキ製造における品質改善に使用される。

「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。

以上のことから、「DIDK-0176 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」は、人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

(申請内容)

名称：DIDK-0176 株を利用して生産されたホスホリパーゼ

用途：ケーキ製造における品質改善

申請者：ダニスコジャパン株式会社

開発者：Danisco US, Inc. (米国)

本添加物は、*Ogataea polymorpha* RB11 株を宿主として、*Fusarium heterosporum* 株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製された DIDK-0176 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、ケーキ製造における品質改善に使用される。

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：ホスホリパーゼ

生産菌：*Aspergillus niger*

有効成分：ホスホリパーゼ A1

EC No.：EC 3.1.1.32

CAS No.：9043-29-2

(2) 製造方法

ホスホリパーゼ A1 は、培養工程、ろ過等の製造工程を経た上で、製剤化される。なお、生産菌及び菌体成分は、ろ過等の精製工程を経て除去される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼ A1 は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するアシルヒドロラーゼである。ホスホリパーゼ A1 には、ホスホリパーゼ活性と共に、油脂（トリアシルグリセロール）を加水分解するリパーゼ活性を示すものがある。

ホスホリパーゼ A1 は、植物油の精製、製パン・製菓などに使用される。

(4) 摂取量

既存のホスホリパーゼ A1 製品が全て本添加物を用いた製品に置き換わり、

全ての「ケーキ・ペストリー類」^aの製造に使用され、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、0.0012 mg TOS (Total Organic Solids) /kg 体重/日である。

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、*O. polymorpha* RB11 株である。本菌株は、メタノール資化酵母であり、メタノール資化分野の研究における有用な菌株である（参照 1、2、3）。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ A1 (*KLM1*) 遺伝子の供与体は、*F. heterosporum* である。
URA3 遺伝子の供与体は、*Saccharomyces cerevisiae* である。

プロモーター配列、ターミネーター配列及び遺伝子導入用ベクター pB14-CBSynt の複製に必要な *HARS1* 配列（自律複製配列）の供与体は、宿主 *O. polymorpha* RB11 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

KLM1 遺伝子は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するホスホリパーゼ A1 である *KLM1* をコードする。

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、選択マーカーとして用いた。*URA3* 遺伝子、*HARS1* 配列（宿主由来の自律複製配列）及び *KLM1* 遺伝子発現カセットを含む導入用ベクター全体を電気穿孔法にて宿主に導入した。

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

O. polymorpha は、異種タンパク質の生産に産業上利用されている酵母である。また、B 型肝炎ワクチン等の医薬品の製造に用いられている。（参照 4）

4. 宿主の構成成分等に関する資料

O. polymorpha は、国立感染症研究所病原体等安全管理規定においてバイオセーフティレベル（以下「BSL」という。）1 に相当する。（参照 5）

^a 平成 30 年「国民健康・栄養調査報告」食品群別摂取量の食品分類

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：POWERBake

有効成分：ホスホリパーゼ A1 (KLM1)

EC No. : EC 3.1.1.32

CAS No. : 160611-47-2

(2) 製造方法

KLM1 は、DIDK-0176 株を生産菌として、従来のホスホリパーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の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。DIDK-0176 株はメタノール資化性酵母であるが、その培養では炭素源として、メタノールではなくグリセリンを用いている。(参照 6、7)

(3) 用途及び使用形態

KLM1 の用途及び使用形態は、従来のホスホリパーゼ A1 と同様に、ケーキの製造において、品質改善を目的として使用される。特にスポンジケーキの製造に使用すると、ケーキの容積が増加し、柔らかさが向上する。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

KLM1 は、従来のホスホリパーゼ A1 と同様に、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解する。

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

KLM1 と従来のホスホリパーゼ A1 との相違点は、基原、アミノ酸配列、至適 pH 及び至適温度である。

(2) 組換え体と宿主

DIDK-0176 株と宿主との相違点は、DIDK-0176 株は *KLM1* 遺伝子が導入されており、KLM1 生産能を獲得している点及び *URA3* 遺伝子の導入によりウラシル栄養非要求性である点である。

1 から 6 までから、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、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、*O. polymorpha* RB11 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

O. polymorpha が病原性を有する、及び有害生理活性物質を生産するという報告はない。国立感染症研究所病原体等安全管理規程の BSL1 に該当する（参照 5）。米国では、*O. polymorpha* RB11 株の野生株 *O. polymorpha* CBS4732 株は、ATCC に寄託され（ATCC34483）、同規程の BSL1 に相当する（参照 8）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

O. polymorpha には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない。

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

O. polymorpha には、病原性を有する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

Ogataea 属に関して近縁種の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する報告はない。

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 pB14-CBSynt の作製には、pB14 が用いられた。pB14 の構築には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 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 pB14 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 pB14 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 pB14 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 pB14 には、薬剤耐性遺伝子は含まれていない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pB14 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 pB14 は、pBR322 に由来する複製開始起点を含むが、生産菌では機能しない。また、宿主由来の *HARS1* 自律複製配列を含むため、*O. polymorpha* で増殖可能である。（参照 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

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

KLM1 遺伝子及び *URA3* 遺伝子の供与体は、それぞれ *F. heterosporum* 及び *S. cerevisiae* である。プロモーター配列、ターミネーター配列及び *HARS1* 配列（自律複製配列）の供与体は、宿主 *O. polymorpha* RB11 株である。

(2) 安全性に関する事項

F. heterosporum は、オランダのヴェステルダイク菌類多様性研究所において BSL1 に分類されている（参照 10）。

S. cerevisiae は、アルコール製造及びパンの製造に長年にわたり用いられてきた。

F. heterosporum 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。（参照 5）

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又は合成方法に関する事項

KLM1 遺伝子は、*F. heterosporum* の培養物よりホスホリパーゼ活性を持つタンパク質を分離してアミノ酸配列を決定し、その情報に基づいて DNA 配列を合成した。

URA3 遺伝子は、*S. cerevisiae* のゲノムから PCR 法により得られた。

ベクター pB14 は *E. coli* 由来のベクター pBR322 に、*S. cerevisiae* 由来の *URA3* 遺伝子並びに宿主 *O. polymorpha* 由来の FMD プロモーター配列、MOX ターミネーター配列及び *HARS1* 配列を挿入して作製した。さらに α 因子のプレプロペプチドをコードする DNA 配列と *KLM1* 遺伝子を連結し、ベクター pB14 に挿入してベクター pB14-CBSynth を作製した。なお、ベクター pBR322 が持っていた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は、ベクター pB14 の作製過程で除去した。

(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 11）。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *KLM1* 遺伝子

KLM1 遺伝子がコードする KLM1 は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解する酵素である。

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

F. heterosporum のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベース検索^b及び文献検索^cを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

KLM1 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。

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

KLM1 の人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE (CBB 染色) を行った。その結果、試験開始 30 秒以内に消化されることが示された。（参照 12）

(b) 人工腸液に対する感受性

KLM1 の人工腸液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE (CBB 染色) を行った。その結果、試験開始 20 分以内に消化されることが示された。（参照 12）

(c) 加熱処理に関する感受性

KLM1 の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、各温度帯で 10 分処理した後の活性を測定した。その結果 80°C の処理によって完全に失活することが示された。（参照 13）

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

第 5-2-(2) に記載のとおりである。

② *URA3* 遺伝子

URA3 遺伝子がコードするオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼにアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。*URA3* 遺伝子の供与体

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature (検索日：2022 年 3 月 31 日)

^c PubMed (検索日：2022 年 3 月 31 日)

である *S. cerevisiae* のアレルギー誘発性の可能性を調べるためにデータベース^bを用いて検索を行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

以上のことから総合的に判断し、KLM1 及びオロチジン 5'-リン酸デカルボキシラーゼ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

KLM1 遺伝子のプロモーターは、*O. polymorpha* RB11 株に由来するギ酸デヒドロゲナーゼ (*FMD*) 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、自身のプロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

KLM1 遺伝子のターミネーターは、*O. polymorpha* RB11 株に由来する *MOX* 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、自身のターミネーター配列である。

(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

KLM1 遺伝子に *S. cerevisiae* の接合フェロモンである α 因子のプレプロペプチドをコードする DNA 配列を連結している (参照 14)。なお、プレ配列は生産菌内で小胞体内に移動する際に切断され、更にゴルジ体へ輸送されてからプロ配列が切断され、KLM1 は細胞外へ分泌される。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

ベクター pB14 に α 因子のプレプロペプチドをコードする DNA 配列と連結した *KLM1* 遺伝子配列を挿入して遺伝子導入用ベクター pB14-CBSynt を作製した。

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 pB14-CBSynt 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。

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature (検索日：2022年3月31日)

(2) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、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

第5-2-(2)に記載のとおりである。

(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

遺伝子導入用ベクターpB14-CBSsynt 全体を宿主に挿入した。

(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pB14-CBSsynt は、目的外の遺伝子の混入がないように精製キットを用いて純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

電気穿孔法を用いて遺伝子導入用ベクターpB14-CBSsynt を宿主に導入後、ウラシル非含有培地にて選抜し DIDK-0176 株を得た。

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pB14-CBSsynt には抗生物質耐性マーカー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

DIDK-0176 株は、*KLM1* 遺伝子及び *URA3* 遺伝子発現カセットが導入され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

DIDK-0176 株において挿入された遺伝子導入ベクターにおける制限酵素認識サイトは確認されている。

KLM1 遺伝子及び *URA3* 遺伝子発現カセットの導入位置及びコピー数を確認するためにシークエンス解析を行った結果、1 箇所に複数コピー挿入されていることを確認し、そのコピー数は 97 とした。(参照 15)

また、DIDK-0176 株は、野生型 *O. polymorph* SBC4732 の派生株を用いて作製しているが、これらの派生株は目的遺伝子を高効率で発現でき、プラスミドの状態では残らないことが知られている(参照 6、16)。

(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

KLM1 遺伝子及び *URA3* 遺伝子発現カセットの導入により新たに生じるオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）を検索するために、挿入 DNA 及び 5' 近傍配列及び 3' 近傍配列を含む領域における 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 104 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、アレルゲンデータベース^dを用いて相同性検索を行った。その結果、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なかった。一方、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、キチナーゼ、エンドキチナーゼ A 及びオオアワガエリ由来のグループ 5 アレルゲン (Phl p 5) が検出された。しかしながら、エピトープとの一致を確認するため、データベース^eを用いて検索を行ったところ、食品アレルゲンのエピトープとは一致しないことが確認された。（参照 17）

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^fを用いて $E\text{-value} < 0.1$ を指標として検索を行った。その結果、既知のタンパク質として、サンゴヘビ由来の Frontoxin II、スズメバチ由来の不活化ヒアルロン酸分解酵素 B、ヘビ毒由来のプロトロンビン活性化因子 vestarin-D2 及び Allergen 5 が検出された。しかしながら、Frontoxin II に対する相同性は低いこと、ヒアルロン酸分解酵素は不活化されたタンパク質であることから、これらが毒性を誘発する可能性は低いと考えられた。また、ヘビ毒由来の vestarin-D2 に相同性を示したアミノ酸長における 3 つの活性サイトのうち 2 つ以上を含まないこと、Allergen 5 のドメインと ORF とのアライメントにおける同一性は低いことから、これらが毒性タンパク質として機能する可能性は低いと考えられた。（参照 17）

^d Allergen Online version 21（検索：2022年3月）

^e Immune Epitope Database ; IEDB (National Institute of Allergy and Infectious Diseases)
（検索：2022年3月）

^f UniProt Knowledgebase ; UniProtKB (2022_01)（検索：2022年3月）

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

KLM1 の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において安全に利用されてきた実績がある。

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

KLM1 の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において安全に利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。また、本製品の製造原料は、Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合している。

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

KLM1 は、米国で 2007 年に GRAS として認証されている。また、オーストラリア・ニュージーランド、デンマーク、フランス及び EU において、承認等を受けている。

2. 組換え体の残存に関する事項

KLM1 に生産菌の残存がないことを培養を用いた手法により確認した（参照 18）。また、組換え DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

KLM1 の製品化前の酵素サンプルは、JECFA 及び FCC の規格値を満たしている（参照 19）。

また、KLM1 の酵素原体は、食品、添加物等の規格基準のホスホリパーゼの成分規格を満たしている。製造原料は、食品用酵素への使用が認められた品質のものが用いられ、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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

KLM1 を有効成分とする酵素製剤は、生産菌及び培養液を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て精製された KLM1 の酵素原体を用いて製造されるものであり、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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ないと考えられる。

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

KLM1 の酵素原体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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「DIDK-0176株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. Lee JD and Komagata K. Taxonomic study of methanol-assimilating yeasts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 26, no. 2, pp. 133-158, 1980.
2. Ramezani-Rad M. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *Yeast Research*, vol. 4, pp. 207-215, 2003.
3. Suh SO and Zhou JJ. Methylophilic yeasts near *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*: a proposal of *Ogataea angusta* comb. nov. and *Candida parapolyomorpha* sp. nov. *FEMS yeast research*, vol. 10, no. 5, pp. 631-638, 2010.
4. Manfrão-Netto JH, Gomes AM, Parachin NS. Advances in using *Hansenula polymorpha* as chassis for recombinant protein production. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 7, no. 94, 2019.
5. 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」
6. Kunze G. Chapter 3. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): Biology and Applications," in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer Science, 2009.
7. 由里本博也：メタノール資化性酵母による異種遺伝子発現系。 *化学と生物* vol. 38, pp. 533-540, 2000.
8. ATCC. *Ogataea polymorpha* (ATCC® 34438™)
9. Roggenkamp R. Transformation of the methylophilic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors. *Molecular Genetics and Genomics*, vol. 202, pp. 302-308, 1986.
10. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. CBS 782.83
11. DuPont Industrial Biosciences. KLM1 ORF report. (社内文書)
12. DuPont Industrial Biosciences. 人工胃液・腸液消化試験報告書. 2021 (社内文書)
13. DuPont Nutrition and Biosciences. Enzyme activity after heat treatment in the presence and absence of substrate. [社内文書]
14. DuPont Nutrition and Biosciences. Nucleotide and amino acid sequence (社内文書)
15. DuPont Nutrition & Biosciences. 全ゲノム解析報告書 (社内文書)
16. Gellissen G. New yeast expression platforms based on methylophilic

Hansenula polymorpha and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Research*, vol. 5, pp. 1079-1096, 2005.

17. DuPont Industrial Biosciences. KLM1 ORF report. (社内文書)
18. DuPont Industrial Biosciences. CofA showing compliance with JECFA specs (3 batches). (社内文書)
19. 日本食品分析センター、ダニスコ・ジャパン株式会社. 社内及び社外分析結果 (社内文書)