

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAo012 株を利用して生産された
フィターゼ

令和6年（2024年）2月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

＜審議の経緯＞

2023 年 3 月 8 日 農林水産大臣から遺伝子組換え飼料添加物の安全性に係る食品健康影響評価について要請（4 消安第 6827 号）、関係書類の
接受

2023 年 3 月 28 日 第 894 回食品安全委員会（要請事項説明）

2023 年 5 月 22 日 第 236 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2024 年 2 月 13 日 第 929 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＞

2023 年 9 月 30 日まで

中島 春紫（座長）

山川 隆（座長代理）

安達 玲子 近藤 一成

岡田 由美子 佐々木 伸大

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

2023 年 10 月 1 日から

児玉 浩明（座長）

佐々木 伸大（座長代理）

伊藤 政博 柴田 識人

岡田 由美子 手島 玲子

小野 道之 樋口 恭子

小野 竜一 藤原 すみれ

＜第 236 回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿＞

奥 宏海（水産研究・教育機構水産技術研究所生理機能部飼餌料グループ長）

児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

手島 玲子（岡山理科大学獣医学部教授）

要 約

飼料添加物である「JPAo012 株を利用して生産されたフィターゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本飼料添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Citrobacter braakii* ATCC51113 株由来の改変フィターゼ遺伝子を導入して作製した JPAo012 株を利用して生産されたフィターゼ（改変 CbPhyt）である。本フィターゼは、フィチン酸を分解して無機リン酸を遊離させる酵素であり、鶏及び豚並びに養殖水産動物の飼料のリンの利用性の向上を目的として使用される 6-フィターゼである。

「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」（平成 16 年 5 月 6 日食品安全委員会決定）に基づき又は準用し、食品健康影響評価を実施した。

具体的には、挿入遺伝子の供与体である *Citrobacter braakii* について、安全性に関して問題となる報告がないこと、挿入される塩基配列が明らかであること等を確認した。さらに、本飼料添加物が養殖水産動物の飼料に使用されることを考慮し、改変 CbPhyt 遺伝子等の挿入によって産生されるタンパク質や遺伝子発現カセットの宿主への導入により生じる境界領域におけるオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）について、毒性やアレルギー誘発性についてデータベースや文献検索で確認した結果から、当該品目が有害物質を含む又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。また、文献検索の結果、遺伝子の挿入によって産生されるタンパク質や ORF の翻訳産物について、畜水産物中へ移行するという報告はなかった。

以上の結果から、組換え体由来の新たな有害物質が生成され、肉、乳、卵等の畜水産物中へ移行する可能性、遺伝子組換えに由来する成分が畜水産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性及び当該成分が家畜等の代謝系に作用し、新たな有害物質が産生する可能性はないと考えられることから、改めて「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）に準じて評価を実施する必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜及び養殖水産動物に由来する畜水産物については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象飼料添加物の概要

(申請内容)

品 目：JPAo012 株を利用して生産されたフィターゼ（改変 CbPhyt）
（製品名：HiPhorius、IUB No.：3.1.3.26、CAS No.：9001-89-2）
用 途：鶏及び豚並びに養殖水産動物の飼料のリン利用率の向上
申 請 者：ノボザイムズ ジャパン株式会社
共同申請者：DSM 株式会社
開 発 者：Novozymes A/S（デンマーク）

本飼料添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Citrobacter braakii* ATCC51113 株由来の改変フィターゼ遺伝子を導入して作製した JPAo012 株を利用して生産されたフィターゼ（以下「改変 CbPhyt」という。）である。本フィターゼは、フィチン酸（イノシトール-6-リン酸）を分解して無機リン酸を遊離させる酵素であり、鶏及び豚並びに養殖水産動物の飼料のリン利用率の向上を目的として使用される 6-フィターゼである。また、比較対象とした従来の飼料添加物は、*A. oryzae* IFO4177 株を宿主として *C. braakii* ATCC51113 株由来のフィターゼ遺伝子を挿入した組換え体 JPAo002 株を利用して生産されたフィターゼ（以下「CbPhyt」という。）であり、飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年農林省令第 35 号）によりその成分規格が設定されている。

本飼料添加物は、鶏及び豚並びに養殖水産動物の飼料にそのまま添加・混合して使用する酵素（タンパク質）であるとされている。

II. 食品健康影響評価

1. （1）宿主である *A. oryzae* IFO4177 株（NBRC4177 株）は、清酒麹から分離された野生株であり、その派生株と共に様々な食品用酵素の生産菌の作成に世界各国で長年用いられてきた。これら酵素について安全性に懸念を生じるような報告等はこれまでにない。*A. oryzae* は一般的に非病原性であり、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 2 及び 3 に分類されていない。
- （2）改変 *CbPhyt* 遺伝子の供与体である *C. braakii* は、医学的に重要な細菌としての報告はなく、チーズから分離されたという報告があり、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 2 及び 3 に分類されていない。*C. braakii* ATCC51113 株由来のフィターゼは日本国内においても既に販売・流通している。改変 CbPhyt は、*C. braakii* ATCC51113 株由来のフィターゼに、耐熱性とより広い pH 領域での安定性の向上等を目的とした改変を加えて開発された（参照 1）。
- （3）宿主に導入した遺伝子のうち、改変 *CbPhyt* 遺伝子発現カセットは、*Aspergillus niger* BO-1 株由来の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター断片に *A. oryzae* IFO4177 株のアミラーゼのプロモーター

ター断片を連結した *na2/amyB* プロモーター及び *A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーターを含んでいる。導入された改変 *CbPhyt* 遺伝子は、宿主ゲノムの一か所の遺伝子座に複数コピー組み込まれたと推定される（参照 2、参照 3）。

JPAo012 株には改変 *CbPhyt* 遺伝子の他に、改変 *CbPhyt* タンパク質の発現量を増やすために宿主に *pdiA* 遺伝子と *pdiB* 遺伝子が挿入され、選択マーカーとして *pyrG* 遺伝子と *LEU2* 遺伝子が挿入されている（参照 4）。

(4) 改変 *CbPhyt* 製品には生産菌の染色体 DNA は含まれていないことを PCR 法により確認している。改変 *CbPhyt* 製品は、飼料添加物として 2021 年に EFSA へ申請を行っており、米国では GRAS 自己認証を受けて販売・使用されており、安全性の問題はこれまでに報告されていない。

2. 挿入遺伝子がコードするタンパク質である改変 *CbPhyt*、*pdiA* タンパク質及び *pdiB* タンパク質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 80 アミノ酸残基で 35%以上一致するアレルゲン及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致するアレルゲンについて相同性検索を行った。その結果、改変 *CbPhyt*、*pdiA* タンパク質及び *pdiB* タンパク質とも、食物アレルギーを誘発する可能性は低いと考えられた（参照 5、参照 6、参照 7）。

また、3 種類の遺伝子導入用ベクターは、改変 *CbPhyt* 遺伝子、*pdiA* 遺伝子、*pdiB* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子を含む。これら以外にオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）が含まれているかを調べるために、3 種類の遺伝子導入用ベクターそれぞれの全長について、6 通りの読み枠で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 について NCBI データベース^b及び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。その結果、挿入タンパク質の検索で得られた以外の既知アレルゲンは検出されず、遺伝子導入によって新たに ORF が発現したとしても、本酵素製剤中に毒性を有するタンパク質が含まれるまたは食物アレルギー誘発性がある可能性は低いと考えられる。（参照 5、参照 6、参照 7）。

3. JPAo012 株は、遺伝子挿入領域を含む全ゲノムの塩基配列はシーケンス解析により確かめられ、挿入部位の制限酵素による切断地図も明らかになっている。また、遺伝子導入用ベクターがゲノムの特定の遺伝子座に挿入されたことが明らかになっている。3 種類の遺伝子発現カセットの宿主への導入により生じる境界領域における 5' 末端近傍配列及び 3' 末端近傍配列との接合部の塩基配列を用いて ORF 検索を行った。加えて、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えによる、DNA 欠失操作において異種遺伝子断片の挿入に伴い当該断片の一部が残存

^a COMPARE データベース COMprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE).

<https://comparedatabase.org/> (version 2023:2023 年 1 月 26 日)。

^b NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベース (検索日: 2021 年 4 月)

するため、当該遺伝子座についても近傍配列の ORF 検索を行った。その結果、6 通りの読み枠で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 124 個検出された。これらの ORF と既知の毒性タンパク質及びアレルゲンとの相同性検索を行った。

その結果、データベースの毒性タンパク質と相同性を示した ORF は無かった。また、これらの ORF と 80 アミノ酸残基で 35% 以上一致、または連続する 8 アミノ酸が一致する既知のアレルゲンで安全性に問題があると考えられるものは確認されなかった。これらのことから、改変 CbPhyt 製品中に新たな有害物質が含まれる可能性は低いと考えられる（参照 8、参照 9）。

4. 一般的に、挿入された遺伝子又は挿入遺伝子によって産生されるタンパク質が鶏や家畜の肉、乳、卵等の畜産物中に移行するということは報告されておらず、本飼料添加物が肉、乳、卵等の畜産物中に移行し、有毒物質に変換・蓄積されることは想定されず、家畜の代謝系に作用し新たな有害物質が生成される可能性は考えられない。

一方で、消化器官の未発達な仔魚や無胃魚については、タンパク質の消化・吸収システムが家畜及び家きんと異なる場合があるが、改変 CbPhyt 及び CbPhyt 製品において水産物中に移行するという報告はなく、これまでの販売実績の中で安全性の問題についての報告もない。このことから、本飼料添加物が養殖水産動物の食用部分に移行し、有毒物質に変換・蓄積されることは想定されず、水産動物の代謝系に作用し新たな有害物質が生成される可能性は考えられない。

以上のことから、本飼料添加物については、「遺伝子組換え飼料及び飼料添加物の安全性評価の考え方」（平成 16 年 5 月 6 日食品安全委員会決定）に基づき又は準用し食品健康影響評価を実施した結果、組換え体由来の新たな有害物質が生成され、肉、乳、卵等の畜水産物中に移行する可能性、遺伝子組換えに由来する成分が畜水産物中で有害物質に変換・蓄積される可能性及び当該成分が家畜等の代謝系に作用し、新たな有害物質が産生する可能性はないと考えられることから、改めて「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）に準じて評価を実施する必要はなく、当該飼料添加物を摂取した家畜及び養殖水産動物に由来する畜水産物については、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. International Application Published Under the Patent Cooperation Treaty (PCT). International Publication Number: WO 2022/034211 A1.
2. JPAo012 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
3. Copy number of the expression cassette in the production strain (社内文書)
4. 遺伝子導入ベクター pJPV054、pJPV055 及び pJPV056 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
5. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV054 on the genome of JPAo012 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
6. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV055 on the genome of JPAo012 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
7. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV056 on the genome of JPAo012 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
8. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking region of the insertion on the genome of JPAo012 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
9. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking region of the insertion on the genome of JPAo012 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)