

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

Streptomyces mobaraensis
TTG-1 株を利用して生産された
トランスグルタミナーゼ

令和6年（2024年）8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> | 4 |
| <食品安全委員会委員名簿> | 4 |
| <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> | 4 |
| 要 約 | 5 |
| I. 評価対象添加物の概要 | 6 |
| II. 安全性に係る知見の概要 | 6 |
| 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 | 6 |
| 1. 従来 of 添加物の性質及び用途等に関する資料 | 6 |
| 2. 宿主及び導入 DNA | 7 |
| 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 | 7 |
| 4. 宿主の構成成分等に関する資料 | 8 |
| 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料 | 8 |
| 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 | 8 |
| 第2. 宿主に関する事項 | 9 |
| 1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項 | 9 |
| 2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項 | 9 |
| 3. 寄生性及び定着性に関する事項 | 9 |
| 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 ... | 9 |
| 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 | 9 |
| 第3. ベクターに関する事項 | 9 |
| 1. 名称及び由来に関する事項 | 9 |
| 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 | 10 |
| 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 | 10 |
| 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 | 10 |
| 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 | 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 | 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ー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..... | 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..... | 16 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価 | 16 |
| <参照> | 17 |

<審議の経緯>

- 2024年3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（厚生労働省発健生0319第10号）、関係書類の接受
- 2024年3月26日 第935回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2024年4月25日 第248回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2024年8月27日 第952回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

| 2024年6月30日まで | 2024年7月1日から |
|------------------|--------------------|
| 山本 茂貴（委員長） | 山本 茂貴（委員長） |
| 浅野 哲（委員長代理 第一順位） | 浅野 哲（委員長代理 第一順位） |
| 川西 徹（委員長代理 第二順位） | 祖父江 友孝（委員長代理 第二順位） |
| 脇 昌子（委員長代理 第三順位） | 頭金 正博（委員長代理 第三順位） |
| 香西 みどり | 小島 登貴子 |
| 松永 和紀 | 杉山 久仁子 |
| 吉田 充 | 松永 和紀 |

<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>

| | |
|--------------|--------|
| 児玉 浩明（座長） | |
| 佐々木 伸大（座長代理） | |
| 伊藤 政博 | 手島 玲子 |
| 小野 道之 | 樋口 恭子 |
| 小野 竜一 | 藤原 すみれ |
| 柴田 識人 | 百瀬 愛佳 |
| 爲廣 紀正 | |

<第248回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

- 中島 春紫（明治大学農学部農芸化学科教授）
- 杉本 直樹（国立医薬品食品衛生研究所食品添加物部長）

要 約

「*Streptomyces mobaraensis* TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミンナーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Streptomyces mobaraensis* BTG-5 株を宿主として、*S. mobaraensis* BTG-5 株由来の改変トランスグルタミンナーゼ遺伝子を導入することで作製された *S. mobaraensis* TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミンナーゼである。本添加物は、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間での架橋反応を触媒する酵素であり、肉団子等の食肉加工、蒲鉾製造等の水産加工、チーズ・アイスクリーム製造等の乳製品加工、茶わん蒸し製造等その他の食品加工に用いられる。

「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）に基づき食品健康影響評価を実施した。具体的には、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、アレルギー誘発性等について確認した。その結果、従来 of 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、「*Streptomyces mobaraensis* TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミンナーゼ」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：*Streptomyces mobaraensis* TTG-1 株を利用して生産された
トランスグルタミナーゼ

用途：タンパク質を含む食品である肉団子、蒲鉾、チーズ・アイスク
リーム、茶わん蒸し等の加工

申請者：天野エンザイム株式会社

開発者：天野エンザイム株式会社、味の素株式会社（日本）

本添加物は、*Streptomyces mobaraensis* BTG-5 株を宿主として、*S. mobaraensis* BTG-5 株由来のトランスグルタミナーゼ遺伝子に変異を導入した遺伝子を導入することで作製された *S. mobaraensis* TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼである。本添加物は、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間での架橋反応を触媒する酵素であり、肉団子等の食肉加工、蒲鉾製造等の水産加工、チーズ・アイスクリーム製造等の乳製品加工、茶わん蒸し製造等その他の食品加工に用いられる。

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. 従来から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

従来からの添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名称：トランスグルタミナーゼ

生産菌：*Streptomyces mobaraensis*

有効成分：トランスグルタミナーゼ

IUB No.：EC 2.3.2.13

CAS No.：80146-85-6

(2) 製造方法

トランスグルタミナーゼは、培養、ろ過等の工程を経た上で製品化される。なお、生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

トランスグルタミナーゼは、タンパク質中のグルタミン残基とリジン残基の間での架橋反応を触媒する酵素である。

トランスグルタミナーゼは、タンパク質を含む多くの食品で用いられ、肉団子等の食肉加工、蒲鉾製造等の水産加工、チーズ・アイスクリーム製造等の乳製品加工、茶わん蒸し製造等その他の食品加工に用いられる（参照1）。なお、これらの食品の製造工程では、通常、殺菌工程として

加熱処理が行われるため、トランスグルタミナーゼは活性を失う。

(4) 摂取量

従来のトランスグルタミナーゼ製品が最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^a、推定一日摂取量は $28.3 \pm 6.38 \mu\text{g TOS}$ (Total Organic Solids) / kg 体重/日である (参照 2)。

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、*S. mobaraensis* BTG-5 株である。*S. mobaraensis* BTG-5 株は、自然界から分離された *S. mobaraensis* の変異育種株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変トランスグルタミナーゼ (*TTG*) 遺伝子の供与体は、*S. mobaraensis* BTG-5 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

TTG 遺伝子は、*S. mobaraensis* BTG-5 株由来のトランスグルタミナーゼ (*TG*) 遺伝子に部位特異的変異が導入され複数箇所のアミノ酸が置換された改変トランスグルタミナーゼをコードする。

宿主ゲノムの標的遺伝子座に *TTG* 遺伝子が接合伝達と相同組換えの手法により挿入された (参照 3)。

すなわち、宿主ゲノムの *TG* 遺伝子の上流領域と下流領域に挟まれた *TTG* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子をもつ遺伝子導入用ベクター pK18mob-ttg1 が構築され、これによって形質転換された *Escherichia coli* を *S. mobaraensis* BTG-5 株に接合させることによって、pK18mob-ttg1 が伝達・導入された。2 回の相同組換えを経て *TTG* 遺伝子以外のベクター由来の DNA が脱落した TTG-1 株が取得された。TTG-1 株にカナマイシン耐性遺伝子が存在しないことは全ゲノム配列解析で確認されている (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

S. mobaraensis BTG-5 株は、土壌から単離された *S. mobaraensis* (参照 5) の変異育種株であり、食品用酵素トランスグルタミナーゼの製造における生産菌として、日本において使用実績がある。

^a 令和元年国民健康・栄養調査 (厚生労働省、公表 2020 年) 第 5 表の 1 (食品群別摂取量—食品群, 年齢階級別, 平均値, 標準偏差, 中央値—総数, 1 歳以上)

4. 宿主の構成成分等に関する資料

S. mobaraensis が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、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（以下「BSL」という。）1に相当する（参照7）。

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：トランスグルタミナーゼ TTG

有効成分：トランスグルタミナーゼ

IUB No. : EC 2.3.2.13

CAS No. : 80146-85-6

(2) 製造方法

トランスグルタミナーゼ TTG 製品は、培養、ろ過等の工程を経て製造される。この工程には、組換え体の不活化工程を含む。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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品は、従来の添加物と同様に、タンパク質を含む多くの食品で用いられ、肉団子等の食肉加工、蒲鉾製造等の水産加工、チーズ・アイスクリーム製造等の乳製品加工、茶わん蒸し製造等その他の食品加工に用いられる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

トランスグルタミナーゼ TTG 製品は、従来の添加物と同様に、食品加工に用いられるが、従来と比べ高温下での反応性が向上している（参照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

本添加物の有効成分である改変トランスグルタミナーゼと従来のトランスグルタミナーゼとの相違点は、成熟体タンパク質のアミノ酸残基中複数残基のアミノ酸が置換されている点である。また、高温下での反応性が向上し耐熱性が向上している点が異なる（参照7）。

(2) 組換え体と宿主

S. mobaraensis TTG-1 株と宿主との相違点は、*S. mobaraensis* TTG-1 株には、TTG 遺伝子が導入されており生産するトランスグルタミナー

ゼに複数残基のアミノ酸置換が起きている点である。

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、*S. mobaraensis* BTG-5 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

S. mobaraensis が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、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 6）。宿主である *S. mobaraensis* BTG-5 株は、開発者において食品用酵素トランスグルタミナーゼの製造における生産菌として使用されてきている。また、その育種系統株は、食品用酵素トランスグルタミナーゼの製造における生産菌として日本及び海外において長年使用され、その間健康上の懸念があったという事例は報告されていない。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

S. mobaraensis 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^b。

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

S. mobaraensis には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない^b。

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

S. mobaraensis 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報告はない^b。

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 pK18mob-ttg1 の作製には、*E. coli* 及び *Pseudomonas aeruginosa* 由来のプラスミド pK18mob 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 pK18mob の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

^b PubMed、検索日：2023 年 5 月 31 日

- (2) 制限酵素による切断地図に関する事項
プラスミド pK18mob 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 pK18mob 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 pK18mob には、カナマイシ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 pK18mob は、伝達性を示さない。
- (6) 宿主依存性に関する事項
プラスミド pK18mob の複製開始配列は、大腸菌及びその近縁種 *Salmonella* 属、*Serratia* 属において機能するが、*S. mobaraensis* においては機能しない。

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
TTG 遺伝子の供与体は、宿主である *S. mobaraensis* BTG-5 株である。
- (2) 安全性に関する事項
S. mobaraensis は、人に対する病原性及び毒素生産性は知られていない。*S. mobaraensis* BTG-5 株及びその系統菌株は、従来の食品添加物トランスグルタミナーゼの生産菌として、日本及び海外での長年の使用実績があり（参照 5）、その間健康上の懸念があったという事例、報告はない。

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又は合成方法に関する事項
TTG 遺伝子は、*S. mobaraensis* BTG-5 株よりクローニングしたトランスグルタミナーゼ遺伝子に、PCR による部位特異的変異法により複数残基のアミノ酸置換が導入された改変遺伝子である。
- (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

TTG 遺伝子がコードする改変トランスグルタミナーゼは、タンパク質又はペプチド中のグルタミン残基の γ -カルボキシアミド基をアシル供与体とし、アミン化合物の第1級アミノ基又はタンパク質若しくはペプチド中のリジン残基の ϵ -アミノ基をアシル受容体とするアシル転移反応を触媒する酵素である（参照1）。

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

S. mobaraensis のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^cが行われた。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. 遺伝子産物についてそのアレルギー誘発性に関する知見

S. mobaraensis 由来のトランスグルタミナ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^cが行われた。その結果、トランスグルタミナーゼを用いて加工した食品を摂取することでアレルギーが誘発されるとの報告はなかった。

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

改変トランスグルタミナーゼ (*TTG*) の人工胃液中での消化性を調べる目的で、**SDS-PAGE** 分析及びウェスタンブロット分析が行われた。その結果、試験開始後 30 秒以内に消化されることが示された（参照 8）。

(b) 人工腸液に対する感受性

TTG の人工腸液中での消化性を調べる目的で、**SDS-PAGE** 分析が行われた。その結果、試験開始後 60 分においても完全には消化されないことが示された（参照 9）。

(c) 加熱処理に対する感受性

TTG の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、**pH6.0** において各温度で各時間熱処理した後の残存活性が確認された。その結果、**80°C**、3 分の処理で完全に失活することが示された（参照 10）。

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

TTG と既知のアレルゲンとの構造相同性の有無を調べるため、アレ

^c PubMed、検索日：2023年6月1日

ルゲンデータベース^dを用いて相同性検索が行われた。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。また、連続する 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 11）。

以上のことから、TTG 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

導入した *TTG* 遺伝子のプロモーターは、宿主 *S. mobaraensis* BTG-5 株のトランスグルタミナーゼ遺伝子のプロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

導入した *TTG* 遺伝子のターミネーターは、宿主 *S. mobaraensis* BTG-5 株のトランスグルタミナーゼ遺伝子のターミネーターである。

(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

その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列は挿入されていない。

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 pK18mob に、宿主の *TG* 遺伝子の上流領域、*TTG* 遺伝子、宿主の *TG* 遺伝子の下流領域がクローニングされることにより、遺伝子導入用ベクター pK18mob-ttg1 が得られた。

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 pK18mob-ttg1 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 12、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

pK18mob-ttg1 が接合伝達された宿主に相同組換えにより導入される領域は明らかであり、*TTG* 遺伝子は、宿主に存在するトランスグルタミ

^d 国立医薬品食品衛生研究所生化学部の Allergen Database for Food Safety (<https://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>)、検索日：2023年5月31日

ナーゼ遺伝子を置換するように導入されていることが、*S. mobaraensis* TTG-1 株の全ゲノムのシーケンス解析により確認された。挿入遺伝子配列である *TTG* 遺伝子の塩基配列と、その上下流のそれぞれ 1000bp の配列について、オープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。） 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 17 個検出された。これらの ORF について、アレルゲンデータベース^eと毒性タンパク質データベース^fを用いた相同性検索が実施された。

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。また、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは、1つの ORF で一致したが、一致した 8 アミノ酸配列は導入した *TTG* 遺伝子のターミネーターに位置する領域であり、かつ宿主においてもトランスグルタミナーゼ遺伝子のターミネーターとして存在する。以上の結果から、17 個の ORF が翻訳されたとしても、それらのタンパク質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。（参照 14）。また、データベース中の既知の毒性タンパク質との相同性について、E-value < 10 を指標に検索を行ったところ、相同性を示す ORF は検出されなかった（参照 14）。以上の検索結果より、導入された DNA により新規に生じうる ORF は、既知の食物アレルゲン及び毒性タンパク質との相同性はないものと考えられる。

- (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

遺伝子導入用ベクター pK18mob-ttg1 上の意図する挿入領域は、明らかである。

- (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 pK18mob-ttg1 は、構築の過程において精製されていることから、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

宿主ゲノムの標的遺伝子座に *TTG* 遺伝子が以下のように接合伝達と同組換えの手法を用いて挿入された。

宿主の *TG* 遺伝子の上流領域、*TTG* 遺伝子、宿主の *TG* 遺伝子の下流領

^e 国立医薬品食品衛生研究所生化学部の Allergen Database for Food Safety (<https://allergen.nihs.go.jp/ADFS/>) (検索日：2023年7月26日)

^f NCBI データベース (検索日：2023年7月26日)

域の 3 つの DNA が結合されてカナマイシン耐性遺伝子をもつプラスミド pK18mob に挿入され、遺伝子導入用ベクター pK18mob-ttg1 が構築された。そして pK18mob-ttg1 で形質転換された *E. coli* を *S. mobaraensis* BTG-5 株に接合させることにより、pK18mob-ttg1 が *S. mobaraensis* BTG-5 株に伝達・導入された。計 2 回の相同組換えにより、ゲノムに *TTG* 遺伝子が挿入されて *TTG* 遺伝子以外のベクター由来の DNA が脱落した *S. mobaraensis* TTG-1 株が取得された。*S. mobaraensis* TTG-1 株にはカナマイシン耐性遺伝子は残存しておらず、抗生物質耐性遺伝子が含まれない。

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 pK18mob-ttg1 は、カナマイシン耐性遺伝子を持ち、宿主染色体にいったん挿入されるが、生産菌株である *S. mobaraensis* TTG-1 株を取得する過程で脱落するため宿主染色体には残存しない。

生産菌株に抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことがシーケンス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

S. mobaraensis TTG-1 株には、*TTG* 遺伝子が導入されている（参照 3、4）。

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

S. mobaraensis TTG-1 株では *S. mobaraensis* BTG-5 株の標的遺伝子座に 1 コピーの *TTG* 遺伝子が挿入されたことが全ゲノム配列解析から確認された。*TTG* 遺伝子の挿入領域の構成要素及び制限酵素切断地図は明らかになっている。

(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

S. mobaraensis TTG-1 株の染色体上への *TTG* 遺伝子の導入により新規に生じる ORF について、全ゲノムのシーケンス解析の結果を用いて検索が行われた（参照 4）。その結果、挿入遺伝子配列により新規に生じる、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 17 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⁶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は、認められなかった。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はなかった。

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、NCBI データベース^fを用いて E-value<10 を指標として検索を行った。その結果、既知の毒性タンパク質と相同性を示す ORF は、見出されなかった。（参照 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

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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造において長年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。

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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品の海外での認可の実績はない。

2. 組換え体の残存に関する事項

トランスグルタミナーゼ TTG 製品中に組換え体由来の DNA の残存がないことが PCR 分析により確認された（参照 15）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

トランスグルタミナーゼ TTG 製品は、食品衛生法に基づく成分規格及び JECFA 規格を満たしている（参照 16）。また、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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品は、生産菌の培養物が、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経ることで得られる。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

トランスグルタミナーゼ TTG 製品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は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「*Streptomyces mobaraensis*TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ」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、食品健康影響評価を実施した。具体的には、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、アレルギー誘発性等について確認した。その結果、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、「*Streptomyces mobaraensis*TTG-1 株を利用して生産されたトランスグルタミナーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 国際公開特許 WO 2022/071061 A1
2. トランスグルタミナーゼの 1 日当たりの推定摂取量の計算（社内文書）
3. *Streptomyces mobaraensis* TTG-1 株の構築方法（社内文書）
4. *Streptomyces mobaraensis* TTG-1 株の全ゲノム配列解析（社内文書）
5. H. Ando, M. Adachi, K. Umeda, A. Matsuura, M. Nonaka, R. Uchio, H. Tanaka, and M. Motoki. Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53 (10), 1989, p.2613-2617.
6. 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 B S L 分類等」（抜粋版）（社内文書）
7. 従来の特ランスグルタミナーゼと改変特ランスグルタミナーゼの諸性質の比較（社内文書）
8. 人工胃液 (SGF)による TTG 消化試験（社内文書）
9. 人工腸液 (SIF)による TTG 消化試験（社内文書）
10. TTG の失活条件（社内文書）
11. TTG と既知アレルゲンとの相同性検索（社内文書）
12. pk18mob-ttg1 の塩基配列（社内文書）
13. pK18mob-ttg1 の制限酵素地図（社内文書）
14. 遺伝子挿入により生じる新規オープンリーディングフレーム (ORF) の確認（社内文書）
15. 組換え体由来の DNA 残存確認（社内文書）
16. 申請品目の JECFA 規格項目の測定結果（社内文書）