

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

XAS 株を利用して生産された  
ヘミセルラーゼ

2009年6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>

2009年2月3日	厚生労働大臣より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（厚生労働省発食安第0202005号）、関係書類の接受
2009年2月5日	第272回食品安全委員会（要請事項説明）
2009年2月17日	第68回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年6月19日	第71回遺伝子組換え食品等専門調査会
2009年6月25日	第291回食品安全委員会（報告）

### <食品安全委員会委員名簿>

見上 彪（委員長）  
小泉直子（委員長代理）  
長尾 拓  
野村一正  
畑江敬子  
廣瀬雅雄  
本間清一

### <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）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	丹生谷博
石見佳子	飯 哲夫
宇理須厚雄	山川 隆
小関良宏	山崎 壮
橘田和美	和久井信
澁谷直人	渡邊雄一郎
手島玲子	

## 要 約

食品添加物である「XAS 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」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行った。

本添加物は、ヘミセルラーゼの生産効率を高めるため、*Bacillus subtilis* Marburg 168 株由来の突然変異株を宿主として、ヘミセルラーゼの分解に関与するプロテアーゼ遺伝子を欠失させ、*B. subtilis* Marburg 168 株由来のヘミセルラーゼ遺伝子 (*xynA* 遺伝子) 及びヘミセルラーゼ遺伝子のターミネーター (*xynAt*) 並びに *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター (*PamyQ*) を導入して作製された XAS 株により生産されたヘミセルラーゼである。

本添加物の評価では、*B. subtilis* 及び *B. amyloliquefaciens* の間において、自然に遺伝子交換がなされていると考えられることから、XAS 株と同等の遺伝子構造を持つ生細胞が自然界に存在すると考えられた。

以上の結果から、「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、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないものと判断した。

## I. 評価対象添加物の概要

添加物 : XAS 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ  
用途 : パン生地改良、コーヒー抽出率の向上など  
申請者 : DSM ニュートリションジャパン株式会社  
開発者 : DSM (オランダ)

本添加物は、ヘミセルラーゼの生産効率を高めるため、*Bacillus subtilis* Marburg 168 株由来の突然変異株 (1-85 株及び DB102 株) を宿主として、ヘミセルラーゼの分解に関与する 2 種類のプロテアーゼ遺伝子を欠失させ、*B. subtilis* 168 株由来のヘミセルラーゼ遺伝子 (*xynA* 遺伝子) 及びヘミセルラーゼ遺伝子のターミネーター (*xynAt*) 並びに *Bacillus amyloliquefaciens* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター (*PamyQ*) を導入して作製された XAS 株により生産されたヘミセルラーゼである。

ヘミセルラーゼは食品添加物であり、既存添加物名簿に記載されている。

XAS 株の宿主の由来である *B. subtilis* 及び挿入遺伝子の供与体である *B. subtilis* 及び *B. amyloliquefaciens* は、発酵分野で安全に利用されてきた微生物であり、また、*B. subtilis* を基原とする食品添加物についても、豊富な食経験及び使用経験がある (参照 1)。

## II. 評価対象添加物に該当するか否かについて

### 1. 生産菌株 XAS 株の構築について

宿主は、*B. subtilis* 168 株の突然変異株である DB102 株及び 1-85 株である。

挿入遺伝子は、*B. subtilis* 168 株由来のヘミセルラーゼ遺伝子 (*xynA* 遺伝子) 及びヘミセルラーゼ遺伝子のターミネーター (*xynAt*) 並びに *B. amyloliquefaciens* 由来の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のプロモーター (*PamyQ*) である。

宿主である DB102 株のプロテアーゼ遺伝子を相同組換えにより欠失させ、1-85 株と融合した後、更にプロテアーゼ遺伝子を相同組換えにより欠失させ、BS154 株を構築した。

発現ベクター pGBB01XAS-10 は、*B. subtilis* 由来のプラスミド pUB110 及び *Escherichia coli* 由来のプラスミド pBR322 を基に作製したベクター pBHA1 に、挿入遺伝子を導入し、最終的に *E. coli* に由来する塩基配列を除去して作製された。

作製した発現ベクター pGBB01XAS-10 を BS154 株に導入し、生産菌株 XAS 株を得た。

### 2. 評価対象添加物に該当する否かについて

(1) 一般的に 16S rRNA が高い相同性を持つ微生物は分類学上近縁であるとされており、*B. subtilis* 及び *B. amyloliquefaciens* の 16S rRNA の塩基配列は高い相同性 (>99%) を有している (参照 2)。

(2) 1998 年までに *International Journal of Systematic Bacteriology* に掲載された *Bacillus* 属の菌株について、16S rRNA の全塩基配列及び高度可変領域の

配列 (HV region) を用いた分類の結果、*B. subtilis* と *B. amyloliquefaciens* は非常に近い種であることが報告されている (参照 3)。

- (3) *B. subtilis* は、報告されている細菌の中でも特に高い自然形質転換能 (Natural competence) を有しており、物理化学的な処理を施すことなく、細胞外 DNA を取り込むことが広く知られている (参照 4)。
- (4) *B. subtilis* を用いた種間形質転換実験で、*B. amyloliquefaciens* から単離した DNA を使用し、*B. subtilis* の栄養要求性を相補する形質転換株が得られることが示されている (参照 5)。
- (5) *B. amyloliquefaciens* のプロトプラスト溶菌液を用いた種間形質転換実験で、高い頻度で *B. subtilis* の栄養要求性を相補する形質転換株を得られることが示されている。このプロセスでは、大きな染色体断片が取り込まれ、16kb 離れている 2 つの形質を同時に形質転換できることが示されている (参照 6)。
- (6) *B. subtilis* 及び *B. licheniformis* の種間において、プロトプラスト融合による遺伝子交換が報告されており (参照 7, 8)、*B. licheniformis* よりも *B. amyloliquefaciens* の方が、*B. subtilis* と近種であることが報告されている (参照 3)。
- (7) 土壌環境中において 2 種類の遺伝的形質の異なる *B. subtilis* を混合し、培養した結果、コロニーの 79% が、2 種類の表現形質を合わせ持つことが示されている。また、単独の菌株に DNA を添加して土壌中で培養した場合、高い頻度で形質転換株が得られることも示されている (参照 9)。

以上 (1) ~ (7) に示される科学的知見から、*B. subtilis* 及び *B. amyloliquefaciens* の間では、自然に遺伝子交換がなされていると考えられ、XAS 株と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在しうると考えられることは妥当である。

### Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「XAS 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」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) の第 1 章 総則、第 3 対象となる添加物及び目的のうち、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではなく、安全性評価は必要ないものと判断した。

#### 〈参照〉

- 1 Anne Sietske de Bore, and Borge Diderichsen. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* : a review: Applied Microbiology Biotechnology. 1991; 36: 1-4.
- 2 Wang, L-T. et al., Comparison of *gyrB* gene sequences. 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group: International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.

- 2007; 57: 1846-1850.
- 3 Goto, K., et al. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*: *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2000; 46: 1-8.
  - 4 Simon MC and Philip Y. "Gene Transfer in Gram-Positive Bacteria". *Methods for general and molecular bacteriology*. P. Gerhardt, R. G. E. Murray, W. A. Wood, Noel R. Krieg. 2<sup>nd</sup> ed, American Society for Microbiology. 1994; 348-364.
  - 5 Wilson G.A., and Young F.E. Intergenetic Transformation of the *Bacillus subtilis* Genospecies: *Journal of Bacteriology*. 1972; 111: 705-716.
  - 6 Akamatsu T., and H. Taguchi. Interspecific Transformation of *Bacillus subtilis* Competent Cells by Chromosomal DNA in Lysates of Protoplasts of *Bacillus amyloliquefaciens*: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000; 64: 275-279.
  - 7 Akamatsu T., and J. Sekiguchi. Selection methods in bacilli for recombinants and transformants of intra- and interspecific fused protoplasts: *Archives of Microbiology*. 1993; 134: 303-308.
  - 8 Iaroslavtseva NG, et al. Fusion of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* protoplasts. Interspecies recombination resulting from protoplast fusion: Antibiotics and medical biotechnology (Antibiotiki imeditsinskaia biotekhnologiya). 1985; 30: 643-649.
  - 9 Graham, J. B., and C. A. Istock. Mol. Genetic exchange in *Bacillus subtilis* in soil: *Molecular & General Genetics*. 1978; 166: 287-290.