

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAN011 株を利用して生産された
セルラーゼ

令和7年（2025年）5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. 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並び に遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項	5
1. 従来の添加物の性質、用途等に関する事項	5
2. 宿主に関する事項	6
3. 挿入 DNA に関する事項	7
4. 遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項	7
5. 食品健康影響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 添加物及び遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項	8
第 2. 遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの 構築）に関する事項	8
1. ベクターの名称及び由来に関する事項	8
2. ベクターの性質に関する事項	9
3. 挿入 DNA の供与体に関する事項	9
4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項	10
5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の発現に関わる領域に 関する事項	10
6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項	11
7. 構築されたコンストラクトに関する事項	11
第 3. 遺伝子組換え体に関する事項	11
1. 宿主との差異に関する事項	11
2. 遺伝子導入に関する事項	12
3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項	13
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え 体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代 謝酵素等）についても評価すること。）	13
第 4. 遺伝子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 5. 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. 遺伝子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	16
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6. 第1から第5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
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	16
<参照>	17

＜審議の経緯＞

2024 年 12 月 3 日 内閣総理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（消食基第 368 号）、関係書類の接受

2024 年 12 月 10 日 第 965 回食品安全委員会（要請事項説明）

2024 年 12 月 23 日 第 259 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2025 年 5 月 13 日 第 982 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）
祖父江 友孝（委員長代理 第二順位）
頭金 正博 （委員長代理 第三順位）
小島 登貴子
杉山 久仁子
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 259 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）

要 約

「JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Trichoderma reesei* QM6a 株由来のセルラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼである。本添加物は、グルコースが直鎖状に重合したセルロースの β -1,4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する酵素であり、野菜、果物等の植物素材を搾汁する工程で添加され、エキス、ジュース等の収量の向上を目的として使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針」（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、導入遺伝子の供与体、導入される塩基配列が明らかであること等の導入遺伝子の安全性、導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、「JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼ」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. 評価対象添加物の概要

(申請内容)

名 称：JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼ

用 途：野菜、果物等の植物素材の搾汁におけるエキス、ジュース等の収量の向上

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、*Aspergillus niger* BO-1 株を宿主として、*Trichoderma reesei* QM6a 株由来のセルラーゼ遺伝子を導入して作製した JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼである。本添加物は、グルコースが直鎖状に重合したセルロースの β -1,4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する酵素であり、野菜、果物等の植物素材の搾汁におけるエキス、ジュース等の収量向上の目的で使用される。

II. 食品健康影響評価

第1. 食品健康影響評価において比較対象として用いる添加物、宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び遺伝子組換え体との相違に関する事項

1. 従来の添加物の性質、用途等に関する事項

(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：セルラーゼ

生 産 菌：*Trichoderma reesei*

有効成分：セルラーゼ

EC No. : EC 3.2.1.4

CAS No. : 9012-54-8

(2) 製造方法

セルラーゼは、生産菌株の培養液から抽出、除菌及び精製等の工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

セルラーゼは、野菜、果物等の植物素材の搾汁におけるエキス、ジュース等の収量を向上させることを目的として使用される（参照 1）。

植物素材を搾汁する工程では、通常、殺菌又はろ過工程があり、酵素タンパク質は失活又は除去される。

(4) 摂取量

セルラーゼが全ての「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」^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、推定一日摂取量は 53.5 µg TOS (Total Organic Solids) /kg 体重/日である。

2. 宿主に関する事項

(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。本菌株は、土壌よりグルコアミラーゼ生産菌として単離された *A. niger* C40-1 株の突然変異株であり、グルコアミラーゼ生産性が向上し、夾雑酵素である α -1,6 トランスグルコシダーゼ生産能を欠失している。また、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ^bによって、*A. niger* と同定された。

(2) 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する事項

A. niger は食品用酵素や有機酸の生産菌として長年にわたり安全に使用されている。また、*A. niger* が生産する α -アミラーゼ等の酵素は、既存添加物として食品に使用されている（参照 2）。

A. niger BO-1 株は、宿主として様々な食品用酵素の生産菌の作製に用いられており、安全性に懸念を生じるような報告はこれまでにない。

(3) 宿主の構成成分等に関する事項

A. niger は、自然界に広く存在しており、特に病原性で問題となる菌種ではなく、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。）2 及び 3 の病原体等に分類されていない（参照 3）。また、病原体等のリスク分類のリスク群 1 に分類される（参照 4）。したがって、非病原性であると考えられる。

A. niger は、マイコトキシン的一种であるオクラトキシン A 及びフモニシンを産生する可能性が示唆されているが（参照 2、5）、*A. niger* 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 6）。

A. niger 由来の酵素には、アレルゲンとしてデータベース^cに登録されているものがあるが、これらは食物性アレルゲンではなく吸入性アレルゲンとして整理されているため、*A. niger* は、適切な環境で扱われている限りアレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。

^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）果汁・果汁飲料（食品群番号 45）及び野菜ジュース（食品群番号 36）

^b German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

^c WHO/ IUIS Allergen Nomenclature

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

A. niger 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。

(5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

A. niger には、ヒトに対して病原性を示す外来因子の報告はない。

(6) 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 の近縁種には、日和見感染により肺炎の原因菌となる *A. fumigatus* 及びオクラトキシン産生能を有する *A. carbonarius* が知られているが（参照 7）、*A. niger* 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 6）。

3. 挿入 DNA に関する事項

(1) 挿入 DNA の供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

セルラーゼ (*cel5A TS008*) 遺伝子の供与体は、*Trichoderma reesei* QM6a 株である。アセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、*Aspergillus nidulans* Glasgow 野生株である。オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* NRRL1092 株である。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

cel5A TS008 遺伝子はセルラーゼ (*cel5A TS008*) をコードする。*amdS* 遺伝子はアセトアミダーゼを、*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、いずれも選択マーカーとして用いた。

宿主ゲノムの複数の遺伝子座にインテグラーゼ認識配列を選択マーカーである *pyrG* 遺伝子とともに導入した。この *pyrG* 遺伝子は生産菌の作製過程で一つの遺伝子座を除いてループアウトが起こり脱落した。これらの遺伝子座に、*cel5A TS008* 遺伝子及び *amdS* 遺伝子を含む (*cel5A TS008/amdS*) 遺伝子発現カセットを、インテグラーゼを用いた相同組換えにより導入した。

なお、生産菌の作製において、あらかじめ *pyrG* 遺伝子を含む欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより複数遺伝子を欠失させた。

4. 遺伝子組換え添加物の性質、用途等に関する事項

(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 : *cel5A TS008* 製品

有効成分 : セルラーゼ *cel5A TS008*

EC No. : EC 3.2.1.4

CAS No. : 9012-54-8

(2) 製造方法

cel5A TS008 製品は、JPAN011 株を生産菌として、培養、ろ過、製品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。

(3) 用途及び使用形態

cel5A TS008 製品の用途及び使用形態は、従来のセルラーゼ製品と同様である。野菜、果物等の植物素材の搾汁におけるエキス、ジュース等の収量向上の目的で使用される。

(4) 推定摂取量

従来のセルラーゼ製品が全て cel5A TS008 製品に置き換わったと仮定して、全ての「果汁・果汁飲料」及び「野菜ジュース」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のセルラーゼ cel5A TS008 の推定一日摂取量は、0.38 µg TOS (Total Organic Solids) /kg 体重/日である。

(5) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

セルラーゼ cel5A TS008 は、従来のセルラーゼと同様に、グルコースが直鎖状に重合したセルロースのグリコシド結合を加水分解する酵素である。

5. 食品健康影響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遺伝子組換え体と宿主等の相違点に関する事項

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物の相違点

セルラーゼ cel5A TS008 と従来のセルラーゼとの相違点は、生産菌、至適温度及び至適 pH である。

(2) 遺伝子組換え体と宿主の相違点

JPAN011 株と宿主との相違点は、JPAN011 株には *cel5A TS008* 遺伝子が複数コピー導入され、セルラーゼ cel5A TS008 産生能を獲得している点、*amdS* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子が導入されている点並びに複数の遺伝子を欠失している点である。

以上 1 から 5 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. 遺伝子導入に用いる塩基配列（挿入 DNA、遺伝子産物及びコンストラクトの構築）に関する事項

1. ベクターの名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV059 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pBluescript SK が用いられた。欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、*A. niger* BO-1 株の複数の遺伝子を欠失させた。これらの欠失導入用ベクタ

ーは *E. coli* 由来のプラスミド pUC19 及び pBluescript SK を基に構築された。

2. ベクターの性質に関する事項

(1) ベクターの塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pUC19 及び pBluescript SK の塩基数及び塩基配列は明らかにになっている。

(2) 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 及び pBluescript SK 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。

(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

プラスミド pUC19 及び pBluescript SK には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

(4) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 及び pBluescript SK には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pUC19 及び pBluescript SK の複製開始配列は、*E. coli* のみで機能する。

3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

cel5A TS008 遺伝子の供与体は、*T. reesei* QM6a 株である。*T. reesei* は、自然界より単離された菌株である。*T. reesei* QM6a 株を親株とする多くのセルラーゼの生産菌株が、食品、家畜飼料製造等の各分野において、長年にわたり使用されている（参照 8、9）。

amdS 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. nidulans* Glasgow 野生株及び *A. nidulans* NRRL1092 株である。*A. nidulans* の食経験は特に知られていないが、*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。欠失導入用ベクターから宿主ゲノムに導入され残存する配列は、*A.niger* BO-1 株由来の *pyrG* 遺伝子及び *A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子ターミネーターである。

T. reesei、*A. nidulans* 及び *A.niger* は、いずれも国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL 2 及び 3 に該当する病原体等に分類されていない（参照 3）。また、*T. reesei*、*A. nidulans* 及び *A.niger* は、ヒト又は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、病原体等のリスク分類のリスク群 1 に分類されると考えられる（参照 4）。

4. 導入遺伝子（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

（1）*cel5A* TS008 遺伝子

cel5A TS008 遺伝子は、セルラーゼ *cel5A* TS008 をコードする。セルラーゼ *cel5A* TS008 は従来の添加物であるセルラーゼと同様に、植物細胞の細胞壁及び食物繊維の主成分であるセルロース等の β -1,4-グルカンのグリコシド結合を加水分解する酵素である（参照 1）。

（2）*amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子は、アセトアミダーゼをコードし、アセトアミドを加水分解する酵素である。アセトアミドを唯一の窒素源として含む培地では、本遺伝子が導入された菌体のみが生育できることから、選択マーカーとして用いられる。

（3）*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遺伝子として用いられる。

5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関わる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

cel5A TS008 遺伝子のプロモーターは、*A.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である。

amdS 遺伝子のプロモーターは、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株由来の基本転写因子の一つをコードする *tef1* 遺伝子のプロモーターである。

pyrG 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 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

cel5A TS008 遺伝子のターミネーターは、*A.niger* BO-1 株由来のグルコアミラーゼをコードする *amg* 遺伝子のターミネーターである。

amdS 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* Glasgow 野生株由来の *amdS* 遺伝子のターミネーターである。

pyrG 遺伝子のターミネーターは、*A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子のターミネーターである。

（3）その他の事項

A. niger BO-1 株由来の特定の遺伝子の 5'側非翻訳領域が *cel5A* TS008 遺伝子の発現を促進する目的で用いられた。また、部位特異的組換えの標的のインテグラーゼ認識配列が用いられている。

欠失操作を行った複数の遺伝子座において、標的遺伝子との相同組換えによ

り、*A.niger* BO-1 株由来の *pyrG* 遺伝子及び *A. nidulans* NRRL1092 株由来の *pyrG* 遺伝子ターミネーターが宿主ゲノムに残存した。

6. ベクターへの挿入 DNA の組込方法等に関する事項

(1) 挿入 DNA のクローニング又は合成方法に関する事項

cel5A TS008 遺伝子は、*T. reesei* QM6a 株のゲノム DNA を鋳型として PCR 法で増幅した野生型遺伝子に複数の特定箇所のアミノ酸置換が起こるように PCR 法により変異を導入し、*T. reesei* 由来のキシラナーゼ遺伝子の分泌シグナル配列をコードする配列を付加して得られた。

amdS 遺伝子は、*A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により増幅して得られた。

pyrG 遺伝子は、*A. nidulans* NRRL1092 株のゲノム DNA を鋳型として、PCR 法により増幅して得られた。

(2) 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 pBluescript SK に、*asaA* プロモーター断片、インテグラーゼ遺伝子断片、*niaD* ターミネーター断片、FRT-F3 配列、FRT-F 配列、*na2* プロモーター断片、*cel5A TS008* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*tef1* プロモーター断片、*amdS* 遺伝子断片及び *amdS* ターミネーター断片を挿入し、pJPV059 を作製した。

7. 構築されたコンストラクトに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列並びに制限酵素による切断地図に関する事項

pJPV059 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 10）。

(2) 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コンストラクト上で明らかであること

意図する挿入領域は、pJPV059 の FRT-F 配列から FRT-F3 配列までの *cel5A TS008/amdS* 遺伝子発現カセットを含む領域である（参照 10）。

(3) 導入しようとするコンストラクトは、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されていること

pJPV059 は、大腸菌を用いて調製・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。

第3. 遺伝子組換え体に関する事項

1. 宿主との差異に関する事項

JPAN011 株は、*cel5A TS008/amdS* 遺伝子発現カセットが複数コピー導入されている点及び複数の遺伝子を欠失している点で宿主と異なる。

2. 遺伝子導入に関する事項

(1) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

cel5A TS008 遺伝子のコピー数及び挿入近傍配列を確認するため、挿入領域のシーケンス解析を行った。その結果、*cel5A TS008* 遺伝子が特定の遺伝子座に複数コピー挿入されていることが示された（参照 11）。挿入された DNA の近傍の DNA 配列は明らかとなっている。JPAN011 株では複数の遺伝子座において標的の遺伝子配列が欠失していることが確認された。また、これらの遺伝子座に欠失導入用ベクター由来の、*pyrG* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子ターミネーターが残存していることが確認された。

(2) ORF の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

cel5A TS008/amdS 遺伝子発現カセットの特定遺伝子座への挿入による宿主ゲノムとの接合部位に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。）の有無を調べる目的で、遺伝子導入された標的遺伝子座における挿入 DNA 並びに 5' 近傍配列及び 3' 近傍配列を含む領域について ORF 検索を行った（参照 11）。また、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより遺伝子を欠失した複数の遺伝子座については、*A. niger* BO-1 株由来の *pyrG* 遺伝子及び *A. nidulans* NRRL1092 株の *pyrG* 遺伝子ターミネーター断片が JPAN011 株のゲノムに残存するため、*cel5A TS008/amdS* 遺伝子発現カセットを挿入した遺伝子座と同様に ORF 検索を行った（参照 12～14）。その結果、全ての遺伝子座における挿入 DNA とその近傍配列に、6 通り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 1057 個検出された。

a. 既知のアレルゲンとの構造相同性

検出された ORF について、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。既知のアレルゲンと連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示す ORF を検索した結果、*Ambrosia artemisiifolia*（ブタクサ）由来、*Lupinus angustifolius*（ルピナス）由来、*Candida albicans*（カンジダアルビカンス）由来、*Aedes aegypti*（ネッタイシマカ）由来、*Oncorhynchus mykiss*（ニジマス）由来、*Dermatophagoides pteronyssinus*（ヒョウダニ）由来のアレルゲンと相同性を持つ ORF が 5 つ検出された。これらの ORF は宿主ゲノムの塩基配列から得られた ORF であり、DNA の導入により新たに生じたものではなかった（参照 12～18）。また、既知のアレルゲンと連続した 8 アミノ酸配列が一致する ORF を検索した結果、*Arachis hypogaea*（ラッカセイ）由来及び *Thunnus albacares*（キハダマグロ）由来のアレルゲン

^d COMprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE) (version 2023) 検索日：2023 年 2 月（参照 15、16、17、18）：2023 年 5 月（参照 12、13、14）

との相同性を持つ ORF が 1 つ、*Blattella germanica* (チャバネゴキブリ) 由来及び *Stachybotrys chartarum* (スタキボトリス シャルタラム (黒カビ)) 由来のアレルゲンとの相同性を持つ ORF が 2 つ検出された (参照 17、18)。これらの ORF は全て宿主ゲノムの塩基配列から得られた ORF であり、遺伝子導入により新たに生じたものではなかった (参照 12~18)。

b. 既知の毒性タンパク質との構造相同性

検出された ORF について、タンパク質データベース^eを用いて E-value < 1.0×10^{-5} を指標にして相同性検索を行った。

その結果、2 つの ORF がデータベース中の既知の毒性タンパク質と相同性を示し、このタンパク質は *Kribbella* 属由来の toxin glutamine deamidase domain-containing protein 及び主に *Aspergillus* 属由来の MFS (major facilitator superfamily) toxin efflux pump であったが、これらの ORF は宿主ゲノムの塩基配列から得られた ORF であり、遺伝子導入により新たに生じたものではなかった。

以上のことから、本酵素製品中にアレルギー誘発性又は毒性を有するタンパク質が含まれる可能性は低いと考えられた。

3. 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の安全性に関する事項

pJPV059 及び欠失導入用ベクターはアンピシリン耐性遺伝子を持つが、JPAN011 株のゲノム上に残存していないことはシーケンス解析により確認している。

4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギー誘発性に関する事項（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子を用いている場合には、その遺伝子産物（抗生物質代謝酵素等）についても評価すること。）

- (1) 導入遺伝子の供与体（遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子の供与体を含む。）のアレルギー誘発性（グルテン過敏性腸炎誘発性を含む。以下同じ。）に関する知見が明らかであること

T. reesei は、アレルギー誘発性において問題となる菌種ではないとされている。また、*T. reesei* QM6a 株のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^fを行った結果、ヒットする文献は得られなかった。

A. nidulans 及び *A. niger* BO-1 株は、アレルギー誘発性において問題となる菌種ではないとされている。

^e NCBI (National Center for Biotechnology Information) データベース (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) に登録されているタンパク質の中から、「toxin」をキーワードとして検索して得た 803,068 (2021 年 4 月時点) エントリーを毒性関連タンパク質とした。
検索日：2023 年 2 月 (参照 15~18) ; 2023 年 5 月 (参照 12~14)

^f PubMed (検索日：2022 年 7 月)

(2) 遺伝子産物（タンパク質）についてそのアレルギー誘発性に関する知見が明らかであること。

セルラーゼ cel5A TS008 を有効成分とする酵素製品について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

また、*T. reesei* QM6a 株由来のセル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^fを行った。その結果、ヒットする文献は得られなかった。

アセトアミダーゼのアレルギー誘発性を示唆する報告はない。*amdS* 遺伝子は、選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く使用されている。したがって、*amdS* 遺伝子産物がアレルギー誘発性を有するとは考えにくい。

オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼのアレルギー誘発性を示唆する報告はない。*pyrG* 遺伝子は選択マーカーとして長年使われてきた実績があり、この遺伝子が導入された遺伝子組換え微生物は食品用酵素の生産菌として広く用いられている。したがって、*pyrG* 遺伝子産物がアレルギー誘発性を有するとは考えにくい。

(3) 遺伝子産物（タンパク質）の物理化学的処理に対する感受性に関する事項

① セルラーゼ cel5A TS008

a. 人工胃液に対する感受性

cel5A TS008 製品を人工胃液に加え、最長で 3 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE で分析した。その結果、セルラーゼ cel5A TS008 は、反応開始後 5 分以内に完全に消化されることが示された（参照 19）。

b. 人工腸液に対する感受性

cel5A TS008 製品を人工腸液に加え、最長で 6 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE で分析した。その結果、セルラーゼ cel5A TS008 は、6 時間の処理ではほとんど消化されないことが示された（参照 19）。

c. 加熱処理に対する感受性

cel5A TS008 製品を pH5.0 の条件下で各温度帯で 30 分処理した後、活性を測定した。その結果、セルラーゼ cel5A TS008 は、68℃付近で活性が減少し始め、95℃の処理で完全に失活することが示された（参照 20）。

② アセトアミダーゼ

アセトアミダーゼは、我が国において長い使用実績があり、既に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了している品目で発現するアセトアミダーゼとアミノ酸配列が同じであることから、物理化学的処理に対する感受性試験は実施しなかった。

③ オロチジン 5' -リン酸デカルボキシラーゼ

オロチジン 5' -リン酸デカルボキシラーゼは、我が国において長い使用実績があり、既に食品安全委員会の食品健康影響評価が終了している品目で発現するオロチジン 5' -リン酸デカルボキシラーゼとアミノ酸配列が同じであることから、物理化学的処理に対する感受性試験は実施しなかった。

(4) 遺伝子産物（タンパク質）と既知のアレルゲン（グルテン過敏性腸疾患に關与するタンパク質を含む。以下「アレルゲン等」という。）との構造相同性に関する事項

セルラーゼ cel5A TS008 のアレルギー誘発性の可能性を調べるために、アレルゲンデータベース^dを用いて既知のアレルゲンと相同性検索を行った。80 アミノ酸残基で 35%以上一致する既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。（参照 15～18）

その他の詳細は、第 3 - 2 （2）に記載のとおりである。

以上から、セルラーゼ cel5A TS008、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。

第 4. 遺伝子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

cel5A TS008 製品の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に長年安全に使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

cel5A TS008 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。また、本製品の原料は、Food Chemicals Codex 等の規格に適合している。

第 5. 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

cel5A TS008 製品は、2023 年以降に欧米で販売が開始されている。デンマークにおいて、2023 年 1 月に食品用加工助剤として承認されている。米国において、米国食品医薬品庁（FDA）の GRAS として認証されている（参照 21）。

2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項

生産菌は除菌ろ過により、cel5A TS008 製品中から分離除去される。cel5A TS008 製品中に遺伝子組換え体由来の DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した（参照 22）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

セルラーゼ cel5A TS008 の製品化前の酵素サンプルは、食品衛生法に基づく成分規格（非有効成分）を満たしている（参照 6）。

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、安全性に問題が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

セルラーゼ cel5A TS008 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。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

セルラーゼ cel5A TS008 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 6. 第 1 から第 5 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 1 から第 5 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

「JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼ」について、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物に関する食品健康影響評価指針」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、導入遺伝子の安全性、導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、「JPAN011 株を利用して生産されたセルラーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 食品用酵素データ集－取り扱い手法と実践－：株式会社シーエムシー出版；2013年7月31日.
2. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, van Dijk PWM. On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Review 2002;59(4-5):426-435.
3. 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BSL分類等」. https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_2020101-1.pdf [accessed May 31 2021].
4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程（改訂第三版）. https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_20200401.pdf [accessed May 31 2021].
5. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, Article 2007;25(2):221-231.
6. Certificate of analysis（社内文書）
7. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology*, Article; Proceedings Paper 2003;41(1):29-36.
8. Nevalainen H, Suominen P, Taimisto K. ON THE SAFETY OF TRICHODERMA-REESEI. *Journal of Biotechnology*, Review 1994;37(3):193-200.
9. Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Review 2010;87(3):787-799.
10. 遺伝子導入用ベクターpJPV059のDNA塩基配列並びに構成（社内文書）
11. JPAN011株の遺伝子挿入部位の塩基配列（社内文書）
12. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of C2218 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）
13. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of C2218 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）
14. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of C2218 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）
15. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN011 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）
16. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN011 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）
17. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN011 to proteins from NCBI and allergens（社内文書）

18. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAN011 to proteins from NCBI and allergens (社内文書)
19. Digestibility of cel5A TS008 protein in a test batch (社内文書)
20. Temperature and pH activity profiles and temperature stability of endoglucanase from *Trichoderma reesei* (社内文書)
21. FDA. 2023. GRAS Notices GRN No.1030 Cellulase enzyme preparation produced by *Aspergillus niger* genetically engineered to express a cellulase gene from *Trichoderma reesei*
<https://www.cfsanappsexternal.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&id=1030>. [accessed March 6, 2024.]
22. Absence of recombinant DNA in the product (社内文書)