

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAo010 株を利用して生産された
ポリフェノールオキシダーゼ

令和6年（2024年）11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	8
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	9
1. ベクターの名称及び由来に関する事項	9
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	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
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	14
4. 遺伝子産物（タンパク質）のアレルギ－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。）	14
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	16
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	16
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	16
第 5. 遺伝子組換え添加物に関する事項	17

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	17
2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項	17
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	17
4. 精製方法及びその効果に関する事項	17
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	17
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	17
Ⅲ. 食品健康影響評価結果	18
<参照>	19

＜審議の経緯＞

2022 年 9 月 27 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 0927 第 2 号）、関係書類の接受

2022 年 10 月 4 日 第 874 回食品安全委員会（要請事項説明）

2022 年 10 月 24 日 第 229 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2024 年 9 月 30 日 第 255 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2024 年 11 月 12 日 第 961 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

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

2024 年 7 月 1 日から

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＞

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

2024 年 4 月 1 日から

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 229 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）

手島 玲子（岡山理科大学獣医学部食品衛生講座教授）

要 約

「JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Thermothelomyces thermophilus* CBS 117.65 株に由来するポリフェノールオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ（ラッカーゼ）である。ポリフェノールオキシダーゼのうちラッカーゼは、酸素を水に還元し、フェノール類をキノン体へ酸化する反応を触媒する酵素である。キノン体が硫黄化合物等を含む臭気成分と反応することで消臭効果を発揮することから、本添加物は、口内の消臭効果を付与する目的でガム等の菓子類に添加される。

「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、「JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ」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：JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ

用 途：食品中の植物由来成分の酸化

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 oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Thermothelomyces thermophilus* CBS 117.65 株に由来するポリフェノールオキシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼである。ポリフェノールオキシダーゼは、ポリフェノールの水酸基を酸化する酵素の総称であり、本添加物はポリフェノールオキシダーゼのうちフェノール類をキノン体へ酸化するラッカーゼである。本添加物は、キノン体が硫黄化合物等を含む臭気成分と反応することにより、口内の消臭効果を付与する目的でガム等の菓子類に添加される。

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：ポリフェノールオキシダーゼ (ラッカーゼ)

生 産 菌：*Trametes versicolor*

有効成分：ポリフェノールオキシダーゼ (ラッカーゼ)

EC No.：EC 1.10.3.2

CAS No.：9002-10-2

(2) 製造方法

ポリフェノールオキシダーゼは、培養工程、培養液から抽出、除菌及び精製などの工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

ポリフェノールオキシダーゼは、ポリフェノールの水酸基を酸化させる酵素である。ポリフェノールオキシダーゼのうち、ラッカーゼは酸素を水に還元し、フェノール類をキノン体に酸化する反応を触媒する銅含有酵素である。キノン体は電子受容性が高く、硫黄化合物などを含む臭気成分と反応し、消臭効果を発揮することが知られている。

ポリフェノールオキシダーゼは、植物抽出物とともに菓子類に配合し、植物抽出物中のフェノール類の酸化により生じたキノン体が口内の臭気成分と反応

することで、消臭効果を発揮することを目的に活性を有した状態でガム等の菓子類に添加されている。

海外では、ビール製造におけるオフフレーバー及びワイン製造におけるコルク臭を防ぐこと、果実・果汁飲料の保管におけるオリ及び沈殿を抑制すること、茶飲料の着色を向上させること等を目的に使用されている。

(4) 摂取量

ポリフェノールオキシダーゼが用いられる可能性がある食品として、錠菓、板ガム、糖衣ガム及び風船ガムが考えられる。ポリフェノールオキシダーゼ製品が全ての「錠菓」、「板ガム」、「糖衣ガム」及び「風船ガム」^aの製造に使用されると仮定した場合、最終食品（菓子）におけるポリフェノールオキシダーゼの含有率を加味すると、最大一日摂取量は 0.515 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. oryzae* IFO4177 株である。本菌株は、清酒麴から分離された野生株であり（参照 1）、独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門において NBRC4177 株として登録、保管されている。

(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. oryzae は、食品用酵素の生産菌として、長年にわたり安全に使用されている。また、麴菌として味噌、醤油、醸造酒等の発酵食品の製造に広く用いられている（参照 2、3）。

(3) 宿主の構成成分等に関する事項

A. oryzae は、一般的に非病原性の微生物である。*A. oryzae* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程の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。また、*A. oryzae* は病原体等のリスク群 1 に分類される（参照 4）。したがって、IFO4177 株は非病原性であると考えられる。

A. oryzae によるアフラトキシンの産生は確認されていない。*A. oryzae* の中に、シクロピアゾン酸、コウジ酸及びβ-ニトロプロピオン酸を産生する株も報告されている（参照 5）。

A. oryzae は、味噌、醤油、醸造酒等の製造に長年にわたり安全に使用されてきた経緯があり、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

^a 平成 22 年度厚生労働省食品摂取頻度・摂取量調査の特別集計業務 報告書追加資料（国立健康・栄養研究所）。個別食品平均摂取量。錠菓（食品番号 15106）、板ガム（食品番号 15118）、糖衣ガム（食品番号 15119）、風船ガム（食品番号 15120）。

は低いと考えられる。なお、*A. oryzae* 由来の酵素のうち、Asp o 13 及び Asp o 21 がアレルゲンとしてデータベース^bに登録されているが、これらは吸入性アレルゲンとして整理される。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae 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. oryzae には、ヒトに対して病原性を示す外来因子の存在を示唆する報告はない。

(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. oryzae 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* 並びにアフラトキシンを産生する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* が知られているが（参照 6）、*A. oryzae* はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを有するものの、そのほとんどのアフラトキシン生合成遺伝子は転写機能を失っている（参照 7、8）。

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

ポリフェノールオキシダーゼ (*lacMT*) 遺伝子の供与体は、*T. thermophilus* CBS 117.65 株である。オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ (*pyrG*) 遺伝子及びロイシン合成酵素 (*LEU2*) 遺伝子の供与体は、それぞれ *A. oryzae* IFO4177 株及び *Saccharomyces cerevisiae* CBS1171T 株である。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

lacMT 遺伝子は、ポリフェノールオキシダーゼ (*lacMT*) をコードする。*pyrG* 遺伝子はオロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼを、*LEU2* 遺伝子はロイシン合成酵素をコードし、いずれも選択マーカーとして用いた。

lacMT 遺伝子、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子の遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクター pJPV047 全体を部位特異的相同組換えにより標的となる宿主の特定の遺伝子座へ導入した。

^b WHO/IUIS Allergen Nomenclature

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：lacMT 製品

有効成分：ポリフェノールオキシダーゼ（ラッカーゼ、lacMT）

EC No.：EC 1.10.3.2

CAS No.：9002-10-2

(2) 製造方法

lacMT 製品は、JPAo010 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

lacMT 製品は、従来のポリフェノールオキシダーゼ（ラッカーゼ）と同様である。植物抽出物とともに菓子類に配合し、植物抽出物中のフェノール類の酸化により生じたキノン体が口内の臭気成分と反応することで、消臭効果を発揮することを目的に活性を有した状態でガム等の菓子類に添加される。

(4) 推定摂取量

従来のポリフェノールオキシダーゼ製品が全て本申請添加物を用いた製品に置き換わったと仮定して、全ての「錠菓」、「板ガム」、「糖衣ガム」及び「風船ガム」^aの製造に使用され、最終製品中に 100%残存した場合、最大一日摂取量は 0.515 µg TOS (Total Organic Solids) / kg 体重/日である。

なお、米国などにおいて既に上市されている、lacMT 製品が添加された最終食品（錠菓）について、一日当たりの摂取目安量、最終食品（錠菓）のポリフェノールオキシダーゼ含有量及び日本人の平均体重 (55.1kg) を加味した場合、体重 1 kg 当たりの最大一日摂取量は 45.4 µg TOS/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

lacMT は、従来のポリフェノールオキシダーゼと同様に、ポリフェノールの水酸基を酸化する酵素である。本添加物はポリフェノールオキシダーゼのうちフェノール類をキノン体へ酸化するラッカーゼである。

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

lacMT と従来のポリフェノールオキシダーゼとの相違点は、生産菌、アミノ酸残基数、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

JPAo010 株と宿主との相違点は、JPAo010 株には *lacMT* 遺伝子が複数コピー導入され、ポリフェノールオキシダーゼの高産生能を獲得している点、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子を導入している点である。

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

pJPV047 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 が用いられた。

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 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(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 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 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 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 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

lacMT 遺伝子の供与体は、*T. thermophilus* CBS 117.65 株である。*T. thermophilus* は、土壌や堆肥に生息する子囊菌である（参照 9）。また、*T. thermophilus* (*Myceliophthora thermophila*) 由来のポリフェノールオキシダーゼ（ラッカーゼ）は、食品、繊維及び紙・パルプ分野において産業利用の実績がある。海外では、ビール製造におけるオフフレーバー及びワイン製造におけるコルク臭を防ぐこと、果実・果汁飲料の保管におけるオリ及び沈殿を抑制すること、茶飲料の着色を向上させること等を目的に使用されている。（参照 10）

pyrG 遺伝子の供与体は、*A. oryzae* IFO4177 株である。*A. oryzae* は、食品や

食品用酵素の製造において、長年にわたり安全に使用されている。

LEU2 遺伝子の供与体は、*S. cerevisiae* CBS1171T 株である。*S. cerevisiae* は、パン酵母やアルコール発酵用酵母として、食品製造において長年にわたり安全に使用されている。

T. thermophilus、*A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* は、いずれも国立感染症研究所の「病原体等安全管理規程 別冊 1「病原体等の BSL 分類等」」において BSL2 及び 3 の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない（参照 4）。また、*A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* 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、病原体等のリスク群分類のリスク群 1 に分類され则认为られる（参照 11）。

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）*lacMT* 遺伝子

lacMT 遺伝子は、ポリフェノールオキシダーゼ活性を有する *lacMT* をコードする。

lacMT は、ポリフェノールオキシダーゼのうちラッカーゼに分類され、酸素を水に還元し、フェノール類をキノン体に酸化する反応を触媒する。キノン体が硫黄化合物等を含む臭気成分と反応することで、*lacMT* は消臭効果を発揮する。（参照 12、13）

（2）*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。

（3）*LEU2* 遺伝子

LEU2 遺伝子は、ロイシン合成酵素をコードし、ロイシ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

lacMT 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* 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. nidulans* のトリオースリン酸異性化酵素合成遺伝子のプロモーター断片を連結させた *na2/tpi* プロモーターである。

pyrG 遺伝子のプロモーターは、*A. oryzae* のチアミン合成酵素遺伝子に由来するプロモーターである。

LEU2 遺伝子のプロモーターは、*S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子に由来する野生型のプロモーターである。（参照 14）

(2) ターミネーターに関する事項

lacMT 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 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. oryzae* に由来する *pyrG* 遺伝子の野生型のターミネーターである。

LEU2 遺伝子のターミネーターは、*S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子に由来する野生型のターミネーターである。（参照 14）

(3) そのほかの事項

部位特異的組換えの標的配列及び導入後のマーカー遺伝子として用いられる配列が含まれる。（参照 14）

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

lacMT 遺伝子は、*T. thermophilus* CBS 117.65 株のゲノム DNA を鋳型として、シグナル配列を含む *lacMT* をコードする配列を PCR 法により増幅して得られた。

pyrG 遺伝子は、*A. oryzae* IFO4177 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。

LEU2 遺伝子は、*S. cerevisiae* CBS1171T 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

プラスミドベクター pUC19 に、*na2ltpi* プロモーター断片、*lacMT* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*LEU2* 遺伝子断片、*pyrG* ターミネーター断片、*pyrG* 遺伝子断片等を挿入し、pJPV047 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

pJPV047 の塩基数及び塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかにになっている。（参照 14）

(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、pJPV047 の全領域である。（参照 14）

(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

pJPV047 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

JPAo010 株は、pJPV047 の挿入により *lacMT* 遺伝子発現カセット、*pyrG* 遺伝子発現カセット及び *LEU2* 遺伝子発現カセットが多コピー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) コピー数及び挿入近傍配列に関する事項

lacMT 遺伝子のコピー数及び pJPV047 の挿入近傍配列を確認するため、ddPCR (droplet digital PCR) 解析及び JPAo010 株の全ゲノムシーケンス解析を行った。その結果、*lacMT* 遺伝子が特定の遺伝子座に複数コピー挿入されていると推定された (参照 15、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

① コンストラクト

pJPV047 について、*lacMT* 遺伝子、相同組換え標的遺伝子の部分配列、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子以外のオープンリーディングフレーム (以下「ORF」という。) の有無を確認するため、pJPV047 全領域について 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 が合計 213 個検出された。(参照 17)

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^cを用いて相同性検索を行った。その結果、連続する 80 アミノ酸配列に対して 35%以上の相同性を示すアレルゲンとして、*lacMT* をコードする塩基配列の一部で検出された 4 つの ORF が、ウシ由来のアレルゲン (コラーゲン)、コムギ由来のアレルゲン (グルテン) と相同性を示した。また、同様に *lacMT* をコードする塩基配列の一部で検出されたもう 1 つの ORF が、スズキ目アカメ科に属する魚の一種 (*Lates calcarifer*) 由来のアレルゲン (コラーゲン) 及びタイセイヨウサケ (*Salmo salar*) 由来のアレルゲン (コラーゲン) と相同性を示した。しかしながら、これらの ORF は、*lacMT* をコードする塩基配列の本来の読み枠ではなかった。さらに、既知のアレルゲンとの間に連続する 8 アミノ酸の一致はなかった。

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として、*lacMT* をコードする塩基配列の一部で検出された 1 つの ORF が、A.

^c Allergen Online (ネブラスカ大学の食物アレルギー研究資源プログラムによるデータベース) (version 21) (検索: 2021 年 7 月)

fumigatus 及び *A. fumigatus* var. RP-2014 由来の既知のアレルゲン (Accession number O42799.2 及び KEY78748.1) と相同性を示した。しかしながら、当該 ORF は、*lacMT* をコードする塩基配列の本来の読み枠で検出された ORF ではないことに加え、相同性を示した既知のアレルゲンは吸入をばく露経路とするアレルゲンであり食物アレルゲンとして登録されていない。また、当該 ORF と相同性を示した既知のアレルゲンは、80 アミノ酸残基で 35%以上の条件では相同性を示していなかった。さらに、アレルゲンデータベース^dによるエピトープ検索を行ったところ、一致するアレルゲンエピトープは認められなかった。

以上のことから、これらの ORF について、食物アレルギー誘発性の懸念は小さいと考えられた。(参照 17)

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、NCBI データベース^eを用いて $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標として相同性検索を行った。その結果、1 つの ORF がデータベース中の既知のタンパク質と相同性を示した。このタンパク質 (Potential toxin to DivIC) は、細胞分裂関連タンパク質である DivIC への毒性を有する可能性があるタンパク質として登録されている。DivIC は細菌などで増殖又は芽胞の膜形成に必須のタンパク質であるとされている (参照 18)。しかしながら、DivIC はヒトではなく、細菌中の細胞分裂関連タンパク質であることに加え、該当 ORF と Potential toxin to DivIC の配列間に複数のギャップが存在することが認められた。また、*lacMT* をコードする *lacMT* 遺伝子の部分配列ではあるが、本来の *lacMT* 遺伝子の ORF とは逆方向の読み枠で検出された ORF である。したがって、当該 ORF が Potential toxin to DivIC のような毒性をヒトに対して有するとは考えにくく、実際に転写される可能性も低いと考えられた。(参照 17)

以上のことから、pJPV047 には、アレルギー誘発性又は毒性を有するタンパク質をコードする ORF が含まれる可能性は低いと考えられた。

② 近傍配列との境界領域

pJPV047 の導入により宿主ゲノムとの接合部位に新たに生じる ORF 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 19)。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 71 個検出された。

^d Allergen Database for Food Safety (国立医薬品食品衛生研究所が公開しているアレルゲンのデータベース) (2022 年 2 月 21 日版) (検索日: 2022 年 10 月)

^e NCBI データベース (検索日: 2021 年 7 月)

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^eを用いて相同性検索を行った。その結果、宿主ゲノムと挿入配列を跨ぐ ORF と 80 アミノ酸残基で 35%以上が一致するアレルゲンは検出されなかった（参照 19）。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 19）。

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、NCBI データベース^eを用い、 $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標にして検索を行った（参照 19）。その結果、データベース中の既知のタンパク質と相同性を示した ORF は認められなかった。

以上のことから、遺伝子導入によって新たに生じた ORF が発現したとしても、本酵素製品中に食物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

pJPV047 には抗生物質耐性マーカー遺伝子が含まれない（参照 14）。遺伝子欠失ベクターに用いられたアンピシリン耐性遺伝子が JPAo010 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。

pJPV047 にはほかに遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子が複数含まれる。pJPV047 全体が染色体に挿入されると、欠失していた宿主の標的遺伝子が完全長となり、選択マーカーとして機能する。他の選抜に利用された遺伝子も含め、これらは *A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* 由来のものである。

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. thermophilus は、以前 *Myceliophthora thermophila* と呼称されていた。*T. thermophilus* 及び *M. thermophila* に関して、アレルギー誘発性で問題となった報告はない。なお、*T. thermophilus* 及び *M. thermophila* のアレルギー誘発性の可能性について文献検索^fを行った結果、該当する文献は得られなかった。したがって、アレルギー誘発性を有するとは考えにくい。

A. oryzae は、味噌、醤油、醸造酒等の製造に長年にわたり安全に使用されてきた経緯があり、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

^f PubMed（検索日：2022 年 5 月）

は低いと考えられる。なお、*A. oryzae* 由来の酵素として、Asp o 13 及び Asp o 21 がアレルゲンとしてデータベース^bに登録されているが、これらは吸入性アレルゲンとして整理される。

S. cerevisiae は、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

- (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。

lacMT 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. thermophilus* 及び *M. thermophila* に加え、*T. versicolor* が有するポリフェノールオキシダーゼ（ラッカーゼ）の食物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、該当する文献は得られなかった。したがって、lacMT 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。

ロイシン合成酵素のアレルギー誘発性を示唆する報告はない。LEU2 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、LEU2 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 lacMT

a. 人工胃液に対する感受性

lacMT 製品を人工胃液に加え、3 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットで分析した結果、lacMT は反応開始後 30 秒以内に完全に消化されることが示された（参照 20）。

b. 人工腸液に対する感受性

lacMT 製品を人工腸液に加え、6 時間消化処理を行った後、SDS-PAGE 及びウェスタンブロットで分析した結果、lacMT は 6 時間の処理では顕著に消化されないことが示された（参照 20）。

c. 加熱処理に対する感受性

lacMT を pH6.0 で各温度帯で 30 分処理した後、活性を測定した。その結果、lacMT は 50℃を超える処理で残存活性が急激に低下し、70℃の処理でほぼ失活することが示された（参照 21）。

② 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。

③ ロイシン合成酵素

ロイシン合成酵素は、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ロイシン合成酵素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

lacMT 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[○]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% 以上一致する条件において相同性検索を行った結果、一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 17）。また、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する条件において、相同性検索を行った結果、lacMT と連続する 8 アミノ酸配列で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 17）。

その他の詳細は、第 3 - 2（2）① a. に記載のとおりである。

以上のことから、lacMT、オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ及びロイシン合成酵素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

lacMT 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

lacMT 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

lacMT 製品は、2000 年代から欧米で食品用加工助剤として販売されている。また、米国において、菓子類へ添加した製品が 2020 年に販売され、lacMT は GRAS として認証されており（参照 22）、酵素活性を有した状態で菓子類へ添加されている。lacMT 製品による健康被害などは報告されていない。

2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項

lacMT 製品中に生産菌由来の DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した。（参照 23）

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

lacMT 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 24）

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

lacMT 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

lacMT 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。

（参考）

細菌を用いた復帰突然変異試験（処理濃度：0、156、313、625、1,250、2,500 及び 5,000 µg/ml）（参照 25）、ヒトの末梢血リンパ球を用いた染色体異常試験（参照 26）、ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験（参照 27）を行った結果、いずれの試験においても lacMT と同じアミノ酸配列を有するポリフェノールオキシダーゼに起因する異常は認められなかった。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ」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、「JPAo010 株を利用して生産されたポリフェノールオキシダーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 坂口謹一郎, 山田浩一, 麹菌の形態と其の分類に就て (其の1)。日本農芸化学会誌. 1944;20(1):65-73
2. Wood BJB. Oriental Food Uses of *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (editors). The British Mycological Symposium. London: Academic Press; 1977:481-498.
3. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. Appl Microbiol Biotechnol 1992;36(5):569-572
4. 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」
5. Frisvad JC, Moller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. Applied Microbiology and Biotechnology 2018;102(22):9481-9515
6. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. Food Technology and Biotechnology 2003;41(1):29-36
7. Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O et al. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. Appl Environ Microbiol 2006;72(1):484-490
8. Kusumoto K, Nogata Y, Ohta H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. Curr Genet 2000;37(2):104-111
9. Nourrisson C, Garcia-Hermoso D, Morio F, Kauffmann-Lacroix C, Berrette N et al. *Thermothelomyces thermophila* human infections. Clinical Microbiology and Infection 2017;23(5):338-341
10. Mate DM, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. Microbial Biotechnology 2017;10(6):1457-1467
11. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (改訂第三版)
12. 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日発行
13. 高垣奈保, 児玉悠史, 森田大紀, 徳本匠, 桜井孝治, 他: 甜茶抽出物とペルオキシダーゼの組合せによる酵素的消臭効果。日本食品科学工学会誌 2015;62(8):409-416
14. 遺伝子導入ベクター pJPV047 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
15. JPAo010 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
16. Copy number of the expression cassette in the production strain (社内文書)
17. Sequence homology of ORFs in the pJPV047 on the genome of JPAo010 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
18. Levin PA, Losick R. Characterization of a cell-division gene from bacillus-

- subtilis that is required for vegetative and sporulation septum formation.
Journal of Bacteriology 1994;176(5):1451-1459
19. Sequence homology of ORFs in the pJPV047 insertion locus on the genome of JPAo010 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
 20. Purity and Digestibility of lacMT protein in a test batch PPQ64326 (社内文書)
 21. Temperature and pH activity profile and temperature stability of laccase produced by *Aspergillus oryzae*, strain, JPAo010 (社内文書)
 22. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search= [accessed May11, 2020]
 23. Absence of recombinant DNA in the product (社内文書)
 24. Characterization of Representative Batches and Toxbatch from JPAo010 (社内文書)
 25. Laccase (Batch Number: PPX 5720): Test for Mutagenic Activity with Strains of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* (社内文書)
 26. Laccase, PPX 5720: Lymphocyte Cytogenetic Study (社内文書)
 27. Laccase, PPX 5720: Toxicity Study By Oral (Gavage) Administration To CD Rats For 13 Weeks (社内文書)