

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

NGX 株を利用して生産された
キシラナーゼ

令和7年（2025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＞	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	9
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	10
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	11
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	12
第 3. 遺伝子組換え体に関する事項	13
1. 宿主との差異に関する事項	13
2. 遺伝子導入に関する事項	13
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	15
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。）	15
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＞

- 2025 年 6 月 3 日 内閣総理大臣から遺伝子組換え添加物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 359 号）、関係書類の接受
- 2025 年 6 月 10 日 第 986 回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2025 年 6 月 25 日 第 265 回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2025 年 8 月 5 日 第 994 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 265 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

「NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Trichoderma reesei* RL-P37 株を宿主として、*Fusarium verticillioides* FCP906D 株のキシラナーゼ遺伝子を改変して合成した NGX 遺伝子を導入することにより作製された NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、アラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦からでん粉の糖化製品（異性化糖・水あめ等）及び発酵製品としての醸造アルコールの製造工程で添加される。

「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、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、「NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼ」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：NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼ

用 途：小麦からでん粉の糖化製品及び醸造アルコールを製造する工程の加工助剤

申請者：ダニスコジャパン株式会社

開発者：DANISCO US, INC. (米国)

本添加物は、*Trichoderma reesei* RL-P37 株を宿主として、*Fusarium verticillioides* FCP906D 株のキシラナーゼ遺伝子を改変して合成した NGX 遺伝子を導入することにより作製された NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼである。本添加物は、アラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦からでん粉の糖化製品（異性化糖・水あめ等）及び発酵製品としての醸造アルコールの製造工程で添加される。

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：キシラナーゼ

生 産 菌：*Trichoderma reesei*

有効成分：キシラナーゼ

EC No. : EC 3.2.1.8

CAS No. : 9025-57-4

(2) 製造方法

キシラナーゼは、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。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

キシラナーゼは、アラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、でん粉の糖化製品及び醸造アルコールの製造工程で添加される。キシラナーゼは糖化製品製造工程では洗浄、ろ過、精製工程で除去され、醸造アルコール製造工程では液化工程で失活し蒸留工程で気化しないため、最終食品には活性を有する酵素は残存しない。

(4) 摂取量

従来のキシラナーゼが全ての穀物のでん粉加工工程に使用され、最終製品で

ある糖化製品中に 100%残存すると仮定した場合^aの推定一日摂取量は 2.565 mg TOS (Total Organic Solids) /人/日である。したがって、推定される従来のキシラナーゼの推定一日摂取量 (糖化製品) は 0.047 mg TOS/kg 体重/日である。

また、従来のキシラナーゼが全ての醸造アルコールの製造工程に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^bの推定一日摂取量は 9.94 mg TOS/人/日である。したがって、推定される従来のキシラナーゼの推定一日摂取量 (醸造アルコール) は 0.18 mg TOS/kg 体重/日である。

これらのことから、推定される従来のキシラナーゼの推定一日摂取量の合計値は 0.23 mg TOS/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、*T. reesei* RL-P37 株である。この菌株は、ATCC (American Type Culture Collection) において Biosafety Level 1 に分類されている野生型 *T. reesei* QM6a 株 (基準株) から、紫外線照射とニトロソグアニジンへの暴露で生じたセルラーゼ高効率生産菌株である (参照 1、2)。

(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

第 10 版食品添加物公定書において、*T. reesei* はキシラナーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼ、グルカナーゼ、 β -グルコシダーゼ及びヘミセルラーゼの基原生産菌の一つであり、既存食品添加物の基原生産菌として安全に使用されている。

(3) 宿主の構成成分等に関する事項

T. reesei は、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 に分類されておらず、取扱い保存に関して最小限の安全処置で十分な BSL1 の微生物に相当すると考えられる (参照 3)。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

T. reesei QM6a 株には、腸管内への寄生性及び定着性を示唆する報告はない (参照 4)。

(5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

T. reesei は非病原性であり、有害生理活性物質の生産はないと考えられる。*T. reesei* RL-P37 株は、他の *T. reesei* 菌株と同様に、病原性の外来因子の存

^a でん粉の需給見通しについて (令和 6 年 9 月)

^b OECD, Data Indicators Alcohol consumption (閲覧日: 2024 年 12 月)

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

Trichoderma 属の *T. citrinoviride*、*T. harzianum* 及び *T. longibrachiatum*、並びに *T. reesei* の類縁株である *Hypocrea orientalis* は、日和見感染を起こしたとの報告があるが、これらの症例は免疫不全の患者に限られている。*T. reesei* では同様の症例の報告はないことから、*T. reesei* は健康なヒトへの影響はないと考えられる。

T. reesei はマイコトキシンは産生しないことが報告されている（参照 5）。

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

NGX 酵素をコードする *NGX* 遺伝子の供与体は *F. verticillioides* FCP906D 株である。

菌株の選択マーカーとして使用した *pyr2* 遺伝子の供与体は、野生型 *T. reesei* QM6a 株である。

NGX 株は *T. reesei* RL-P37 株の染色体上の複数の遺伝子を、欠失導入用コンストラクトを用いた相同組換えにより欠失させることによって作製された。

その際に、欠失導入用コンストラクト由来の *Ta_pyr2* 遺伝子 3' 側末端の配列、*attB* 配列及び制限酵素認識配列が染色体上に残存した。

Ta_pyr2 遺伝子 3' 側末端の配列の供与体は *T. atroviride* である。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

NGX 遺伝子は、*F. verticillioides* FCP906D 株由来のキシラナーゼ遺伝子を改変した遺伝子であり耐熱性が向上した NGX 酵素をコードする。

菌株の選択マーカーとして使用した *pyr2* 遺伝子は、野生型 *T. reesei* QM6a 株のオロテートホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする。同遺伝子を *NGX* 遺伝子発現カセットに連結して導入し、生産株の選択に用いた。

宿主のセロビオハイドロラーゼ 1 (*cbh1*) 遺伝子、セロビオハイドロラーゼ 2 (*cbh2*) 遺伝子、エンドグルカナーゼ 1 (*egl1*) 遺伝子、エンドグルカナーゼ 2 (*egl2*) 遺伝子を欠失させ、これを中間株 (*T. reesei* M1-1.1(*pyr4⁺*)株) とした。これらの遺伝子欠失は、すべて宿主 *T. reesei* RL-P37 株由来の欠失型遺伝子を導入して行ったため、*T. reesei* M1-1.1(*pyr4⁺*)株には外来の遺伝子配列を含んでいない。当該中間株に、*T. reesei* 由来グルコアミラーゼを一時的に導入するとともに、*pyr2* 遺伝子機能欠失突然変異株を得て、*mpg1* 遺伝子、*seb1* 遺伝子及び *endoT* 遺伝子を欠失させ、これを最終中間株 (LVS-ETD #43-1-3 株) とした。この最終中間株の *pyr2* 遺伝子は機能欠失型であるため、相補的に機能する *pyr2* 遺伝子を遺伝子改変株の選択マーカーとして使用することができる。

当該最終中間株 (LVS-ETD #43-1-3 株) の染色体に、*NGX* 遺伝子発現カセットに *T. reesei* 由来 *pyr2* 遺伝子を連結した *NGX* 遺伝子発現コンストラクト

を導入し、NGX 株を得た。

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：OPTIMASH（オプティマッシュ）または VISCAMYL（ビス
カミル）

有効成分：キシラナーゼ（NGX 酵素）

EC No.：EC 3.2.1.8

CAS No.：9025-57-4

(2) 製造方法

NGX 酵素は、NGX 株を生産菌として、従来のキシラナーゼと同様に、培養工程、ろ過等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過及び限外ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

NGX 酵素は、アラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であり、小麦からでん粉の糖化製品（異性化糖・水あめ等）及び発酵製品としての醸造アルコールの製造工程で使用される。NGX 酵素はでん粉の糖化製品を製造する工程では、穀物を粉砕し水を加えてスラリー化する工程で添加され、その後洗浄、ろ過、精製工程で除去される。糖化・発酵によって醸造アルコールを製造する工程では NGX 酵素は液化工程で失活し、蒸留によって気化せず醸造アルコールには移行しない。

(4) 推定摂取量

NGX 酵素の摂取量は、従来のキシラナーゼと異なる。NGX 酵素の糖化製品の製造及び醸造アルコールの製造において推奨される最大使用量は穀物原料 1 kg に対し 4.28 mg TOS である。これに対し、従来のキシラナーゼの使用量は、糖化製品の製造において穀物原料 1 kg に対し最大で 70 mg TOS、醸造アルコールの製造において穀物原料 1 kg に対し最大で 200 mg TOS である。

従来のキシラナーゼが全て NGX 酵素に置き換わり、全ての穀物のでん粉加工工程に使用され、最終商品である糖化製品中に 100%残存すると仮定した場合^aの推定一日摂取量は 0.157 mg TOS/人/日である。また、NGX 酵素が全ての醸造アルコールの製造工程に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^bの推定一日摂取量は 0.21 mg TOS/人/日である。したがって、推定される NGX 酵素の推定一日摂取量の合計値は 0.007 mg 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

NGX 酵素は、従来のキシラナーゼと同様にアラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解する酵素であるが、食品加工に使用時の耐熱性が向上している。

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

NGX 酵素と従来のキシラナーゼとの相違点は、生産菌、至適温度、アミノ酸残基数が異なることである。

(2) 遺伝子組換え体と宿主の相違点

NGX 株と宿主との相違点は、NGX 株には *NGX* 遺伝子が複数コピー導入され NGX 酵素生産能を獲得している点である。また、NGX 株では、内在性の *cbh1* 遺伝子、*cbh2* 遺伝子、*egl1* 遺伝子及び *egl2* 遺伝子を欠失しているためこれらの遺伝子がコードする繊維分解酵素の生産能が欠失している点並びにマンノース-1-リン酸グアニルトランスフェラーゼ及びストレス応答因子結合タンパク質をコードする *mpg1* 遺伝子及び *seb1* 遺伝子が欠失しているため培養液粘度が低減されキシラナーゼの生産性が向上している点が異なっている。

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

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として非相同組換えで導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

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

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

(2) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

(3) 遺伝子組換え体の選抜に関わる遺伝子に関する事項

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

(4) 伝達性に関する事項

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

(5) 宿主依存性に関する事項

宿主に対し、*NGX* 遺伝子発現コンストラクトを直鎖化・精製した DNA 断片として導入しており、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

NGX 遺伝子の供与体は、*F. verticillioides* FCP906D 株である。*NGX* 遺伝子は同株のキシラナーゼ遺伝子を改変した化学合成遺伝子である。*F. verticillioides* は、アメリカ合衆国保健福祉省 (U.S. Department of Health & Human Services) によって、Biosafety Level 2 に分類されている (参照 6)。

F. verticillioides は、フモニシン (タイプ FB1、FB2、FB3)、すなわちカビ毒 (マイコトキシン) を産生し、トウモロコシを汚染するため、飼料として摂取したブタの肺水腫等の毒性が報告されている (参照 7、8)。しかしながら、*NGX* 株には、*F. verticillioides* 野生株のキシラナーゼ遺伝子を改変した化学合成遺伝子のみを導入しており、さらに、*NGX* 株がフモニシンを産生していないことを分析試験で確認している。

このほかに、*pyr2* 遺伝子^cの供与体は、*Trichoderma atroviride* ATCC74058 株である。*pyr2* 遺伝子は *NGX* 株の培養液粘度を低減するための遺伝子の欠失操作等で使用されている。*T. atroviride* ATCC74058 株は、ATCC で Biosafety Level 1 に分類されている (参照 9)。日本でも微生物農薬として使用されており (参照 10)、その作用機構は、病原菌よりも早く増殖し、競合によって生息場所や栄養分を先取するものと考えられている (参照 11)。米国環境保護局 (EPA) は、*T. atroviride* を含む農薬製品について安全性評価結果を公表し、食品への残留制限の設定を免除している (参照 12、13)。

また、*T. atroviride* は ALLERGEN NOMENCLATURE データベース^dを用いた検索により、毒性またはアレルギー性の特段の懸念はないと考えられた。

その他の遺伝子欠失カセットにおいて使用された DNA 配列の供与体は、いずれも宿主 *T. reesei* RL-P37 株である。

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

^c ウリジン生合成に必要なオロテートホスホリボシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子で、遺伝子組換え菌株の選択マーカーとして利用される。*T. reesei* の *pyr2* 遺伝子とは配列が違うのでシーケンスによる識別が可能である。

^d ALLERGEN NOMENCLATURE (WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee によるデータベース) (検索日: 2024 年 12 月)

NGX遺伝子は、*F. verticillioides* FCP906D 株由来のキシラナーゼ遺伝子を改変した化学合成遺伝子である。

NGX遺伝子がコードする NGX 酵素は、アラビノキシラン内部の β -1,4-グリコシド結合をエンド型で加水分解するキシラナーゼであり、*F. verticillioides* FCP906D 株に由来する野生型キシラナーゼに比べて耐熱性が向上している。

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

NGX遺伝子のプロモーターは、宿主である *T. reesei* RL-P37 株に由来する *cbh1* 遺伝子のプロモーターである（参照 14）。

NGX 遺伝子発現コンストラクトを導入した生産菌株選択のために用いた *pyr2* 遺伝子は、そのプロモーターも含めて、宿主である *T. reesei* RL-P37 株に由来する（参照 14）。

(2) ターミネーターに関する事項

NGX遺伝子のターミネーターは、宿主である *T. reesei* RL-P37 株に由来する *cbh1* 遺伝子のターミネーターである。

生産菌株選択に用いた *pyr2* 遺伝子のターミネーターは、そのターミネーターも含めて、*T. reesei* RL-P37 株に由来する。

(3) そのほかの事項

NGX 遺伝子には *F. verticillioides* FCP906D 株に由来する野生型キシラナーゼ遺伝子の分泌シグナルペプチド配列をコードする塩基配列を含んでいる（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

NGX遺伝子は、野生株 *F. verticillioides* FCP906D 株のキシラナーゼ遺伝子（GenBank アクセス番号 JE998587.1）を改変した遺伝子であり、化学合成によって作製した。改変により NGX遺伝子産物には 8 つのアミノ酸残基が置換されている。

(2) ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

宿主へ導入した NGX 遺伝子発現コンストラクトは、直鎖化及び精製された DNA 断片であり、ベクター pTTT-pyr2-FevXyn4CL8-D3 から、PCR 増幅・精製して得た。pTTT-pyr2-FevXyn4CL8-D3 に含まれる NGX遺伝子発現コンストラクトは、主な構成要素として 5' 末端側から、*T. reesei* に由来する *pyr2* 遺伝子発現カセット、宿主 RL-P37 株に由来する *cbh1* 遺伝子のプロモーター、コザック配列、*F. verticillioides* FCP906D 株に由来する NGX 遺伝子、宿主

RL-P37 株に由来する *cbh1* ターミネーターの順に連結した配列である。

標的遺伝子座に導入した *pyr2* 遺伝子発現カセット及び *NGX* 遺伝子発現カセットからなる *NGX* 遺伝子発現コンストラクトの構成要素等の情報を表にまとめた。

表 標的遺伝子座に導入した *NGX* 遺伝子発現コンストラクトの主な構成要素

遺伝子発現カセット	構成要素	配列領域の由来と機能
<i>pyr2</i> 遺伝子発現カセット	<i>pyr2</i> 遺伝子	<i>T. reesei</i> QM6a 株に由来する <i>pyr2</i> 遺伝子と <i>T. reesei</i> QM6a 株の突然変異株である <i>T. reesei</i> RL-P37 株に由来する同遺伝子のプロモーター及びターミネーターを含んでおり、改変株選択マーカーとして機能
<i>NGX</i> 遺伝子発現カセット	プロモーター	<i>T. reesei</i> RL-P37 株に由来する <i>cbh1</i> 遺伝子のプロモーターであり、 <i>NGX</i> 遺伝子の転写を開始
	コザック配列	翻訳開始点の認識に関与
	<i>NGX</i> 遺伝子	野生株 <i>F. verticillioides</i> FCP906D 株に由来するキシラナーゼ遺伝子を改変して作製した <i>NGX</i> 酵素をコードする遺伝子。同野生株に由来するキシラナーゼ遺伝子のシグナルペプチド配列をコードする DNA 配列を含む
	ターミネーター	<i>T. reesei</i> RL-P37 株に由来する <i>cbh1</i> 遺伝子のターミネーターであり、 <i>NGX</i> 遺伝子の転写を終結

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

NGX 遺伝子発現カセットの塩基数及び塩基配列並びに制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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、ベクター pTTTpyr2-FveXyn4 CL8-D3 上の領域のうち、*NGX* 遺伝子発現カセットと改変型菌株を選択するために用いる *pyr2* 遺伝子発現カセットを含む *NGX* 遺伝子発現コンストラクトである (表)。

(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。

NGX 株を最終中間株から構築する際には、遺伝子導入用ベクターは用いらなかった。NGX 遺伝子発現コンストラクトは、これを含むベクター pTTT-pyr2-FevXyn4CL8-D3 から、PCR 増幅・精製して純化したものである。

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

NGX 株は、NGX 遺伝子発現カセットが導入され、また、複数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

NGX 株のゲノムに NGX 遺伝子発現コンストラクトが 3 コピー含まれていることを、次世代シーケンシングによる解析（平均冗長度 37 以上）により推定した。

(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

NGX 株の染色体上の NGX 遺伝子発現コンストラクト及びその境界領域の配列並びに欠失操作を行った *mpg1* 遺伝子座及び *seb1* 遺伝子座並びにそれぞれの境界領域の配列に関し、6 つの読み枠において生じた終止コドンから終止コドンで終結する 30 アミノ酸以上のオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）について、アレルゲン性^eとタンパク質の毒性^fについて評価した（参照 14）。

① NGX 遺伝子発現コンストラクトが組込まれた染色体上のそれぞれの領域及びその近傍領域

検出された 106 個の ORF について、転写・翻訳された場合のアミノ酸配列と既知のアレルゲンのアミノ酸配列について、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結果、2 個の ORF がコードするアミノ酸配列と連続する 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンが 3 件検出された。そのうち 2 件は、ハウスダストに含まれるコナヒョウダニ (*Dermatophagoides farinae*) の 2 種類のタンパク質との相同性であり、別の 1 件は、パンコムギ (*Triticum aestivum*) のグルテンサブユニット 1By9 との相同性であった。なお、いずれの ORF も、通常の読み枠の中で生成された停止コドン間の ORF であったことから、当該 ORF が転写され、NGX 酵素とは別に単独で発現される可能性は低いと考えられた。

^e Allergen Online（ネブラスカ大学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 22）（検索日：2024 年 1 月）

^f UniProtKB（タンパク質のアミノ酸配列に関する情報を網羅的に収集したデータベース）（release 2024）（検索日：2024 年 1 月）

また、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 14）。

さらに、検出された 106 個の ORF に関して、既知毒性タンパク質との相同性について、タンパク質データベース^fにおいて blastp アルゴリズムを用いて検索した。

E-value の閾値を 0.1 に設定して検索した結果、2 つの ORF が毒性タンパク質との相同性を示した（参照 14）。そのうち 1 つの ORF は 44 アミノ酸長で、相同性を示した毒蛇が産生する 192 アミノ酸長の VEGFA_VIPAA タンパク質との相同性は 19 アミノ酸長の領域に限られ、また高次構造の形成に必要なシステイン残基はなく毒性を示す可能性は低いと考えられた。

もう 1 つの ORF は、イモ貝の一種が産生する 90 アミノ酸長の Conotoxin Vc22.1 と相同性を示し、Conotoxin Vc22.1 の毒性を示すのに必要とされる高次構造に必要な複数のシステイン残基のうち一つしか保存されていないことから、毒性を示す可能性は低いと考えられた。

② 欠失操作を行った *mpg1* 遺伝子座及び *seb1* 遺伝子座並びにそれぞれの近傍領域

mpg1 遺伝子の欠失操作及び *seb1* 遺伝子の欠失操作によって生じた遺伝子座並びにそれぞれの近傍領域について、連続する 30 アミノ酸以上の新たな ORF を検索し評価した。連続する 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンが、*mpg1* 遺伝子座で検出された 1 つの ORF について 4 件、*seb1* 遺伝子座で検出された 1 つの ORF について 1 件検出された（参照 14）。このうち *mpg1* 遺伝子座で検出された ORF との相同性が検出されたアレルゲンは、真菌由来のタンパク質やニワトリ (*Gallus gallus*) のビテロジェニンであり、*seb1* 遺伝子座で検出された ORF と相同性が検出されたアレルゲンは、ALLERGEN NOMENCLATURE データベース^dに収載されているオレオシン（ヘーゼルナッツ由来の小児の食物アレルゲン）であった。ただし、これら ORF は停止コドン間で生成された ORF であり、適切に翻訳を行うための開始コドンが存在しないことから、転写される可能性は低いと考えられた。

また、連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンとして、欠失した *seb1* 遺伝子座についてのみ、2 つの ORF が 2 つのタイセイヨウサケ由来のアレルゲンと相同性を示した。しかしながら、これら 2 つの ORF とこれらアレルゲンについては、連続する 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示しておらず、ADFS データベースによるエピトープ検索においても、連続する 8 アミノ酸配列について既存のエピトープとの一致がみられなかったことから、アレルゲン性を予測させる結果ではなかった。

さらに、上記 ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を調べた^f。

E-value の閾値を 0.1 に設定して検索した結果、欠失後の *mpg1* 遺伝子座で検出された ORF に関するヒットはなかった。欠失後の *seb1* 遺伝子座で検

出された 1 つの ORF は、*Agelena orientalis* (ジョウゴ蜘蛛) の毒性タンパク質 Mu-agatoxin-Ao1a との相同性が検出されたが、その成熟タンパク質 36 アミノ酸長のうち 19 アミノ酸長でのみ相同性であり、また、Mu-agatoxin-Ao1a の高次構造形成に関与する配列は含まれていないことから、Mu-agatoxin-Ao1a の毒性に関する懸念は生じないと考えられる(参照 14)。

以上のことから、NGX 酵素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

NGX 株を構築する過程で用いた DNA 断片を作製する過程で使用したベクターには、アンピシリン耐性遺伝子及びカナマイシン耐性遺伝子が含まれている。しかしながら、これらの抗生物質耐性遺伝子は、改変する菌株に導入する DNA 断片に含まれていないので、NGX 株には導入されていない。

このため、NGX 酵素を用いて製造した食品を介したヒトへの抗生物質耐性の伝播の懸念はないと考えられる。

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。

NGX 遺伝子供与体である *F. verticillioides* のアレルギー誘発性については「第 2-3. 挿入 DNA の供与体に関する事項」で示したとおり特段の懸念はないと考えられる。

また、*F. verticillioides* についてデータベース^dを検索した結果、Food allergen として検出されたアレルゲンはなかった。

中間株作製の過程で遺伝子欠失カセットの一部として利用した *pyr2* 遺伝子の供与体である *T. atroviride* について、データベース^dを検索したところ、検出されたアレルゲンはなかった。尚、*T. atroviride* 由来の *pyr2* 遺伝子は NGX 株の染色体には、その一部のみが残留しているため安全上の懸念はないと考えられる。

- (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。

NGX 酵素を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。また、xylanase をキーワードとして、データベース^dの By Allergen Name サーチで検索した結果、All allergen でヒットがなかった。

(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 人工胃液に対する感受性

NGX 酵素を人工胃液に加え、消化処理を行った後、SDS-PAGE（タンパク質染色）法で分析した結果、NGX 酵素の断片と考えられるバンドが 0.5 分以内に出現し、30 分後まで観察された。さらに、ウエスタンブロット法で分析した結果、NGX 酵素全長タンパク質のバンドは 0.5 分後に概ね消失することが示された。

② 人工腸液に対する感受性

NGX 酵素を人工腸液に加え、消化処理を行った後、ウエスタンブロット法で分析した結果、NGX 酵素全長タンパク質のバンドは 360 分後でも完全には分解されなかった（参照 15）。

③ 加熱処理に対する感受性

NGX 酵素を pH 5 の緩衝液中において各温度で 30 分間処理した後、酵素活性を測定した。その結果、約 80℃で 30 分間の加熱後に部分的な活性が残存していた。

(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関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

NGX 酵素とアレルゲン等との構造相同性の有無を確認するため、アレルゲンデータベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示すアレルゲン等及び連続する 8 アミノ酸配列が一致するアレルゲン等は検出されなかった（参照 14）。

以上のことから、NGX 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。

NGX 酵素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。

NGX 酵素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

NGX 酵素は、フランス、デンマーク及びオーストラリア・ニュージーランドにおいて承認等されている。

2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項

NGX 酵素製造用原体について、培養法により生産菌が検出されないことを確認した（参照 16）。また、NGX 酵素製造用原体中に生産菌に由来する DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した（参照 17）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

NGX 酵素は、JECFA の食品用酵素剤の一般規格及び Food Chemicals Codex の酵素製剤の一般規格の要求事項を満たしている。また、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（キシラナーゼ活性測定法第 2 法を使用、参照 18）。

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限りにおいては、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

NGX 酵素は、生産菌の培養液から除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て製造されるものであり、適切な製造管理の下で製造が行われる限りにおいては、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

NGX 酵素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限りにおいては、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

「NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼ」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、「NGX 株を利用して生産されたキシラナーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. ATCC, "Trichoderma reesei QM 6a (ATCC 13631) Product Sheet".
2. G. Sheir-Neiss and B. S. Montenecourt, "Characterization of the secreted cellulases of Trichoderma reesei wild type and mutants during controlled fermentations," Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 20, pp. 46-53, 1984.
3. 国立感染症研究所, “病原体等安全管理規定 別冊 1「病原体等の BSL 分類等」(抜粋版),” 2017.
4. Environmental Protection Agency (EPA), "Federal Register Vol. 77, No. 172," USA, 2012.
5. Frisvad, "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, 第 巻 102, pp. 9481-9515, 2018.
6. ATCC, “Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg,” ATCC Product Description, 2021.
7. 農林水産省, “いろいろなカビ毒,” 食品のカビ毒に関する情報(ウェブサイト), 2019.
8. 齊藤初雄, “フザリウム毒素(フザリウムトキシン),” 農業生物資源研究所: 微生物遺伝資源利用マニュアル (25), 2009.
9. ATCC, “Trichoderma atroviride Karsten sensu Bissett 74058,” 2022.
10. 吉田重信, “植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望,” 化学と生物, 第 巻 51, 第 8, pp. 541-547, 2013.
11. 静岡県農業水産部, “イネ種子伝染性病害に効果のある微生物農薬(エコホープ)の使用法,” 新しい農業技術, 第 巻 432, 2005.
12. 食品安全委員会, “米国環境保護庁(EPA)、新規微生物活性成分(T. atroviride SC1)を含む製品の登録についての提案を公表,” 食品安全総合情報システム, 第 syu05420080108, 2020.
13. US EPA, “40 FCR Part 180 Trichoderma atroviride Strain SC1: Exemption From the Requirement of a Tolerance,” Federal Register, 第 巻 85, 第 148, pp. 46002-46004, 2020.
14. Danisco, NGX ORF 解析報告書, 2024. (社内文書)
15. NGX: In vitro Pepsin Resistance and Pancreatin Resistance, 2022. (社内文書)
16. NGX Xylanase Certificate of Analysis, 2022. (社内文書)
17. NGX rDNA Report, 2017. (社内文書)

18. 日本食品分析センター, “分析試験成績書,” 2023.