

(案)

## 遺伝子組換え食品等評価書

*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株  
を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ

令和8年（2026年）1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
(申請内容) .....	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 .....	6
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 .....	8
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 .....	9
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 .....	9
6. ベクターへの挿入DNAの組込方法等に関する事項 .....	10
7. 構築されたコンストラクトに関する事項 .....	10
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 .....	11
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 .....	12
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。） .....	12
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 .....	14
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。 .....	14
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。 .....	14

第5. 遺伝子組換え添加物に関する事項	14
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	14
2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項	14
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	14
4. 精製方法及びその効果に関する事項	14
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	14
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	14
III. 食品健康影響評価結果	15
<参照>	16

### <審議の経緯>

2024年8月13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167号）、関係書類の接受

2024年8月20日 第951回食品安全委員会（要請事項説明）

2024年9月30日 第255回遺伝子組換え食品等専門調査会

2025年12月24日 第272回遺伝子組換え食品等専門調査会

2026年1月27日 第1011回食品安全委員会（報告）

### <食品安全委員会委員名簿>

2026年1月6日まで	2026年1月7日から
山本 茂貴（委員長）	祖父江 友孝（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）
祖父江 友孝（委員長代理 第二順位）	頭金 正博（委員長代理 第二順位）
頭金 正博（委員長代理 第三順位）	春日 文子（委員長代理 第三順位）
小島 登貴子	小島 登貴子
杉山 久仁子	杉山 久仁子
松永 和紀	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>

2025年9月30日まで	2025年10月1日から		
児玉 浩明（座長）	児玉 浩明（座長）		
佐々木 伸大（座長代理）	佐々木 伸大（座長代理）		
伊藤 政博	手島 玲子	伊藤 政博	中島 春紫
小野 道之	樋口 恭子	小野 竜一	中村 亮介
小野 竜一	藤原 すみれ	古園 さおり	藤原 すみれ
柴田 識人	百瀬 愛佳	柴田 識人	百瀬 愛佳
爲廣 紀正		爲廣 紀正	

## 要 約

「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Bacillus subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus stellifer* に由来する  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子等を導入して作製した *B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼである。本添加物は、高濃度のグルコース存在下においては加水分解反応の逆反応である縮合反応を触媒する特性を有する酵素であり、グルコース溶液から  $\beta$ -グルコオリゴ糖を製造する目的で用いられる。

「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、導入遺伝子から產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、「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ」は、人の健康を損なうおそれないと判断した。

## I. 評価対象添加物の概要

(申請内容)

名 称：*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ

用 途： $\beta$ -グルコオリゴ糖の製造

申請者：日本食品化工株式会社

開発者：日本食品化工株式会社

本添加物は、*Bacillus subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus stellifer* に由来する  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子等を導入して作製した *B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼである。本添加物は、高濃度のグルコース存在下においては加水分解反応の逆反応である縮合反応を触媒する特性を有する酵素であり、グルコース溶液から  $\beta$ -グルコオリゴ糖を製造する目的で用いられる。

## 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、生産菌及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称： $\beta$ -グルコシダーゼ

生 産 菌：*Aspergillus niger*

有効成分： $\beta$ -グルコシダーゼ

EC No. : EC 3.2.1.21

CAS No. : 9001-22-3

##### (2) 製造方法

$\beta$ -グルコシダーゼは *Aspergillus niger* を生産菌として用い、培養等の工程を経て製造される。

##### (3) 用途及び使用形態

$\beta$ -グルコシダーゼは、糖類の  $\beta$ -D-グルコシド結合の加水分解反応を触媒する酵素であるが、高濃度のグルコース存在下においては加水分解反応の逆反応である縮合反応を触媒する。本特性を利用し、 $\beta$ -グルコシダーゼはグルコース溶液に作用させて  $\beta$ -グルコオリゴ糖を製造することに用いられる。 $\beta$ -グルコオリゴ糖の製造に用いられた  $\beta$ -グルコシダーゼは、精製工程において除去される。

#### (4) 摂取量

従来の $\beta$ -グルコシダーゼが全ての糖化品を添加し得る食品群の製造に使用され、最終製品中に全量残存すると仮定した場合（参照 1）、 $\beta$ -グルコシダーゼの一日最大摂取量は 0.41 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、*B. subtilis* ISW1214 株である。

#### (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

*B. subtilis* は、食品製造用酵素の生産菌として数多くの利用経験があり、長期にわたり食品製造に安全に使用されている（参照 2）

#### (3) 宿主の構成成分等に関する事項

*B. subtilis* は、非毒素產生性微生物とみなされており、有害生理活性物質の生産に関する報告はない（参照 2）。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ーレベル（以下「BSL」という。）1 に該当する（参照 3）。また、*B. subtilis* ISW1214 株について、アレルギー誘発性があることは報告されていない<sup>a</sup>。

#### (4) 寄生性及び定着性に関する事項

*B. subtilis* ISW1214 株に寄生性や定着性は報告されていない<sup>b</sup>。

#### (5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

*B. subtilis* ISW1214 株は、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない（参照 4、5）。

#### (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

*B. subtilis* の近縁種である *Bacillus cereus* 及び *Bacillus anthracis* は、毒性物質を生産することが知られているが、*B. subtilis* とは明確に区別されている（参照 6）。*B. subtilis* の近縁株である *Bacillus licheniformis* や *Bacillus pumilus* は、非病原性及び非毒素產生性とされている。

### 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

$\beta$ -グルコシダーゼ（PsBGL）をコードする *psbgl* 遺伝子の供与体は

<sup>a</sup> PubMed、検索キーワード：*Bacillus subtilis* ISW1214 + allergen（検索日：2025年8月）

<sup>b</sup> PubMed、検索キーワード：①*Bacillus subtilis* ISW1214 + colonization、②*Bacillus subtilis* ISW1214 + parasitic（検索日：2023年2月）

*Paenibacillus stellifer*、トリプトファニル tRNA 合成酵素をコードする *trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株である。また、プロモーター配列及びシグナル配列の供与体は *Bacillus* sp. JAMB750 株、ターミネーター配列の供与体は *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株である。

## (2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

*psbgl* 遺伝子は、 $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) をコードする。

菌株の選択マーカーとして使用した *trpS* 遺伝子はトリプトファニル tRNA 合成酵素をコードする。宿主ゲノムの *trpS* 遺伝子を欠失させた後に同遺伝子を *psbgl* 遺伝子発現カセットに連結して遺伝子導入用プラスミドとして導入し、生産株の選択に用いた。

宿主の *trpS* 遺伝子を欠失させ、これを中間株 (*B. subtilis* TKC01 株) とした。次に *spoIIAC* 遺伝子を欠失させ、最終中間株 (*B. subtilis* NTI06 (pDATSK) 株)を得た。

当該最終中間株 *B. subtilis* NTI06 (pDATSK) 株に  $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) 発現プラスミドである pHYT2PsBG を導入し、かつ、pDATSK を脱落させることにより、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 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 : T2-PsBGL

有効成分 :  $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL)

EC No. : EC 3.2.1.21

CAS No. : 9001-22-3

### (2) 製造方法

T2-PsBGL は、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を生産菌として用い、培養後に複数の工程を経て製造される。生産菌は、精製工程において分離、除去される。

### (3) 用途及び使用形態

T2-PsBGL は従来の添加物と同様に、グルコース縮合反応を触媒する酵素として、 $\beta$ -グルコオリゴ糖含有糖化品の製造に使用される。

当該酵素を用いた食品の製造工程では、酵素タンパク質は精製工程において除去され、最終食品には活性を有する酵素は残存しない。

### (4) 推定摂取量

T2-PsBGL が全ての糖化品を添加し得る食品群の製造に使用され、最終製品中に全量残存すると仮定した場合、最大一日摂取量は 0.44 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

T2-PsBGL の有効成分である  $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) は、従来の添加物と同様に  $\beta$ -グルコオリゴ糖含有糖化品の製造に食品用加工助剤として用いられる酵素であるが、 $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) はより基質特異性が高い。

### 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

T2-PsBGL と従来の添加物の相違点は、有効成分である  $\beta$ -グルコシダーゼの生産菌、至適温度、至適 pH 及び基質特異性である。

#### (2) 組換え体と宿主の相違点

*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株と宿主との相違点は、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株は  $\beta$ -グルコシダーゼ産生能及びテトラサイクリン耐性を有している点である。

さらに、NTI06 (pHYT2PsBG) 株では、内在性の芽胞形成関連遺伝子 (*spoIIAC*) 遺伝子を欠失しているため芽胞形成能が欠失している点及び内在性のトリプトファニル tRNA 合成酵素 (*trpS*) 遺伝子を欠失しているため遺伝子導入用プラスミドの *trpS* により補完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

発現プラスミド pHYT2PsBG の作製には *Escherichia coli* 由来のプラスミド pACYC177 と *Enterococcus faecalis* (旧名 *Streptococcus faecalis*) 由来のプラスミド pAMα1 から構築されたプラスミド pHY300PLK が用いられた(参照 5)。

#### 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 pHY300PLK 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 5)。

##### (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 pHY300PLK 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 (参照 5)。

#### (3) 遺伝子組換え体の選抜に関する事項

プラスミド pHY300PLK にはテトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が含まれている（参照 5）。*B. subtilis* 中ではアンピシリン耐性遺伝子は発現しないとされている（参照 5、7、8）。

#### (4) 伝達性に関する事項

プラスミド pHY300PLK には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない（参照 5）。

#### (5) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pHY300PLK の複製開始配列は、*Bacillus* 属、*Escherichia* 属及び *Streptococcus* 属で機能することが知られている（参照 5）。なお、プラスミド pHY300PLK は *B. subtilis* 中において 50 コピー程度存在する（参照 9）。

### 3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

*psbgl* 遺伝子の供与体は *Paenibacillus stellifer*、*trpS* 遺伝子の供与体は *B. subtilis* ISW1214 株である。また、プロモーター配列及びシグナル配列の供与体は *Bacillus* sp. JAMB750 株、ターミネーター配列の供与体は *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株である。*P. stellifer*、*B. subtilis* ISW1214 株、*Bacillus* sp. JAMB750 株及び *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株は、病原性や毒素産生能などのヒトに対する有害性は知られていない。また、これらは国立感染症研究所病原体等安全管理規程により BSL1 に該当する（参照 3）。

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

*psbgl* 遺伝子がコードする β-グルコシダーゼ (PsBGL) は、β-D-グルコシド結合の加水分解反応及び高濃度のグルコース存在下における縮合反応を触媒する酵素である。

*trpS* 遺伝子がコードするトリプトファニル tRNA 合成酵素は、組換え体 *B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株の内在性のトリプトファニル tRNA 合成酵素遺伝子欠損を補完する。

### 5. 導入遺伝子及び遺伝子組換え体の選抜に関する遺伝子の発現に関する領域に関する事項

#### (1) プロモーターに関する事項

*psbgl* 遺伝子のプロモーターは *Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺

① PubMed、検索キーワード：①各菌種名又は菌株名 + pathogen、②各菌種名又は菌株名 + toxic (検索日：2023 年 3 月)

伝子の上流領域を一部改変したものである。*trpS* のプロモーター配列は *B. subtilis* の *trpS* の上流領域である。

(2) ターミネーターに関する事項

*psbgl* 遺伝子のターミネーターは *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株の  $\alpha$ -アガラーゼ遺伝子の下流領域である。*trpS* のターミネーター配列は *B. subtilis* の *trpS* の下流領域である。

(3) そのほかの事項

本酵素を菌体外に分泌させるため、*Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナーゼのシグナル配列をコードする DNA 配列に変異を導入して *psbgl* 遺伝子の上流に付加した。

## 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

*psbgl* 遺伝子は、*P. stellifer* の  $\beta$ -グルコシダーゼ遺伝子の塩基配列を宿主である *B. subtilis* 用にコドンを最適化し、人工合成した。

*trpS* 遺伝子は、*B. subtilis* ISW1214 株の *trpS* 遺伝子を PCR 法によりクローニングした後、発現の最適化を目的として塩基変異を導入した。

プロモーター配列及びシグナル配列をコードする DNA 配列は、*Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナーゼ遺伝子の上流領域を一部改変したものである。

ターミネーター配列は、*Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株の  $\alpha$ -アガラーゼ遺伝子の下流に存在する領域である。

(2) ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

シクロデキストリングルカノトランスフェラーゼの発現プラスミド pHYT2G のシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ遺伝子及びシグナル配列をコードする DNA 配列を *psbgl* 遺伝子及び上記シグナル配列をコードする DNA 配列に置換することによって、発現プラスミド pHYT2PsBG が作製された（参照 10）。

## 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

発現プラスミド pHYT2PsBG 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、発現プラスミド pHYT2PsBG の全塩基配列である。

(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。

発現プラスミド pHYT2PsBG は目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

### 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

*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株と宿主の相違点は、 $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) 產生能及びテトラサイクリン耐性を獲得している点である。

#### 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

発現プラスミド pHYT2PsBG をプロトプラスト法により中間株に導入後、テトラサイクリン耐性及びカナマイシン感受性を示す形質転換体を選抜することによって *B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を得た（参照 11）。発現プラスミド pHYT2PsBG は生産株においてはプラスミドの状態で保持される。

##### (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

*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株では発現プラスミド pHYT2PsBG が宿主のゲノムに挿入されずに保持される。発現プラスミド pHYT2PsBG の全塩基配列について、6 つの読み枠においてオープンリーディングフレーム（以下「ORF」という。）検索を行った結果、終止コドンと終止コドンに挟まれた連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 135 個見いだされた。これらの ORF のうち、挿入 DNA 領域を含む ORF は 65 個、ベクターバックボーンの ORF は 70 個であった。

挿入 DNA 領域を含む ORF についてタンパク質データベース<sup>d</sup>を用いて blastp による相同性検索を行った結果、25 個の ORF に相同性が認められたが、既知の毒性タンパク質との相同性は見られなかった。また、既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース<sup>e</sup>を用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸配列で 35% 以上の相同性を示す ORF は見いだされなかった。

連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列の検索において、*B. licheniformis* 由来の既知アレルゲンであるサブチリシンと一致する ORF が検出された。当該 ORF はサブチリシンのエピトープとして登録されたアミノ酸配列との重複は認められなかった。また、当該既知アレルゲンは吸入性アレルゲンであり、食物性アレルゲンではない。

ベクターバックボーンの 70 個の ORF がコードするタンパク質については、

<sup>d</sup> NCBI Non-redundant protein sequences (nr) (検索：2022 年 7 月)

<sup>e</sup> AllergenOnline version 21 (検索：2022 年 7 月)

pHYT2PsBG の由来となるプラスミドである pHY300PLK プラスミドが相補配列を含めて有害性の報告がないことから、当該 ORF が有害タンパク質を産出する可能性は低いと推察される。

以上から、発現プラスミド pHYT2PsBG から目的以外のタンパク質が組換え体内で発現してアレルギー誘発性又は毒性を示す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する遺伝子の安全性に関する事項

発現プラスミド pHYT2PsBG 上にアンピシリン耐性遺伝子及びテトラサイクリン耐性遺伝子が存在する。アンピシリン耐性遺伝子は *B. subtilis* において発現しないとされる（参照 5、7、8）。テトラサイクリン耐性遺伝子がコードする膜タンパク質は、細胞内からテトラサイクリンを排出することで耐性を付与する。これらの 2 つの遺伝子産物の有害性に関する報告はない<sup>f</sup>。

なお、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を用いて T2-PsBGL を製造する際には、液体培地に抗生物質を添加しないこととされている（参照 12）。

T2-PsBGL 中のテトラサイクリン耐性遺伝子産物の含有量を ELISA 法で測定した結果、0.05 μg/mL 未満であった（参照 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す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す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。

*psbgl* 遺伝子の供与体である *P. stellifer* がアレルギー誘発性を示すという報告はない<sup>g</sup>。

*trpS* 遺伝子の供与体である *B. subtilis* ISW1214 株がアレルギー誘発性を示すという報告はない<sup>a</sup>。

(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。

*P. stellifer* 及びその他微生物に由来する β-グルコシダーゼに関して、アレルギー誘発性を示すという報告はない<sup>h</sup>。

トリプトファンアミル tRNA 合成酵素に関して、アレルギー誘発性を示すという

<sup>f</sup> PubMed、検索キーワード：①各遺伝子産物名（β-lactamase、tetracycline efflux protein、tetL、chloramphenicol acetyltransferase）+ harmful、②各遺伝子産物名 + toxic（検索日：2023 年 2 月）

<sup>g</sup> PubMed、検索キーワード：Bacillus subtilis ISW1214 + allergen（検索日：2023 年 3 月）

<sup>h</sup> PubMed、検索キーワード：β-glucosidase + allergen（検索日：2023 年 3 月）

報告はない<sup>i</sup>。

(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  $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL)

a. 人工胃液に対する感受性

$\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) の人工胃液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンプロット分析を行った。その結果、SDS-PAGE 分析では試験開始 5 秒後までに、ウェスタンプロット分析では試験開始 15 秒後までに消化されることが確認された(参照 14)。

b. 人工腸液に対する感受性

$\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) の人工腸液中における消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンプロット分析を行った結果、両試験において試験開始後 6 時間を経過しても消化されなかった(参照 14)。

c. 加熱処理に対する感受性

$\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) の加熱による  $\beta$ -グルコシダーゼ活性への影響を分析した結果、糖化品の製造工程の条件である pH 4.0 及び 6.0、80°Cで 1 時間の加熱処理により  $\beta$ -グルコシダーゼ活性は失われた(参照 15)。

② トリプトファニル tRNA 合成酵素

*trpS* 遺伝子が产生するトリプトファニル tRNA 合成酵素は、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トリプトファニル tRNA 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関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

$\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) と既知のアレルゲンとの相同性の有無を確認するために、アレルゲンデータベース<sup>j</sup>を用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸配列で 35%以上の相同性を示す既知アレルゲンは見いだされなかつた。連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲンと一致する配列は見いだされなかつた(参照 16)。

<sup>i</sup> PubMed、検索キーワード : tryptophanyl-tRNA synthetase + allergen (検索日 : 2025 年 8 月)

<sup>j</sup> AllergenOnline version 21 (検索日 : 2022 年 7 月)

以上のことから、 $\beta$ -グルコシダーゼ (PsBGL) 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。**

T2-PsBGL 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。**

T2-PsBGL 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**

T2-PsBGL は、諸外国での販売及び使用実績はない。

##### **2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項**

T2-PsBGL に生産菌の残存がないことを培養法により確認している(参照 11)。

##### **3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項**

発酵培地原料は従来の食品用酵素の製造に用いられてきた原料である。また、宿主である *B. subtilis* ISW1214 株が有害生理活性物質を生産するという報告はない。したがって、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、製造に由来する非有効成分の安全性に問題はないと考えられる。

##### **4. 精製方法及びその効果に関する事項**

T2-PsBGL は、生産菌の培養物から、複数の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**

T2-PsBGL 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

「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ」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、導入遺伝子から產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つた。

以上のことから、「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

## <参照>

1. 令和元年国民健康・栄養調査報告（厚生労働省 令和 2 年 12 月）
2. Anne Sietske de Boer A. S., Diderichsen B., On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36 (1991) 1-4
3. 国立感染症研究所「病原体等安全管理規程」
4. Ikawa S., Shibata T., Matsumoto K., Iijima T., Saito H., Ando T., Chromosomal loci of genes controlling site-specific restriction endonucleases of *Bacillus subtilis*, *Mol Gen Genet.* 183 (1981) 1-6
5. Ishiwa H., Shibahara-Sone H., New shuttle vectors for *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. IV. The nucleotide sequence of pHY300PLK and some properties in relation to transformation, *Jpn J Genet.* 61 (1986) 515-528
6. FINAL DECISION DOCUMENT: TSCA SECTION 5(H)(4) EXEMPTION FOR BACILLUS SUBTILIS (This final decision document describes the basis for EPA's decision to include *Bacillus subtilis* as a recipient microorganism at § 725.420.)
7. McKenzie T., Hoshino T., Tanaka T., Sueoka N., The nucleotide sequence of pUB110: Some salient features in relation to replication and its regulation, *Plasmid.* 15 (1986) 93-103
8. Chopra I., Roberts M., Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) 232-260
9. Morimoto T., Kadoya R., Endo K., Tohata M., Sawada K., Liu S., Ozawa T., Kodama T., Kakeshita H., Kageyama Y., Manabe K., Kanaya S., Ara K., Ozaki K., Ogasawara N., Enhanced Recombinant Protein Productivity by Genome Reduction in *Bacillus subtilis*, *DNA Research*, 15 (2008) 73-81
10. 日食研究報告書 (2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書 (発現用プラスミドのシーケンス解析及びオープンリーディングフレーム検索) (社内文書)
11. 日食研究報告書 (2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書 (*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株の作製) (社内文書)
12. 日食研究報告書 (2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書 (T2-PsBGL の調製) (社内文書)
13. 日食研究報告書 (2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して

生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書（酵素製剤中の抗生物質耐性遺伝子産物の含有量）（社内文書）

14. 日食研究報告書（2023）Bacillus subtilis NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書（人工胃液及び人工腸液による消化性）（社内文書）
15. 日食研究報告書（2023）Bacillus subtilis NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書（加熱処理による  $\beta$ -グルコシダーゼの活性への影響）（社内文書）
16. 日食研究報告書（2023）Bacillus subtilis NTI06 (pHYT2PsBG) 株を利用して生産された  $\beta$ -グルコシダーゼの安全性評価に係る報告書（ $\beta$ -グルコシダーゼのアレルギー誘発性に関する調査）（社内文書）