

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

LDN487 株を利用して生産された
プルナーゼ

令和7年（2025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
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	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	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	10
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	13
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	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	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。	16
第 5. 遺伝子組換え添加物に関する事項	16

1. 諸外国における認可、食用等に関する事項	16
2. 遺伝子組換え体の残存に関する事項	16
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	17
<参照>	18

＜審議の経緯＞

2024 年 10 月 8 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 272 号）、関係書類の接受

2024 年 10 月 15 日 第 957 回食品安全委員会（要請事項説明）

2024 年 10 月 25 日 第 257 回遺伝子組換え食品等専門調査会

2025 年 1 月 28 日 第 970 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 257 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

「LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* BRA7 株を宿主として、*Bacillus deramificans* T89.117D 株に由来する改変プルラナーゼ遺伝子を導入して作製した *B. licheniformis* LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼである。本添加物は、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及び異性化糖の製造工程で添加され、他の酵素と併用することで高い効率で単糖及び二糖類を生成すること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、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、「LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼ」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：LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼ

用 途：ビール及び異性化糖製造時の糖化効率の向上

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、*Bacillus licheniformis* BRA7 株を宿主として、*Bacillus deramificans* T89.117D 株に由来する改変プルラナーゼ遺伝子を導入することにより作製された *B. licheniformis* LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼである。本添加物は、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及び異性化糖の製造工程で添加され、他の酵素と併用することで高い効率で単糖及び二糖類を生成することを目的として使用される。

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：プルラナーゼ (PULm104 製品^a)

生 産 菌：*B. licheniformis* BML780PULm104 株

有効成分：プルラナーゼ (PULm104)

EC No. : EC 3.2.1.41

CAS No. : 9075-68-7

(2) 製造方法

PULm104 製品は、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

PULm104 製品は、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及び異性化糖の製造工程で添加され、他の酵素と併用することで高い効率で単糖及び二糖類を生成することができる。当該酵素を用いた食品の製造工程では、通常、酵素タンパク質は不活化又は除去されるため、最終食品には活性を有する酵素は残存しない。

^a BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼ (令和元年 7 月 2 日食品安全委員会において了承)

(4) 摂取量

PULm104 製品が全てのビール製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^bの推定一日摂取量は 1.14 mg TOS (Total Organic Solids) /人/日である。また、PULm104 製品が全ての異性化糖製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^cの推定一日摂取量は 0.408 mg TOS /人/日である。したがって、推定される PULm104 製品の推定一日摂取量の合計値は 0.028 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. licheniformis* BRA7 株である。*B. licheniformis* は、広く自然界に分布しており、土壌に多く見られ、乾燥食品、香辛料、豆類、コンポスト等にも存在している。

(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

B. licheniformis は、1972 年以降、食品用酵素の生産菌として安全に使用されている（参照 1）。

B. licheniformis BRA7 株は、PULm104 製品及び SPEZYME FRED™（有効成分：α-アミラーゼ）^dの他 5 つの添加物の生産菌株の宿主として用いられている。

(3) 宿主の構成成分等に関する事項

B. licheniformis は、病原性及び有害生理活性物質を生産するという報告はなく、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 に分類されていない（参照 2）。また、*B. licheniformis* は、日本細菌学会による分類において、BSL2 及び 3 に分類されていない（参照 3）。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis 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）。

^b 令和元年 国民健康・栄養調査報告（令和 2 年 12 月、厚生労働省）（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）におけるビールの平均値を用いた。

^c 令和 3 砂糖年度における砂糖及び異性化糖の需給見通し（令和 4 年 3 月、農林水産省））における令和 2 砂糖年度（当該年の 10 月 1 日から翌年の 9 月 30 日までの期間）の異性化糖の消費量及び総務省統計局「人口推計（2022 年 5 月報）」における令和 3 年 9 月時点の人口を用い、異性化糖の推定一日摂取量を算出した。

^d SPEZYME FRED™（平成 19 年 3 月 29 日食品安全委員会において了承）

(5) ヒトの健康に影響を及ぼす外来因子に関する事項

B. licheniformis BRA7 株には、病原性の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

Bacillus 属では、*B. anthracis* と *B. cereus* の 2 種が哺乳動物の病原体として知られているが、米国 EPA は、それらと *B. licheniformis* とは明確に区別されらしている（参照 5）。このことは、16S rRNA 遺伝子の配列に基づいた系統発生的な分類上、*B. licheniformis* とこれら 2 種との距離が離れていることから確認できる（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

PULm104 遺伝子の供与体は *Bacillus deramificans* T89.117D 株である（参照 7）。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

PULm104 遺伝子は、*B. deramificans* T89.117D 株由来の全長型プルラナーゼの N 末端側 104 アミノ酸領域を欠失したプルラナーゼをコードする。なお、このアミノ酸領域の欠失がプルラナーゼの触媒サイトに影響を及ぼさず、プルラナーゼ活性を示すことを確認している（参照 8）。

宿主の α -アミラーゼ (*amyL*) 遺伝子、クロラムフェニコール耐性 (*catH*) 遺伝子、孢子形成 (*spoIIAC*) 遺伝子、アルカリ性プロテアーゼ (*aprL*) 遺伝子、グルタミン酸特異的プロテアーゼ (*mpr*) 遺伝子、リジン生合成酵素 (*lysA*) 遺伝子及びセリン生合成酵素 (*serA*) 遺伝子を欠失させ、これを中間株とした。

当該中間株に、菌株コンピテント細胞化ベクターを一時的に導入し、リジン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセット及びセリン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセット（以下「*PULm104* 遺伝子発現カセット」という。）を直鎖化・精製した DNA 断片として直接導入することで、*PULm104* 遺伝子発現カセットを相同組換えにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に導入した。

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：OptimaxL-2500 R、DIAZYME 等（以下「487-TPU 製品」という。）

有効成分：プルラナーゼ（以下「487-TPU」という。）

EC No.：EC 3.2.1.41

CAS No.：9075-68-7

(2) 製造方法

487-TPU 製品は、LDN487 株を生産菌として、従来のプルラナーゼと同様に、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

487-TPU 製品は、アミロペクチンなどの α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素であり、ビール及び異性化糖の製造において、他の酵素とともに用いる用途が想定されている。ビール製造工程では、糖化工程又は発酵工程に 487-TPU 製品を添加することによって酵母が資化できる糖を高い効率で生成できる。同様に、異性化糖製造工程においても、487-TPU 製品を添加することによって高い効率で単糖及び二糖類を生成できる。487-TPU 製品は糖化工程で使用された場合には煮沸工程で失活し、発酵工程で使用された場合にはその後のろ過工程で除去される。

(4) 推定摂取量

487-TPU 製品の摂取量は、従来のプルラナーゼと同様である。従来のプルラナーゼが全て 487-TPU に置き換わり、全てのビール製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^bの推定一日摂取量は 1.14 mg TOS/人/日である。また、487-TPU 製品が全ての異性化糖製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合^cの推定一日摂取量は 0.408 mg TOS/人/日である。したがって、推定される 487-TPU 製品の推定一日摂取量の合計値は 0.028 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

487-TPU は、従来のプルラナーゼと同様にアミロペクチン等の α -1,6 グルコシド結合の加水分解を触媒する酵素である。

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

487-TPU と従来のプルラナーゼとの相違点は、生産菌が異なることである。

(2) 遺伝子組換え体と宿主の相違点

LDN487 株と宿主との相違点は、LDN487 株には *PULm104* 遺伝子が複数コピー導入され 487-TPU 生産能を獲得している点、並びに α -アミラーゼ生産能、クロラムフェニコール耐性、孢子形成能、アルカリプロテアーゼ生産能及びグルタミン酸特異的プロテアーゼ生産能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

宿主に対し、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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. 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、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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、*PULm104* 遺伝子発現カセットを直鎖化・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

PULm104 遺伝子の供与体は、*B. deramificans* T89.117D 株である。

B. deramificans T89.117D 株は、遺伝子組換え添加物として安全性審査を終了している「Optimax プラナーゼ^e」及び「BML780PULm104 株を利用して生産されたプラナーゼ^a」の導入遺伝子供与体として用いられている。*B. deramificans* は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程及び日本細菌学会による分類において、BSL2 及び 3 には分類されていない（参照 2、3）。

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

^e 2001 年 3 月 30 日官報掲載

産物の性質に関する事項

PULm104 遺伝子は、*B. deramificans* T89.117D 株由来の全長型プルラナーゼ遺伝子の N 末端の 104 アミノ酸領域に相当する塩基配列を欠失させた遺伝子である。

PULm104 遺伝子がコードする 487-TPU は、アミロペクチン等の α -1,6-グルコシド結合を加水分解する酵素である。

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

PULm104 遺伝子のプロモーターは、*B. subtilis* に由来する孢子形成調整遺伝子のプロモーターの部分配列及び *rrnIP2* プロモーター (リボソーム RNA をコードする *rrn* オペロンのプロモーター) の部分配列を組み合わせたハイブリッド型の P3 プロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

PULm104 遺伝子のターミネーターは、*B. licheniformis* BRA7 株由来の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyL* 遺伝子) のターミネーターである。

(3) そのほかの事項

PULm104 遺伝子発現カセット中で、P3 プロモーターは、*B. subtilis* のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子 (*aprE* 遺伝子) の 5' 末端側に隣接する非翻訳領域 (5'-UTR) 及び *B. licheniformis* BRA7 株由来の α -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナルペプチドコード配列を介して *PULm104* 遺伝子と連結している。この分泌シグナルペプチドは、細胞膜を通過する際に、プロテアーゼにより切断・除去される。

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

PULm104 遺伝子は、転写・翻訳すると N 末端側の 104 アミノ酸が欠失することとなる変異を導入して作製された *B. deramificans* T89.117D 株由来の短縮型プルラナーゼ遺伝子である。遺伝子組換え添加物として安全性審査を終了している「Optimax プルラナーゼ[®]」の生産菌株の染色体上の *PULm104* 遺伝子を PCR 増幅して *PULm104* 遺伝子発現カセットを作製した。

(2) ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

宿主へ導入したコンストラクトは、直鎖化されたリジン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセット及びセリン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセットであり、それぞれ 5' 末端側から P3 プロモーター、*B. subtilis* のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子 (*aprE* 遺伝子) の 5' 末端側に隣接する非翻訳領域 (5' -UTR)、*B. licheniformis* BRA7 株由来の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyL* 遺伝子) の分泌シグナルペプチドコード配列、*PULm104* 遺伝子、*B. licheniformis* BRA7 株由来の α -アミラーゼ遺伝子 (*amyL* 遺伝子) のターミネーターの順に連結した配列を、*lysA* 遺伝子発現カセット又は *serA* 遺伝子発現カセットと結合した DNA 断片である (表)。この連結 DNA 断片の 5' 末端及び 3' 末端に相同組換え用の標的遺伝子隣接領域と相同性のある配列を結合した。

表 標的遺伝子座に導入した *PULm104* 遺伝子発現カセットの構成要素等

遺伝子発現カセット		構成要素 (機能)	配列領域の由来
<i>PULm104</i> 遺伝子発現カセット	リジン生合成酵素発現型 <i>PULm104</i> 遺伝子発現カセット	改変株選択マーカー	再導入する宿主由来のリジン生合成酵素 <i>lysA</i> 遺伝子発現カセット
		プロモーター	<i>B. subtilis</i> の胞子形成調整 <i>spoVG</i> 遺伝子プロモーターとリボソーム RNA オペロン <i>rrnIP2</i> 遺伝子プロモーターのハイブリッド型 P3 プロモーター
		機能なし配列	<i>B. subtilis</i> のアルカリ性プロテアーゼ <i>aprE</i> 遺伝子 5'非翻訳領域
		シグナルペプチドコード配列	宿主由来 α -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナルペプチドをコードする配列
		プルラナーゼ遺伝子 (487-TPU をコードする遺伝子)	<i>B. deramificans</i> T89.117D 株由来の短縮型プルラナーゼ <i>PULm104</i> 遺伝子
		ターミネーター	<i>PULm104</i> 遺伝子のターミネーターとして機能する宿主由来 α -アミラーゼ遺伝子のターミネーター
	セリン生合成酵素発現型 <i>PULm104</i> 遺伝子発現カセット	プロモーター	<i>B. subtilis</i> の胞子形成調整 <i>spoVG</i> 遺伝子プロモーターとリボソーム RNA オペロン <i>rrnIP2</i> 遺伝子プロモーターのハイブリッド型 P3 プロモーター
		機能なし配列	<i>B. subtilis</i> のアルカリ性プロテアーゼ <i>aprE</i> 遺伝子 5'非翻訳領域
		シグナルペプチドコード配列	宿主由来 α -アミラーゼ遺伝子の分泌シグナルペプチドをコードする配列
		プルラナーゼ遺伝子 (487-TPU をコードする遺伝子)	<i>B. deramificans</i> T89.117D 株由来の短縮型プルラナーゼ <i>PULm104</i> 遺伝子
		ターミネーター	<i>PULm104</i> 遺伝子のターミネーターとして機能する宿主由来 α -アミラーゼ遺伝子のターミネーター
		改変株選択マーカー	再導入する宿主由来のセリン生合成酵素 <i>serA</i> 遺伝子発現カセット

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

リジン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセット及びセリン生合成酵素発現型 *PULm104* 遺伝子発現カセットの塩基数及び塩基配列は明らかになっている。制限酵素による切断地図は作成されていないが、次世代シーケンシングにより、コンストラクトの全塩基配列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。

意図する導入領域は、*PULm104* 遺伝子発現カセットである（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。

LDN487 株を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れなかった。LDN487 株の染色体に組込んだ *PULm104* 遺伝子発現カセットは、いずれも PCR 増幅した DNA 断片を電気泳動で分離した目的のゲル片から抽出・精製して用いており、目的外の遺伝子が混入しないよう純化されている。

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

LDN487 株は、*PULm104* 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

LDN487 株の複数の標的遺伝子座に、*PULm104* 遺伝子発現カセットが組込まれていることを PCR 法及び次世代シーケンシングによる導入遺伝子領域の解析により確認した。

(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

LDN487 株の染色体上の *PULm104* 遺伝子発現カセット及びその接合領域を含む隣接する配列に関し、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 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。）を検索し、アレルゲン性とタンパク質の毒性について評価した（参照 9）。

232 個の ORF が検出され、そのうちの 24 個が *PULm104* 遺伝子発現カセットと宿主ゲノムとの接合領域及び *PULm104* 遺伝子発現カセット内の導入遺伝子の各接合領域に新たに生じた ORF であった。

検出された 24 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^fを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列以上で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンは検出されなかった。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は検出されなかった。

さらに当該 24 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^g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 がムカデの毒性タンパク質と相同性を示したが、これらの ORF はプロモーター領域を起点とした相補鎖に存在し、上流にはプロモーター配列もないことから、転写される可能性は低いと考えられた。

以上のことから、487-TPU 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

LDN487 株は、「BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼ^a」で安全性が評価されている BML780 株を経て構築している。LDN487 株を BML780 株から構築する際には、遺伝子導入用ベクターは用いられなかった。

BML780 株に欠失変異を導入する工程では、欠失変異導入用のベクターに組込んだカナマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして用いたが、染色体上に欠失変異を導入した中間株は、カナマイシン添加培地では成長しないコロニーから選択しているため、カナマイシン耐性遺伝子は、中間株から脱落していると考えられる。

また、中間株への *PULm104* 遺伝子発現カセットの導入時には、抗生物質耐性遺伝子を利用しておらず、構築過程の最終段階で、LDN487 株を選択する際に、スペクチノマイシン感受性があることを確認している。このことから、LDN487 株では、菌株構築工程で、コンピテント細胞化する際に用いたスペクチノマイシン耐性遺伝子は脱落していると考えられる。

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。

導入遺伝子の供与体である *B. deramificans* は、第 10 版食品添加物公定書でプルラナーゼの生産菌として収載されている *Bacillus* 属の一種である。

^f 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）（検索日：2022 年 3 月）

^g UniProtKB（公開 2022 年 2 月）（検索日：2022 年 3 月）

また、*B. deramificans* T89.117D 株は、遺伝子組換え添加物として安全性審査を終了している「Optimax プルラナーゼ^e」及び「BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼ^a」のプルラナーゼ遺伝子の供与体である。

B. deramificans に関して、このように日本における食品産業での使用経験も含め、アレルギー誘発性に特段の懸念はないと考えられる。

アレルゲンデータベース^hで、*Bacillus* 及び *deramificans* をキーワードとして用いて検索したところ、既知のアレルゲンに関するヒットはなかった。

- (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。

487-TPU 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「BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼ」と同一のアミノ酸配列を有する。BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼは、2016 年以降欧米をはじめとして複数国で異性化糖の生産などに用いられているが、アレルギー誘発性の懸念につながる事象は報告されていない。

- (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

487-TPU 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「BML780PULm104 株を利用して生産されたプルラナーゼ^a」と同一のアミノ酸配列であることから、物理化学的処理に対する感受性に関する試験は実施されなかった。

- (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

487-TPU と既知のアレルゲン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^fを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸配列以上で 35%以上の相同性を示す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。

以上のことから、487-TPU 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。

487-TPU 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。

^h WHO/IUIS Allergen Nomenclature (<http://www.allergen.org/index.php>) (検索日：2021 年 10 月)

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。

487-TPU 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

487-TPU 製品は、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

487-TPU 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 8）。また、487-TPU 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 10）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

487-TPU 製品は、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（参照 8、11、12）。

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

487-TPU 製品は、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

487-TPU 製品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る事項

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

「LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼ」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、「LDN487 株を利用して生産されたプルラナーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. FDA, Rules and Regulations, Federal Register, vol. 48, no. 2, pp. 239-240, 1983.
2. 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」
3. 日本細菌学会, 病原細菌の BSL, 2017.
4. EPA, FINAL DECISION DOCUMENT:TSCA SECTION 5(H)(4) EXEMPTION FOR BACILLUS LICHENIFORMIS, 1997.
5. TSCA Section 5(H)(4) Exemption for Bacillus licheniformis, 2011, EPF Final Document.
6. W. B. Whitman, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - 2nd Edition, Springer, 2009.
7. B. S. Miller, プルラナーゼの修飾形態. 特許番号: JP2002505108-A/1, 1998.
8. Danisco, Certificate_of_Analysis, 2021. (社内文書)
9. Danisco, ORF_Analysis_Report_t-PU, 2022. (社内文書)
10. Danisco, rDNA STUDY REPORT, 2023. (社内文書)
11. JECFA, General JECFA specifications, 2004.
12. The United States Pharmacopeial Convention, Food Chemicals Codex, 2008.