

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

Bacillus subtilis NTI06 (pHYT2MPM) 株を
利用して生産された
マルトースホスホリラーゼ

令和7年（2025年）9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 of 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 | 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 | 10 |
| 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 | 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..... | 15 |
| 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..... | 15 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価結果..... | 15 |
| <参照>..... | 16 |

<審議の経緯>

- 2025年8月1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489号）、関係書類の接受
- 2025年8月5日 第994回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2025年8月27日 第267回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2025年9月30日 第998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267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

「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*B. subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus* sp. SH-55 株に由来するマルトースホスホリラーゼ遺伝子を導入して作製した *B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼである。本添加物は、マルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する酵素であり、糖化品の製造工程で添加され、他のホスホリラーゼ製剤を組み合わせることでマルトースに作用させることにより、二糖やオリゴ糖の製造に用いられる。

「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、「*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」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： *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ

用 途： 他のホスホリラーゼ製剤を組み合わせることでマルトースに作用させることによる二糖やオリゴ糖の製造

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、*B. subtilis* ISW1214 株を宿主として、*Paenibacillus* sp. SH-55 株に由来するマルトースホスホリラーゼ遺伝子を導入して作製した *B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼである。本添加物は、マルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する酵素であり、糖化品の製造工程で添加され、他のホスホリラーゼ製剤を組み合わせることでマルトースに作用させることにより、二糖やオリゴ糖の製造に用いられる。

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、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称： PS-MP

生 産 菌： *Paenibacillus* sp. SH-55 株

有効成分： マルトースホスホリラーゼ

EC No.： EC 2.4.1.8

CAS No.： 9030-19-7

(2) 製造方法

PS-MP は、培養、ろ過、製品化等の工程を経て製造される。生産菌は、精製工程で分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

マルトースホスホリラーゼは、マルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する酵素である。マルトースホスホリラーゼは、食品分野において、他のホスホリラーゼ製剤を組み合わせることでマルトースに作用させることで、二糖やオリゴ糖の製造に用いられる。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及び除去されるため、最終食品には活性を有する酵素は残存しない。

(4) 摂取量

すべての砂糖・甘味料類の製造に PS-MP が使用され最終製品中に 100%残存すると仮定した場合、砂糖・甘味料類を通したマルトースホスホリラーゼの一日の摂取量は 3.2 mg/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。*B. subtilis* ISW1214 株は、*B. subtilis* Marburg 168 株に *B. subtilis* 23 株由来の DNA を導入し、栄養要求性等を改変した *B. subtilis* 1012 株のテトラサイクリン感受性株として作製された（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

B. subtilis は、 α -アミラーゼやプロテアーゼの生産に安全に用いられており、食品用酵素の生産菌としての安全性は確立されている（参照 3）。

(3) 宿主の構成成分等に関する事項

B. subtilis は、非毒素産生性微生物とみなされており、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。）1 に該当する（参照 4）。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^a。

(4) 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis ISW1214 株に寄生性及び定着性は報告されていない^b。

(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 株には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない（参照 1、2）。

(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* や *Bacillus anthracis* は、毒性物質を生産することが知られているが、*B. subtilis* とは分類学的に明確に区別される（参照 5）。*B. subtilis* の近縁株である *Bacillus licheniformis* や *Bacillus pumilus* は、非病原性及び非毒素産生性とされている。

^a PubMed、検索キーワード： *Bacillus subtilis* ISW1214 + allergen（検索：2025年8月）

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

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

マルトースホスホリラーゼ (MPM) をコードする *psmpm* 遺伝子の供与体は *Paenibacillus* sp. SH-55 株である。

菌株の選択マーカーとして使用した *trpS* 遺伝子の供与体は、宿主 *B. subtilis* ISW1214 株である。

NTI06 (pHYT2MPM) 株は *B. subtilis* ISW1214 株の染色体上の複数の遺伝子 (*trpS* 及び *spoIIAC*) を、欠失導入用コンストラクト等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配列の残存が生じていないことを確認した。

(2) 挿入 DNA の性質及び導入方法

psmpm 遺伝子は、*Paenibacillus* sp. SH-55 株に由来するマルトースホスホリラーゼ遺伝子を改変した遺伝子であり、温度安定性の向上を企図して 2 つのアミノ酸変異を導入したマルトースホスホリラーゼ (MPM) 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、宿主の *B. subtilis* ISW1214 株由来であり、トリプトファン 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 *psmpm* 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) 株に変異体マルトースホスホリラーゼ (MPM) 発現プラスミドである pHYT2MPM を導入し、且つ pDATSK を脱落させることにより、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 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-MP

有効成分：マルトースホスホリラーゼ (MPM)

EC No. : EC 2.4.1.8

CAS No. : 9030-19-7

(2) 製造方法

マルトースホスホリラーゼ (MPM) は、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 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、精製工程により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

マルトースホスホリラーゼ (MPM) は、マルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する酵素であり、他のホスホリラーゼ製剤を組み合わせることで、マルトースに作用させることで、二糖やオリゴ糖の製造に用いられる。当該酵素を用いた食品の製造工程では、酵素タンパク質は不活化及び除去され、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

すべての砂糖・甘味料類の製造に T2-MP が使用され最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合、砂糖・甘味料類を通したマルトースホスホリラーゼ (MPM) の一日摂取量は 0.19 mg 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

マルトースホスホリラーゼ (MPM) は、従来のマルトースホスホリラーゼと同様にマルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する酵素であるが、分泌と熱安定性の向上を企図したアミノ酸配列の付加と変異が導入されている。

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

マルトースホスホリラーゼ (MPM) と従来のマルトースホスホリラーゼとの相違点は、生産菌、至適 pH、至適温度、熱安定性、複数のアミノ酸残基が異なることである。

(2) 組換え体と宿主の相違点

NTI06 (pHYT2MPM) 株と宿主との相違点は、NTI06 (pHYT2MPM) 株はマルトースホスホリラーゼ (MPM) 生産能を獲得している点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 (pHYT2MPM) 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ン 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である。なお、*spoIIAC* の欠失及びこれに伴う芽胞形成能の欠失が、宿主の病原性や毒素生産能などの新たな有害性の惹起に関連することは報告されていない。

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 pHYT2MPM の作製には *Escherichia coli* 由来のプラスミド pACYC177 と *Streptococcus faecalis* 由来のプラスミド pAMa1 から構築されたプラスミド pHY300PLK が用いられた（参照 2）。

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 6）。

(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 6）。

(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 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 6）。*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 2、7）。

(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 6）。

(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 6）。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 14）。

3. 挿入 DNA の供与体に関する事項

psmpm 遺伝子の供与体は *Paenibacillus* sp. SH-55 株、*trpS* 遺伝子の供与体は宿主の *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。*Paenibacillus* sp. SH-55 株、*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 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

psmpm 遺伝子がコードするマルトースホスホリラーゼ（MPM）はマルトースとリン酸から β -D-グルコース-1-リン酸と D-グルコースを生成する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ン tRNA 合成酵素は、組換え体 *B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株の内在性のトリプトファン tRNA 合成酵素遺伝子欠失を補完する。

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

psmpm 遺伝子のプロモーターは *Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺伝子上流領域の一部改変したものである。*trpS* 遺伝子のプロモーター配列は *B. subtilis* の *trpS* 遺伝子上流領域である。

(2) ターミネーターに関する事項

psmpm 遺伝子のターミネーターは *Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株由来の α -アガラーゼ遺伝子下流領域である。*trpS* 遺伝子のターミネーター配列は *B. subtilis* の *trpS* 遺伝子下流領域である。

(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 株由来マンナナーゼのシグナル配列に変異を導入して *psmpm* 遺伝子上流に付加した。

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

psmpm 遺伝子は、*Paenibacillus* sp. SH-55 株のマルトースホスホリラーゼの変異体（MPM）遺伝子を人工合成した。

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、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は、*Bacillus* sp. JAMB750 株のマンナナーゼ遺伝子上流に存在する領域の一部改変した。

ターミネーター配列は、*Thalassomonas* sp. JAMB-A33 株の α -アガラーゼ遺伝子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^c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 *psmpm* 遺伝子及び上記シグナル配列に置換することによって、発現プラスミド pHYT2MPM が作製された（参照 6）。

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 pHYT2MPM 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 6）。

(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 pHYT2MPM 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 pHYT2MPM 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 (pHYT2MPM) 株と宿主の相違点は、マルトースホスホリラーゼ (MPM) 産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 pHYT2MPM 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 (pHYT2MPM) 株を得た（参照 8）。発現プラスミド pHYT2MPM は生産株においてはプラスミドの状態では保持される。

(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 (pHYT2MPM) 株では発現プラスミド pHYT2MPM 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 pHYT2MPM 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、終止コドンから終止コドンまでで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 143 個見いだされた。これらの ORF

^c *Bacillus subtilis* DTS1451(pHYT2G)株を利用して生産されたシクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ（平成 26 年 1 月 7 日食品安全委員会において了承）

のうち、挿入 DNA 領域を含む ORF は 73 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^dを用い、E-value < 10 を指標として blastp による相同性検索を行った結果、29 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^e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。また、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 ORF は見いだされなかった。

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、pHYT2MPM の由来となるプラスミド pHY300PLK 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 pHYT2MPM 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わる遺伝子の安全性に関する事項

発現プラスミド pHYT2MPM 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 7）。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。

なお、*B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を用いて T2-MP 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 9）。

テトラサイクリン耐性遺伝子産物は精製工程において、菌体と共に除去される。

T2-MP 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、0.025 μ g/mL 未満であった（参照 10）。

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。

psmpm 遺伝子の供与体である *Paenibacillus* sp. SH-55 株がアレルギー誘発

^d NCBI Non-redundant protein sequences (nr) (検索：2022 年 4 月)

^e AllergenOnline version 21 (検索：2022 年 4 月)

性を示すという報告はない^f。

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^a。

(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。

マルトースホスホリラーゼ（MPM）に関して、アレルギー誘発性を示すという報告はない^g。

トリプトファン tRNA 合成酵素に関して、アレルギー誘発性を示すという報告はない^h。

(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 マルトースホスホリラーゼ（MPM）

a. 人工胃液に対する感受性

T2-MP 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ブロット分析を行った結果、両分析共に試験開始 30 秒後までに消化されることが確認された（参照 11）。

b. 人工腸液に対する感受性

T2-MP 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ブロット分析を行った結果、両分析共に試験開始後 6 時間を経過しても消化されなかった（参照 11）。

c. 加熱処理に対する感受性

T2-MP の加熱によるマルトースホスホリラーゼ活性への影響を分析した結果、pH 4.0 及び 6.0、80°C で 1 時間の加熱処理により失活した（参照 12）。

② トリプトファン tRNA 合成酵素

trpS 遺伝子が産生するトリプトファン 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ン 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。

^f PubMed、キーワード：Paenibacillus sp. SH-55 + allergen（検索：2023 年 2 月）

^g PubMed、キーワード：maltose phosphorylase + allergen（検索：2023 年 2 月）

^h PubMed、キーワード：tryptophanyl-tRNA synthetase + allergen（検索：2025 年 8 月）

(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
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

T2-MP 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⁶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は見いだされなかった（参照 13）。

以上のことから、T2-MP 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-MP 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-MP 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-MP 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-MP 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 9）。

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 of 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-MP 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-MP 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

「*B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」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、「*B. subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 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
2. 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
3. 第10版食品添加物公定書
4. 国立感染症研究所「病原体等安全管理規程」
5. U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Final decision document: TSCA Section 5(H)(4) exemption for *Bacillus subtilis*, (2009)
6. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラ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)
7. タカラバイオ、pHY300PLK 取扱説明書
8. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼの安全性評価に係る報告書(*Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株の作製)(社内文書)
9. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼの安全性評価に係る報告書(T2-MPの調製)(社内文書)
10. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラ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)
11. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラ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)
12. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼの安全性評価に係る報告書(加熱処理によるマルトースホスホリラーゼの活性への影響)(社内文書)
13. 日食研究報告書(2023) *Bacillus subtilis* NTI06 (pHYT2MPM) 株を利用して生産されたマルトースホスホリラーゼの安全性評価に係る報告書(マルトースホスホリラーゼのアレルギー誘発性に関する調査)(社内文書)
14. 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