

## 組換え DNA 技術を利用して製造された添加物「PLA2」(ホスホリパーゼ A2) に係る食品健康影響評価(案)

### はじめに

食品安全委員会は食品安全基本法に基づき、厚生労働省より、「PLA2」(*Streptomyces violaceoruber* AS-10 株由来のホスホリパーゼ A2)の安全性の審査に係る食品健康影響評価について意見を求められた。(平成 15 年 10 月 30 日、関係書類を接受)

### 対象添加物の概要

品 種 : PLA2 (*Streptomyces violaceoruber* AS-10 株由来のホスホリパーゼ A2)  
性 質 : リン脂質加水分解酵素  
申請者 : ナガセケムテックス株式会社  
開発者 : ナガセケムテックス株式会社

本 PLA2 は、宿主 *Streptomyces violaceoruber* 1326 株に、プロトプラスト法を用いて、*Streptomyces violaceoruber* IF015146 株由来の *pla2* 遺伝子のコーディング領域に、*Streptomyces cinamoneus* IF012852 株由来のホスホリパーゼ D 遺伝子 (*pld* 遺伝子) のプロモーター及びターミネーター領域を結合した遺伝子を導入して得られた *Streptomyces violaceoruber* AS-10 株から得られるホスホリパーゼ A2 である。

ホスホリパーゼ A2 は、ホスファチジルコリンを加水分解して 1-acylglycerophosphocholine と脂肪酸を生成する酵素である。用途は、卵黄の改質及びレシチンの加水分解であり、液体又は粉末のホスホリパーゼ A2 を卵黄液またはレシチン液に一定量添加して用いられている。

なお、宿主菌株が有害生理活性物質を生産することは知られていない。宿主、供与体に用いられた *Streptomyces* 属が基原となる添加物については、 $\alpha$ -アミラーゼ、キチナーゼ、グルコースイソメラーゼ、ビタミン B<sub>12</sub>、トランスグルタミナーゼ、リパーゼ等があり(引用文献 ) いずれも既に豊富な食経験または食品添加物としての使用経験があるものである。

*Streptomyces* 属はグラム陽性芽胞形成性土壌細菌(放線菌)であり、ヒトによる直接的な食経験はないが、病原性等の問題は報告されていない。また、*Streptomyces violaceoruber* 1326 株、*Streptomyces violaceoruber* IF015146 株、*Streptomyces cinamoneus* IF012852 株には、病原性、毒素産生は報告されていない。(引用文献 、 、 )

### 対象添加物に該当するか否かについて

#### 1. 生産菌 *Streptomyces violaceoruber* AS-10 株の構築について

宿主は、Streptomycetaceae 科 *Streptomyces* 属 *violaceoruber* 種(旧名: *lividans*)の 1326 株である。

挿入 DNA は、*Streptomyces violaceoruber* IF015146 株から分離されたホスホリパーゼ A2 の遺伝子のコーディング領域に、その転写に必要なプロモーター及びターミネーター領域として、ホスホリパーゼ D を産生する *Streptomyces cinamoneus* IF012852 株から分離された *pld* 遺伝子のプロモ

ーター領域及びターミネーター領域を結合したものである。

発現ベクター-pIJ702-EX-PLA2 は、これら挿入 DNA を *Streptomyces violaceoruber* ATCC35287 株由来のプラスミド pIJ702 にプライマー由来の *Sph* のリンカーとともに導入したものであり、pIJ702 及び発現ベクター-pIJ702-EX-PLA2 の塩基数、塩基配列及び制限酵素切断地図は明らかとなっており、目的外の遺伝子の混入はない。

この pIJ702-EX-PLA2 を用いて宿主 *Streptomyces violaceoruber* 1326 株をプロトプラスト法で形質転換し、PLA2 の生産菌株 *Streptomyces violaceoruber* AS-10 株を選抜した。

## 2. 自然界における *Streptomyces* 属間での染色体 DNA の交換について

一般的に、16S rRNA が高い相同性を持つ微生物は分類学上近縁であるとされているが、*Streptomyces violaceoruber* と *Streptomyces cinnamoneus* の 16S rRNA の塩基配列は高い相同性 (>95%) を示している。(引用文献 )

*Streptomyces* 属の多くの菌株は、自然界において接合により遺伝子の交換を行うことが知られている。このプロセスでは、細胞と細胞が接触した結果として、大きな染色体断片が取り込まれることが示されている。(引用文献 )

また、寒天培地及び土壌環境中において *Streptomyces violaceoruber* 由来の接合プラスミド及び派生プラスミドは、*Streptomyces* 属間で転移することが知られている。(引用文献 )

土壌中で、*Streptomyces violaceolatus* と *Streptomyces lividans* (= *Streptomyces violaceoruber*) の生活環を追跡し、プラスミドと Phage-Born 遺伝子の推移を調べたところ、自然界において、プラスミドの転移、ファージの感染及び細胞の接合が生じていることが確認されている。(引用文献 )

滅菌土壌において、水銀耐性遺伝子をエンコードする 2 つの *Streptomyces* 由来巨大線型プラスミド (pRJ3L(322kb)、pRJ28(330kb)) が、プラスミドを含有しない水銀感受性菌である *Streptomyces lividans* (*Streptomyces violaceoruber*) TK24 株に転移することが確認されている。(引用文献 )

土壌より分離された 99 株の *Streptomyces* 属菌株 (*Streptomyces cinnamoneus* と *Streptomyces violaceoruber* の系統が含まれている) について、これらの 16S rRNA 情報の元に得られた系統樹を比較したところ、芳香ポリケチド生合成に関わる遺伝子が分類学上近縁でない *Streptomyces* 属に存在することが示されている。(引用文献 )

ストレプトマイシン生合成に関わる遺伝子を持つと思われる 2 種類の菌株を土壌より分離したところ、そのうちの 1 つの菌株は、ストレプトマイシン生合成に関わる遺伝子クラスターを構成する全遺伝子を持ち、もう一つの菌株は同じクラスターを構成する遺伝子の一部分を持っていたが、これら 2 種の菌株は分類学上近縁でないことが示されている。(引用文献 )

以上に示される既報の科学的知見から、*Streptomyces violaceoruber* と *Streptomyces cinnamoneus* との間では自然に遺伝子の交換がなされていると考えられ、本件の *Streptomyces violaceoruber* AS-10 株について、自然界に存在しうると考えることは妥当である。

## 結果

「*Streptomyces violaceoruber* AS-10 株由来のホスホリパーゼ A2」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の安全性評価基準」の第 1 章 総則 第 3 対象となる添加物及び目的

のうち、「組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合」に該当することから、本基準の対象ではないと判断される。

#### 引用文献

- • • 既存添加物名簿収載品目リスト
- • • 国立感染症研究所病原体等安全管理規定（平成 16 年 7 月）.国立感染症研究所.
- • • Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition,667-669.
- • • The Prokaryotes Second Edition,934-941.Springer-Verlag.
- • • WITT,D.&STACKEBRANDT E.:Unification of the Genera *Stereovorticillum* and *Streptomyces*, and Amendment of the *Streptomyces* .Waksman and Henrici 1943,339. System.Appl.Microbiol.13,361-371.
- • • Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol.96 1982. Springer Verlag.
- • • Fatemeh Rafii, Don L.Crawford 1988.Transfer of conjugative plasmids and mobilization of a nonconjugative plasmid between *Streptomyces* strains on agar and in soil. Appl.Environ.Microbiol.54(6),1334-1340.
- • • Wellington E.M.H., N.Cresswell and P.R. Herron 1992. Gene transfer between *Streptomyces* in soil. Gene 115:193-198.
- • • RavelJ.,E.M.H. Wellington and R.T. Hill 2000. Interspecific transfer of *Streptomyces* Giant Linear in sterile amended soil microcosmos. Appl.Environ.Microbiology 66(2):529-534.
- • • Metsa-Ketela M., L.Halo, E.Munukka, J.Hakala, P.Mantsala and K.Ylihonko 2002. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. Appl. Environ. Microbiology 68(9):4472-4479.
- • • S.Egan, P.Wiener, D.Kallifidas&E.M.H.Wellington 2001 . Phylogeny of *Streptomyces* species and evidence for horizontal transfer of entire and partial antibiotic gene clusters . Antonie van Leeuwenhoek 79:127-133 .