

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPAo011 株を利用して生産された
ホスホリパーゼ

令和5年（2023年）11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. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺 伝子組換え添加物及び組換え体との相違 | 5 |
| 1. 従来 of 添加物の性質及び用途等に関する資料 | 5 |
| 2. 宿主及び導入 DNA | 6 |
| 3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料 | 6 |
| 4. 宿主の構成成分等に関する資料 | 6 |
| 5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料 | 7 |
| 6. 安全性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 of 添加物 及び組換え体と宿主等の相違点 | 7 |
| 第2. 宿主に関する事項 | 8 |
| 1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項 | 8 |
| 2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項 | 8 |
| 3. 寄生性及び定着性に関する事項 | 8 |
| 4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項 | 8 |
| 5. 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 | 8 |
| 第3. ベクターに関する事項 | 8 |
| 1. 名称及び由来に関する事項 | 8 |
| 2. 性質に関する事項 | 8 |
| 第4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項 | 9 |
| 1. 挿入 DNA の供与体に関する事項 | 9 |
| 2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物 の性質に関する事項 | 9 |
| 3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事 項 | 11 |
| 4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項 | 12 |
| 5. 構築された発現ベクターに関する事項 | 12 |
| 6. DNA の宿主への導入方法に関する事項 | 13 |
| 7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項 | 13 |
| 第5. 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 |

| | |
|---|----|
| 第6. 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7. 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. 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 | 15 |
| 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8. 第2から第7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>

- 2023年5月22日 厚生労働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（厚生労働省発生食 0522 第1号）、関係書類の接受
- 2023年5月30日 第900回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2023年6月19日 第237回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2023年11月28日 第922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）
- 川西 徹（委員長代理 第二順位）
- 脇 昌子（委員長代理 第三順位）
- 香西 みどり
- 松永 和紀
- 吉田 充

<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>

- | 2023年9月30日まで | | 2023年10月1日から | |
|--------------|--------|--------------|--------|
| 中島 春紫（座長） | | 児玉 浩明（座長） | |
| 山川 隆（座長代理） | | 佐々木 伸大（座長代理） | |
| 安達 玲子 | 佐々木 伸大 | 伊藤 政博 | 柴田 識人 |
| 岡田 由美子 | 近藤 一成 | 岡田 由美子 | 手島 玲子 |
| 小野 道之 | 樋口 恭子 | 小野 道之 | 樋口 恭子 |
| 小野 竜一 | 藤原 すみれ | 小野 竜一 | 藤原 すみれ |

<第237回遺伝子組換え食品等専門調査会専門参考人名簿>

- 児玉 浩明（千葉大学大学院園芸学研究科教授）

要 約

「JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Valsaria rubricosa* ATCC24940 株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製された JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 (lip182) である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、パン製造における品質改善に使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿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、「JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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：JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ

用途：パン製造における品質改善

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S (デンマーク)

本添加物は、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株を宿主として、*Valsaria rubricosa* ATCC24940 株由来のホスホリパーゼ遺伝子を導入して作製された JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ A1 (lip182) である。本添加物は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解することにより、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成する酵素であり、パン製造における品質改善に使用される。

II. 食品健康影響評価

第 1. 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1. 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(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：ホスホリパーゼ

生産菌：*Aspergillus niger* JPAN002 株

有効成分：ホスホリパーゼ A1 (pla1)

EC No. : EC 3.1.1.32

CAS No. : 9043-29-2

(2) 製造方法

ホスホリパーゼ A1 は、培養工程、ろ過等の製造工程を経た上で、製剤化される。なお、生産菌及び菌体成分は、ろ過等の精製工程を経て除去される。

(3) 用途及び使用形態

ホスホリパーゼ A1 は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するアシルヒドロラーゼである。

ホスホリパーゼ A1 は、レシチンからリゾレシチン及び脂肪酸を生成するため、コムギ、鶏卵などを含むパン又は菓子パンの製造などに使用される。

(4) 摂取量

既存のホスホリパーゼ A1 製品が全て本添加物を用いた製品に置き換わり、全ての「パン類・菓子パン類」^aの製造に使用され、最終製品中に 100%残存す

^a 令和元年「国民健康・栄養調査報告」食品群別摂取量の食品分類

ると仮定した場合、最大一日摂取量は、0.0048 mg TOS (Total Organic Solids) /kg 体重/日である。

2. 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名 (学名)、株名等及び由来

宿主は、*A. oryzae* IFO4177 株である。本菌株は、清酒麴から分離された野生株であり (参照 1)、製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源部門において NBRC4177 株として登録、保管されている。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

ホスホリパーゼ A1 (*lip182*) 遺伝子の供与体は、*Valsaria rubricosa* ATCC24940 株である。

pyrG 遺伝子の供与体は、宿主 *A. oryzae* IFO4177 株 である。

LEU2 遺伝子の供与体は、*Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171T 株である。

プロモーター配列及びターミネーター配列の供与体は、宿主 *A. oryzae* IFO4177 株及び *A. niger* BO-1 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

lip182 遺伝子は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、リゾリン脂質及び脂肪酸を生成するホスホリパーゼ A1 である *lip182* をコードする。

pyrG 遺伝子はオロチジン 5' -リン酸デカルボキシラーゼをコードし、*LEU2* 遺伝子はロイシン合成酵素をコードし、いずれも選択マーカーとして用いた。

lip182/pyrG 遺伝子発現カセットを含む遺伝子導入用ベクター全体を宿主に導入した。

3. 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

A. oryzae は食品用酵素の生産菌として、長年安全に使用されてきた実績がある (参照 2、3)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

A. oryzae は、アフラトキシンの産生は確認されていない。また、*A. oryzae* の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されている (参照 4)。

5. 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(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：lip182 製品

有効成分：ホスホリパーゼ A1 (lip182)

EC No.：EC 3.1.1.32

CAS No.：9043-29-2

(2) 製造方法

lip182 製品は、JPAo011 株を生産菌として、従来のホスホリパーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

lip182 製品の用途及び使用形態は、従来のホスホリパーゼ A1 と同様である。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

lip182 製品は、従来のホスホリパーゼ A1 と同様に、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解し、食品中のレシチンを分解する。

6. 安全性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組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

lip182 と従来のホスホリパーゼ A1 (pla1) との相違点は、生産菌、遺伝子供与体並びにアミノ酸配列及び残基数である。

(2) 組換え体と宿主

JPAo011 株と宿主との相違点は、JPAo011 株は *lip182* 遺伝子が導入されており、lip182 生産能を獲得している点である。

1 から 6 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. 宿主に関する事項

1. 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項

宿主は、*A. oryzae* IFO4177 株である。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

A. oryzae は、一般的に非病原性の微生物である。*A. oryzae* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程の BSL2 及び 3 の病原体等に分類されていない。また、*A. oryzae* は病原体等のリスク群 1 に分類される（参照 5）。したがって、IFO4177 株は非病原性であると考えられる。また、*A. oryzae* の中には、シクロピアゾン酸、コウジ酸及び β -ニトロプロピオン酸を生産する株も報告されている（参照 4）が、JPAo011 株の作製過程でアフラトキシン及びシクロピアゾン酸の産生に関連する遺伝子が破壊されており、JPAo011 株ではシクロピアゾン酸、コウジ酸、 β -ニトロプロピオン酸及びアフラトキシンがいずれも検出限界未満であることが確認されている。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

A. oryzae 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。

4. 病原性の外来因子（ウイルス等）に汚染されていないことに関する事項

A. oryzae には、病原性を有する外来因子の存在を示唆する報告はない。

5. 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

Aspergillus 属で *Aspergillus* section *Fumigati* に属する *Aspergillus fumigatus* は日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。

A. oryzae と同じ *Aspergillus* section *Flavi* に属する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを生産する（参照 6）。*A. oryzae* はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターホモログを有するものの、そのほとんどの菌株においてアフラトキシン生合成遺伝子が転写機能を失っている（参照 7、8）。

第3. ベクターに関する事項

1. 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV053 の作製には、*Escherichia coli* 由来のプラスミド pUC19 が用いられた。

2. 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pUC19 の塩基数及び塩基配列は、明らかになっている。

(2) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pUC19 の制限酵素による切断地図は、明らかになっている。

(3) 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 pUC19 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。

(4) 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pUC19 には、薬剤耐性遺伝子としてアンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pUC19 は、コリシン E1 プラスミド由来の複製起点 *Ori* を有し、*E. coli* において自律増殖能を持つ（参照 9、10）。プラスミドの複製が可能な生物種は *E. coli* のみである。

第 4. 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1. 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

lip182 遺伝子の供与体は *V. rubricosa* ATCC24940 株、*pyrG* 遺伝子の供与体は *A. oryzae* IFO4177 株である。*LEU2* 遺伝子の供与体は *S. cerevisiae* CBS 1171T 株である。プロモーター配列及びターミネーター配列の供与体は、宿主 *A. oryzae* IFO4177 株及び *A. niger* BO-1 株である。

(2) 安全性に関する事項

V. rubricosa は、ニュージーランドでナンキョクブナ属 (*Nothofagus*) の植物から単離された（参照 11）。

S. cerevisiae は、アルコール製造及びパンの製造に長年にわたり用いられてきた。

V. rubricosa、*A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* は国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL2 及び 3 に分類されていない。また、*A. oryzae* 及び *S. cerevisiae* はヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがないものと考えられ、病原体等のリスク群 1 に分類される（参照 5）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング又は合成方法に関する事項

lip182 遺伝子は、*V. rubricosa* ATCC24940 株のゲノム DNA を鋳型として用いて PCR で増幅して得た。

pyrG 遺伝子は、IFO4177 株のゲノム DNA を鋳型として用いて PCR で増幅して得た。

LEU2 遺伝子は、*S. cerevisiae* CBS 1171T 株のゲノム DNA を鋳型として用いて PCR で増幅して得た。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は、明らかにになっている (参照 12)。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

① *lip182* 遺伝子

lip182 遺伝子がコードするホスホリパーゼ A1 (*lip182*) は、リン脂質の 1 位のエステル結合を加水分解する酵素である。(参照 14)

a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

V. rubricosa のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^bを行った。その結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

lip182 のアレルギー誘発性の可能性を調べるために、データベース^cを用いて既知のアレルゲンと 80 アミノ酸残基で 35%以上一致する条件において相同性検索を行った。その結果、Sch c 1 と相同性を示した (参照 14) が、Sch c 1 は食物アレルゲンではないと考えられる。また、連続する 8 アミノ酸配列が完全に一致する条件において、*lip182* と既知のアレルゲンとの相同性検索を行った。その結果、*lip182* と連続する 8 アミノ酸配列で完全一致する既知のアレルゲンは検出されなかった (参照 14)。したがって *lip182* 遺伝子産物がアレルギー誘発性を有するとは考えにくい。

c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

(a) 人工胃液に対する感受性

lip182 の人工胃液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE (CBB 染色) 及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始 5 分以内に消化されることが示された (参照 15)。

(b) 人工腸液に対する感受性

lip182 の人工腸液中での消化性を調べる目的で、SDS-PAGE (CBB 染色) 及びウェスタンブロット分析を行った。その結果、試験開始 1 時間以内に消化されることが示された (参照 15)。

^b PubMed (検索日 : 2023 年 6 月)

^c Comprehensive Protein Allergen REsource (COMPARE) (version 2023) (検索日 : 2023 年 6 月)

(c) 加熱処理に関する感受性

lip182 の加熱処理に対する感受性を調べる目的で、pH4.0 で各温度帯で 30 分処理した後の活性を測定した。その結果 70℃ の処理によってほぼ失活し、90℃ の処理によって完全に失活することが示された(参照 16)。

d. 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

第 5-2-(2) に記載のとおりである。

② *pyrG* 遺伝子

pyrG 遺伝子がコードするオロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼにアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。*pyrG* 遺伝子の供与体である *A. oryzae* については、味噌、醤油、醸造酒等の製造に長年にわたり安全に使用されてきた経緯があり、適切な環境で扱われている限り、アレルギー誘発性の可能性は低いと考えられる。尚、*A. oryzae* 由来の酵素として、Asp o 13 及び Asp o 21 がアレルゲンとしてデータベース^dに登録されているが、これらは吸入性アレルゲンとして整理される。

③ *LEU2* 遺伝子

LEU2 遺伝子がコードするロイシン合成酵素にアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。*LEU2* 遺伝子の供与体である *S. cerevisiae* には、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

以上のことから、lip182、オロチジン 5' - リン酸デカルボキシラーゼ及びロイシン合成酵素はアレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

3. 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー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

lip182 遺伝子のプロモーターは、*A. niger* に由来する中性アミラーゼ II (*na2*) 遺伝子のプロモーターである。

pyrG 遺伝子のプロモーターは、*A. oryzae* に由来するプロモーターである。

LEU2 遺伝子のプロモーターは、*S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子に由来する野生型のプロモーターである。

(2) ターミネーターに関する事項

lip182 遺伝子のターミネーターは、*A. niger* BO-1 株由来の *amg* 遺伝子のターミネーターである。

pyrG 遺伝子のターミネーターは、*A. oryzae* に由来する *pyrG* 遺伝子の野生型のターミネーターである。

^d WHO/IUIS Allergen Nomenclature

LEU2 遺伝子のターミネーターは、*S. cerevisiae* の *LEU2* 遺伝子に由来する野生型のターミネーターである。

- (3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること
部位特異的組換えの標的配列及び導入後のマーカー遺伝子断片が含まれる(参照 12)。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミドベクター pUC19 に、*na2* プロモーター断片、*lip182* 遺伝子断片、*amg* ターミネーター断片、*LEU2* 遺伝子断片、*pyrG* ターミネーター断片、*pyrG* 遺伝子断片、プロモーター断片等を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV053 を作製した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

- (1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV053 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) 原則として、最終的に宿主に導入されると考えられる発現ベクター内の配列には、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

pJPV053 は *lip182* 遺伝子、*pyrG* 遺伝子及び *LEU2* 遺伝子を含む。これら以外のオープンリーディングフレーム (ORF) が含まれているかどうかを調べるために、pJPV053 全体について ORF 検索を行った (参照 14)。その結果、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連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 206 個検出された。これらの ORF について、アレルゲンデータベース^oを用いて相同性検索を行った。

その結果、連続する 80 アミノ酸残基で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲンとして、*lip182* をコードする塩基配列で検出された 1 つの ORF が Sch c 1 と相同性を示した (参照 14)。Sch c 1 は吸入をばく露経路とするアレルゲンであるが、本申請品目を含む製品を日本国内で販売する際には、労働安全衛生法に基づきラベル及び Safety Data Sheet の提供等で使用者に対してリスク及び取り扱い方法が伝達されている。加えて、当該 ORF と Sch c 1 との間に連続した 8 アミノ酸の一致はなかった (参照 14)。

また、*lip182* をコードする塩基配列の読み枠が異なる ORF が既知のアレルゲンに対して相同性を示した。その ORF は pJPV053_195 であり、オウシュウヨモギ由来の花粉アレルゲン *Artemisia Art v 1* と相同性を示した。これは吸入をばく露経路とする呼吸器感作性のアレルゲンであり、口腔アレルギー症候群を引き起こす可能性が示唆されていることから、安全のため労働安全衛生

法に基づき使用者に対するリスク及び取り扱い方法が伝達されている。しかしながら、この ORF と既知のアレルゲンとの間に連続した 8 アミノ酸の一致はないため、実際にアレルギー性を有するとは考えにくい（参照 14）。

また、pJPV053 中で検出された 206 個の ORF と連続する 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）。

以上のことから、これらの ORF の食物アレルギー感作性についての懸念は低いものと考えられる。

さらに、pJPV053 中で検出された 206 個の ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、NCBI データベース^eを用いて $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った。その結果、相同性を示した ORF はなかった。

(3) 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発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター pJPV053 全体である（参照 12）。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクター pJPV053 は、目的外の遺伝子の混入がないように精製キットを用いて純化されている。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV053 を標的遺伝子座へ導入し、JPAo011 株を得た。

7. 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV053 には抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない（参照 12）。

第 5. 組換え体に関する事項

1. 宿主との差異に関する事項

JPAo011 株は、*lip182* 遺伝子発現カセット、*LEU2* 遺伝子発現カセット及び *pyrG* 遺伝子発現カセットが多コピー導入されている点で宿主と異なる。

2. 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

JPAo011 株において挿入された遺伝子導入ベクターにおける制限酵素認識サイトは確認されている。

lip182 遺伝子、*LEU2* 遺伝子並びに *pyrG* 遺伝子の発現カセットの導入位置

^e NCBI データベース（検索日：2021 年 10 月）

及びコピー数を確認するためにシーケンス解析及び ddPCR 解析を行った結果、1箇所にも複数コピー挿入されていることを確認した。(参照 17、18)。

(2) オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

lip182 遺伝子、*LEU2* 遺伝子及び *pyrG* 遺伝子の発現カセットの導入により新たに生じるオープンリーディングフレーム(以下「ORF」という。)を検索するために、挿入 DNA 並びに 5'近傍配列及び 3'近傍配列を含む領域における ORF 検索を行った(参照 19)。その結果、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連続する 30 アミノ酸以上の ORF が 78 個検出された。

これらの ORF と既知のアレルゲンとの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。その結果、連続する 80 アミノ酸残基で 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(参照 19)。また、連続する 8 アミノ酸残基が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった(参照 19)。

さらに、これらの ORF と既知の毒性タンパク質との相同性の有無を確認するために、NCBI データベース⁶を用いて $E\text{-value} < 1.0 \times 10^{-5}$ を指標として検索を行った。その結果、相同性を示した ORF はなかった。

第 6. 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

lip182 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

lip182 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 7. 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

lip182 製品は、デンマークにおいて、食品用加工助剤として承認を受けており(参照 20)、米国で GRAS として認証されている(参照 21)。また EFSA には申請中である。

2. 組換え体の残存に関する事項

lip182 製品に生産菌由来の DNA の残存がないことを PCR 分析により確認した(参照 22)。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

lip182 の製品化前の酵素サンプルは、我が国の食品、添加物等の規格基準に定

める規格値を満たしている（参照 23）。

また、lip182 製品の製造原料は、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

lip182 を有効成分とする酵素製剤は、生産菌及び培養液を、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て精製された lip182 の酵素原体を用い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

lip182 製品の酵素原体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 8. 第 2 から第 7 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 2 から第 7 までの事項により安全性の知見が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」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の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿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、「JPAo011 株を利用して生産されたホスホリパーゼ」は、人の健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. 坂口謹一郎、山田浩一. 麹菌の形態と其の分類に就て (其の1) 東京帝国大学農学部農芸化学教室 昭和18年5月27日受理.
2. Wood BJB. Oriental Food Uses of *Aspergillus*. In: Smith JE, Pateman JA (editors). The British Mycological Symposium. London: Academic Press; 1977. pp. 481-498.
3. Barbesgaard P, Heldt-Hansen HP, Diderichsen B. On the safety of *Aspergillus oryzae*: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 1992;36(5):569-572.
4. Frisvad JC, Moller LLH, Larsen TO, Kumar R, Arnau J. 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* 2018;102(22):9481-9515.
5. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (改訂第三版) https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_20200401.pdf. [accessed May 31 2021].
6. Varga J, Rigo K, Toth B, Teren J, Kozakiewicz Z. Evolutionary Relationships among *Aspergillus* Species Producing Economically Important Mycotoxins. *Food Technology and Biotechnology* 2003;41(1):29-36.
7. Tominaga M, Lee YH, Hayashi R, Suzuki Y, Yamada O et al. Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains. *Appl Environ Microbiol* 2006;72(1):484-490.
8. Kusumoto K, Nogata Y, Ohta H. Directed deletions in the aflatoxin biosynthesis gene homolog cluster of *Aspergillus oryzae*. *Curr Genet* 2000;37(2):104-111.
9. Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985;33(1):103-119.
10. Development of plasmids as cloning vectors: Academic Press; 1999.
11. Bohman G. CHEMICAL STUDIES ON LICHENS .2. ANTHRAQUINONES FROM NEPHROMA LAEVIGATUM. *Arkiv for Kemi, Article* 1969;30(3):217-&.
12. 遺伝子導入用ベクターpJPV053のDNA塩基配列並びに構成 (社内文書)
13. Ramrakhiani L, Chand S. Recent Progress on Phospholipases: Different Sources, Assay Methods, Industrial Potential and Pathogenicity. *Applied Biochemistry and Biotechnology, Article* 2011;164(7):991-1022.

14. Sequence homology of ORFs in the pJPV053 locus on the genome of JPAo011 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
15. Purity and Digestibility of lip182 protein in a test batch *** (社内文書)
16. Analytical method for temperature and pH activity profile and temperature stability of phospholipase A1 (社内文書)
17. JPAo011 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
18. Copy number of the expression cassette in the production strain (社内文書)
19. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPAo011 to toxin proteins from NCBI and allergens (社内文書)
20. Danish Approval of the Phospholipase A1 (社内文書)
21. FDA. Generally Recognized as Safe (GRAS) Notice Inventory.
https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/index.cfm?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=. May 11, 2020.
21. Absence of residual DNA in the product (社内文書)
22. 第9版食品添加物公定書.
http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuten/kouteisho9e.html [accessed May 16, 2018].