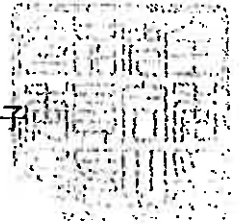


府食第25号
平成24年1月12日

厚生労働大臣
小宮山 洋子 殿

食品安全委員会
委員長 小泉 直子



食品健康影響評価の結果の通知について

平成22年11月1日付け厚生労働省発食安1101第1号をもって貴省から当委員会に意見を求められた添加物「BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ」に係る食品健康影響評価の結果は下記のとおりですので、食品安全基本法(平成15年法律第48号)第23条第2項の規定に基づき通知します。
なお、食品健康影響評価の詳細は別添のとおりです。

記

「BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ」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)に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

遺伝子組換え食品等評価書

BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された
6- α -グルカノトランスフェラーゼ

2012年1月

食品安全委員会

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	6
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	7
1 分類学上の位置付け（種名（学名）・株名等）に関する事項	7
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	11
5 構築された発現ベクターに関する事項	11
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項	12
7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項	12
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.....	13
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.....	13
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.....	13
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.....	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.....	14
Ⅲ.	食品健康影響評価結果.....	15
<参照>	15

<審議の経緯>

2010年11月2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（厚生労働省発食安1101第1号）、関係書類の接受
2010年11月4日	第354回食品安全委員会（要請事項説明）
2010年11月16日	第86回遺伝子組換え食品等専門調査会
2011年7月27日	第93回遺伝子組換え食品等専門調査会
2011年8月29日	第94回遺伝子組換え食品等専門調査会
2011年11月10日	第406回食品安全委員会（報告）
2011年11月10日から12月9日	国民からの御意見・情報の募集
2012年1月10日	遺伝子組換え食品等専門調査会座長から食品安全委員会委員長へ報告
2012年1月12日	第414回食品安全委員会（報告） （同日付け厚生労働大臣に通知）

<食品安全委員会委員名簿>

2011年1月6日まで	2011年1月7日から
小泉直子（委員長）	小泉直子（委員長）
見上 彪（委員長代理）	熊谷 進（委員長代理*）
長尾 拓	長尾 拓
野村一正	野村一正
畑江敬子	畑江敬子
廣瀬雅雄	廣瀬雅雄
村田容常	村田容常

*：2011年1月13日から

<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>

澤田純一（座長）	
鎌田 博（座長代理）	
五十君静信	渋谷直人
石見佳子	手島玲子
海老澤元宏	中島春紫
小関良宏	飯 哲夫
橘田和美	山崎 壮
児玉浩明	和久井信

要 約

「BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ」について申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を行った。

本添加物は、6- α -グルカノトランスフェラーゼの生産性及び品質を高めるために、*Bacillus subtilis* BR151 株を宿主として、*Aquifex aeolicus* VF5 株由来の改変 6- α -グルカノトランスフェラーゼ遺伝子を含む発現プラスミド pUAQ2 を導入して作製した BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼである。本添加物は、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成する反応を触媒する酵素であり、デキストリン等の高分子糖質を製造するために使用される。

「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、遺伝子の導入後の塩基配列の解析等について確認した結果、従来 of 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。

したがって、「BR151 (pUAQ2) 株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ」については、ヒト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

品 目：BR151(pUAQ2)株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼ

用 途：デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成する反応を触媒する酵素であり、デキストリン等の高分子糖質を製造するために使用される。

申請者：江崎グリコ株式会社

開発者：江崎グリコ株式会社

本添加物は、6- α -グルカノトランスフェラーゼの生産性及び品質を高めるために *Bacillus subtilis* BR151 株を宿主として、*Aquifex aeolicus* VF5 株由来の改変グルカノトランスフェラーゼ遺伝子（改変 *Aq722* 遺伝子）を含む発現プラスミド pUAQ2 を導入して作製した BR151(pUAQ2)株を利用して生産された 6- α -グルカノトランスフェラーゼである。

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： α -グルコシルトランスフェラーゼ

基 原：*Geobacillus stearothermophilus* TRBE14 株

有効成分：6- α -グルカノトランスフェラーゼ

IUB 分類命名法による系統名及び酵素番号並びに CAS 番号は以下のとおり。

IUB 分類名：1,4- α -グルカン ブランチングエンザイム

系 統 名：

1,4- α -D-Glucan:1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase

IUB No. : 2.4.1.18

CAS No. : 9001-97-2

(2) 製造方法

6- α -グルカノトランスフェラーゼは、*G. stearothermophilus* TRBE14 株を生産菌として用い、培養工程、精製工程を経て製造される。

生産菌は、精製工程におけるろ過により、除去される。

(3) 用途及び使用形態

6- α -グルカノトランスフェラーゼは、デンプンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成する反応を触媒する酵素

であり、デキストリン等の高分子糖質を製造するために使用されている。

(4) 摂取量

6- α -グルカノトランスフェラーゼは、デンプンの加工に使用されるが、最終製品である高分子糖質の製造工程において失活し、除去され、最終製品には残存しない。

最終製品の6- α -グルカノトランスフェラーゼの含有量は、ELISA法を用いて測定した結果、検出限界(0.3 ppm)以下であった。

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、*B. subtilis* 168株の突然変異株 *B. subtilis* BR151株であり、芽胞形成能を失っている。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

改変 *Aq722* 遺伝子の供与体は、*A. aeolicus* VF5株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

改変 *Aq722* 遺伝子は、評価対象添加物である6- α -グルカノトランスフェラーゼを発現する。

改変 *Aq722* 遺伝子を含む発現プラスミド pUAQ2 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

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。また、経済開発協力機構(OECD)において、優良工業製造規範(GILSP)が適用できる宿主微生物として認定されている。

4 宿主の構成成分等に関する資料

B. subtilis が有害生理活性物質を生産するという報告はない。

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：AqBE

有効成分：6- α -グルカノトランスフェラーゼ

IUB 分類命名法による系統名及び酵素番号並びに CAS 番号は以下のとおり。

IUB 分類名：1, 4- α -グルカン ブランチングエンザイム

系統名：

1,4- α -D-Glucan:1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase
IUB No. : 2.4.1.18
CAS No. : 9001-97-2

(2) 製造方法

AqBE は、*B. subtilis* BR151(pUAQ2)株が生産菌として用いられ、製造される。製造方法は、従来の添加物と基本的には同様であり、培養工程及び精製工程を経て製造される。

生産菌は、精製工程におけるろ過により、除去される。

(3) 用途及び使用形態

AqBE は、従来の添加物と同様にデンプンの加工に使用され、用途及び使用形態は従来の添加物と変わらない。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

AqBE は、従来の添加物と同じ反応を触媒する酵素であるが、酵素活性の熱安定性が向上している。

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

本添加物と従来の添加物との相違点は、アミノ酸数及びアミノ酸配列が異なる点である。また、従来の添加物と比較して、酵素活性の熱安定性が向上している。

改変 Aq722 遺伝子が発現する 6- α -グルカノトランスフェラーゼのアミノ酸数は 630 残基であり、従来の添加物と比較して 22 残基少なくアミノ酸配列は 320 残基異なるが、立体構造は全体として類似しており、従来の添加物と同じ反応を触媒する。

(2) 組換え体と宿主

BR151(pUAQ2)株と宿主との相違点は、BR151(pUAQ2)株は改変 Aq722 遺伝子を含む発現プラスミド pUAQ2 が導入され、6- α -グルカノトランスフェラーゼ産生性を獲得している点及びカナマイシン及びブレオマイシン耐性を獲得している点である。

以上 1～6 より、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、第 2 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、*B. subtilis* 168 株の突然変異株 *B. subtilis* BR151 株である。

B. subtilis は、広く自然界に存在し、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、ヒトは納豆等の食品を通じて多くの食経験がある。

また、経済開発協力機構（OECD）において、優良工業製造規範（GILSP）が適用できる宿主微生物として認定されている。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. subtilis の病原性は知られておらず、有害生理活性物質を生産するという報告はない。また、国立感染症研究所病原体管理規程のバイオセーフティレベル1に該当する。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis が腸管内に定着する可能性はあるが、ヒトは納豆等の食品を通じて食経験があることから、安全上問題はないと考えられる。

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

B. subtilis BR151 株には、病原性の外来因子の存在を示唆する事実は認められていない。

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

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。

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

発現プラスミド pUAQ2 の作製には *Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pUB110 が用いられた。pUB110 は、食品用酵素の製造等に長年安全に利用されており、ヒトに対する有害性は知られていない（参照1）。

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 pUB110 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 pUB110 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 pUB110 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 pUB110 にはカナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシ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 pUB110 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 pUB110 の複製開始配列は、*Staphylococcus* 属菌及び *Bacillus* 属菌で機能することが知られているが、それら以外の菌で機能することは知られていないことから、宿主依存性は高いと考えられる。

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

改変 *Aq722* 遺伝子の供与体は、*A. aeolicus* VF5 株である。

(2) 安全性に関する事項

A. aeolicus VF5 株は、好熱性、微好気性の独立栄養化学合成細菌であることから、ヒトへの寄生性又は感染性を有するとは考えられない（参照2）。また、*A. aeolicus* VF5 株のゲノムの塩基配列は明らかになっており、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。

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若しくは合成方法に関する事項

改変 *Aq722* 遺伝子は、*A. aeolicus* VF5 株の *Aq722* 遺伝子の塩基配列に基づき、発現量を高めるために塩基置換し、人工合成した遺伝子である。

(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

改変 *Aq722* 遺伝子の塩基数、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。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

改変 *Aq722* 遺伝子が発現する 6- α -グルカノトランスフェラーゼは、デンブンの α -1,4-D-グルコシド結合を切断し、 α -1,6-D-グルコシド結合を形成する反応を触媒する酵素である。アミノ酸数は 630 残基であり、従来の添加物の有効成分である *G. stearothermophilus* TRBE14 株由来の 6- α -グルカノトランスフェラーゼと類似した立体構造をとると考えられるが、そのアミノ酸配列と比較して、320 残基のアミノ酸が異なり、アミノ酸数は 22 残基少

ない。それにより、酵素活性の熱安定性が向上している。

改変 *Aq722* 遺伝子が発現する 6- α -グルカノトランスフェラーゼ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、Swiss Plot protein sequences データベースを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は見いだされなかった（参照3）。

改変 *Aq722* 遺伝子が発現する 6- α -グルカノトランスフェラーゼは、従来の 6- α -グルカノトランスフェラーゼとアミノ酸配列が異なることから、AqBE のアレルギー誘発性について「遺伝子組換え食品（微生物）の安全性評価基準」（平成 20 年 6 月 28 日食品安全委員会決定）の第 2 章第 5 の 5 に基づき、検討された。

1) 遺伝子産物の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

改変 *Aq722* 遺伝子の供与体である *A. aeolicus* VF5 株に関して、アレルギー誘発性の報告はない。

2) 遺伝子産物についてのアレルギー誘発性に関する知見

AqBE の有効成分である 6- α -グルカノトランスフェラーゼに関して、アレルギー誘発性を示唆するような知見は確認されていない。

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

① 人工胃液に対する感受性

AqBE 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。その結果、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析において、試験開始後 5 分以内に消化されることが確認された（参照4,5）。

② 人工腸液に対する感受性

AqBE の人工腸液中における消化性について確認するために、ウェスタンブロット分析を行った結果、試験開始後 120 分を経過しても消化されなかった（参照6）。

③ 加熱処理に対する感受性

AqBE の加熱による酵素活性の変化を測定した結果、酸性条件下で、90℃、2 時間の加熱処理で失活することが確認された。また、加熱処理後、凝集沈殿を起こすこと、及び ELISA 法を用いて分析を行った結果、加熱処理により AqBE の免疫反応性は定性的にはあるが、大幅に低下することが確認された（参照7）。

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。）との構造相同性に関する事

項

AqBE の有効成分である 6- α -グルカノトランスフェラーゼと既知のアレルゲン等との相同性の有無を確認するために、Allergen Database for Food Safety (ADFS) データベースを用いて、相同性検索を行った結果、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン等は見いだされなかった(参照 8)。また、抗原決定基との相同性の有無を確認するために、ADFS データベースを用いて相同性検索を行った結果、連続する 8 アミノ酸配列が既知のアレルゲン等と一致するものは見いだされなかった(参照 8)。

以上のことから総合的に判断し、AqBE には、アレルギー誘発性を示唆するデータがないことが確認された。

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

プラスミド pUB110 上の配列がプロモーターとして機能していると考えられる。

(2) ターミネーターに関する事項

プラスミド pUB110 上の配列がターミネーターとして機能していると考えられる。

(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

改変 Aq722 遺伝子上流に、翻訳に必要となる Shine-Dalgarno 配列 (SD 配列) として、*B. subtilis* 由来の rRNA を基に人工合成した SD 配列を付加した。

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 pUB110 に改変 Aq722 遺伝子及び SD 配列を挿入することによって、発現プラスミド pUAQ2 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

発現プラスミド pUAQ2 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。

(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

発現プラスミド pUAQ2 の全塩基配列について、6つの読み枠において ORF 検索を行った結果、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 100 個見いだされた。これらの ORF と既知のタンパク質との相同性の有無を確認するために、Swiss Plot protein sequences データベースを用いて blastp 検索を行った結果、相同性を示す既知のタンパク質は見いだされなかった（参照9）。

また、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に、ADFS データベースを用いて、相同性検索を行った結果、80 アミノ酸以上で 35%以上の相同性を示す ORF は見いだされなかった。また、抗原決定基の存在の可能性を確認するために、ADFS データベースを用いて相同性検索を行った結果、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ものは見いだされなかった（参照 9）。

(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

意図する挿入遺伝子である改変 Aq722 遺伝子の発現プラスミド pUAQ2 上の位置は明らかになっている。

(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

発現プラスミド pUAQ2 は目的外の遺伝子の混入がないように構築され、宿主に導入されている。

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

発現プラスミド pUAQ2 を宿主に導入後、カナマイシンを含む培地で選抜することによって BR151(pUAQ2)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

(1) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関する事項

BR151(pUAQ2)株には、カナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子が存在し、カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼ (KAN) 及びブレオマイシン耐性タンパク質 (BRP) を発現する。これらの遺伝子は、プラスミド pUB110 に由来する。

KAN は、カナマイシンのアミノ糖残基中の水酸基にヌクレオチドを付加することによってその活性を不活化する（参照10）。BRP は、ブレオマイシンに結合することで、ブレオマイシンの DNA 鎖切断作用を阻害する（参照11）。

(2) 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

KAN 及び BRP は、AqBE の製造工程における加熱により失活し、ろ過により除去されると考えられる。さらに、AqBE を利用した高分子糖質の製造工程にお

ける精製により、最終製品に残存する可能性は低いと考えられる。

さらに、AqBE に発現プラスミド pUAQ2 由来の DNA が含まれていないことを確認するために、サザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、pUAQ2 由来の DNA 断片は検出されなかったことから、AqBE にカナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子は含まれていないことが確認されている。（参照12）。

また、pUB110 は、食品用酵素の製造等に長年安全に利用されてきており、これらの抗生物質耐性遺伝子を保持したまま使用されている場合もあるが、安全上の懸念はないとされている（参照13,14）。

以上のことから、これらの抗生物質耐性遺伝子及び遺伝子産物については、安全上問題ないものと考えられる。

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

BR151(pUAQ2)株に導入された発現プラスミド pUAQ2 中の改変 Aq722 遺伝子が 6- α -グルカノトランスフェラーゼを発現すること、並びにカナマイシン耐性遺伝子及びブレオマイシン耐性遺伝子の導入によってカナマイシン耐性及びブレオマイシン耐性を獲得していることが宿主との差異である。

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

BR151(pUAQ2)株に導入された発現プラスミド pUAQ2 の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(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

BR151(pUAQ2)株に導入された発現プラスミド pUAQ2 において確認された目的以外の ORF については、既知のタンパク質との相同性は認められなかった。

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

AqBE の製造原料は食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

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

AqBE の製造原料は食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は、従来から食品用酵素剤の製造に用いられているもの

を使用する。

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

AqBE は、2010年に米国において GRAS として認定されている。

2 組換え体の残存に関する事項

AqBE 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15）。また、pUAQ2 に由来する DNA 断片は、サザンハイブリダイゼーション分析を行った結果、検出されなかった（参照12）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AqBE は、JECFA の食品用酵素剤に対する一般規格を満たしている。また、AqBE を用いた亜急性毒性試験、変異原性試験及び染色体異常試験を行った結果、被験物質に関連した異常が認められなかったことから、製造に由来する非有効成分の安全性に問題がないと考えられる。

4 精製方法及びその効果に関する事項

AqBE の精製方法及びその効果は明らかであり、有害物質が混入することは考えられない。

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

AqBE の製造原料及び製造方法は従来食品用酵素の製造に使用されているものであり、AqBE は、JECFA の食品用酵素剤の純度規格を満たしている。

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事項

第7の3に係る安全性確認のため、AqBE を用いた亜急性毒性試験、変異原性試験及び染色体異常試験結果の確認を行った。

(1) 亜急性毒性試験

SD ラット（1群雌雄各10匹）を用いて13週間反復強制経口投与試験を行った。AqBE を1.7、5、15 ml/kg 体重/日の用量で投与した。その結果、被験物質の投与に関連した異常は認められなかった（参照16）。

(2) 変異原性試験

Salmonella typhimurium TA98 株、TA100 株、TA1535 株、TA1537 株及び *Escherichia coli* WP2uvrA 株を用いて復帰突然変異試験を行った。AqBE の62~5,000 µg/プレートの範囲（0.71~57.4 µl/プレートの範囲に相当）で5用量とし、S9-mix 存在下及び非存在下で実施した結果、変異原性は認められなかった（参照17）。

(3) 染色体異常試験

チャイニーズハムスターの卵巣細胞（CHO 細胞）を用いて染色体異常試験を行った。S9-mix 存在下及び非存在下で実施した結果、染色体異常は認められなかった（参照18）。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「BR151(pUAQ2)株を利用して生産された6- α -グルカノトランスフェラーゼ」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）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

- 1 IFBC. 1990. Chapter 4: Safety evaluation of foods and food ingredients derived from microorganisms. Regul Toxicol Pharmacol. 12(3, Part 2):S114-S128.
- 2 Deckert, G, Warren, PV, Gaasterland, T, Young, WG, Lonox, AL, Graham, DE, Overbeek, R, Snead, MA, Keller, M, Aujay, M, Huber, R, Feldman, RA, Short, JM, Olsen, GJ, Swanson, RV. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. Nature, 1998, 392, 353-358.
- 3 AqBE の既知タンパク質との相同性検索結果（社内報告書）
- 4 実験報告書 AqBE の人工胃液による消化試験（社内報告書）
- 5 実験報告書 AqBE の人工胃液による消化試験：ウェスタンブロッティング法による免疫反応性の検討（社内報告書）
- 6 実験報告書 AqBE の人工腸液による消化試験（社内報告書）
- 7 実験報告書 AqBE の基質存在下における加熱試験（社内報告書）
- 8 AqBE と既知のアレルゲンとの構造相同性検索（社内報告書）
- 9 組換えプラスミド pUAQ2 におけるオープンリーディングフレーム（ORF）の検索（社内報告書）
- 10 Sadaie, Y., Burtis, K. C., Doi, R. H. Purification and characterization of a kanamycin nucleotidyltransferase from plasmid pUB110-carrying cells of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 1980, 141, 1178-1182.
- 11 Brouns, S. J., Wu, H., Akerboom, J., Turnbull, A. P., de Vos, W. M., van der Oost, J. Engineering a selectable marker for hyperthermophiles. J Biol Chem, 2005, 280, 11422-11431
- 12 実験報告書 ブランチングエンザイム（AqBE）製剤中の組換え DNA の分析（社内報告書）
- 13 食品衛生調査会バイオテクノロジー特別部会 部会長 首藤 紘一，平成12年12月25日，食調第84号，組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査に関する部会報告書
- 14 薬事・食品衛生審議会食品衛生分科会食品衛生バイオテクノロジー部会 会長 首藤 紘一，平成13年12月17日，薬食審第298号，組換え DNA 技術応用食品及び添加物の安全性審査に関する部会報告書
- 15 試験成績書 AqBE（社内報告書）

- 16 最終報告書 BE-02のラットにおける13週間反復給餌による発がん試験の結果報告書 7
- 17 Bacterial reverse mutation test with BE-02 (社内報告書) 7
- 18 Chromosomal aberration test with BE-02 in cultured CHO cells (社内報告書) 7