

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）
既存添加物の安全性確保のための規格基準設定に関する研究
（H26-食品-一般-001）

平成26～28年度分担総合研究報告書
既存添加物の基原の解析に関する検討

研究分担者 穰山 浩 国立医薬品食品衛生研究所 食品部長

要旨 既存添加物の基原に由来する遺伝子の塩基配列情報を指標にして、国際塩基配列データベースとの照合結果から種を同定あるいは推定する方法について検討した。既存添加物酵素67品目の微生物由来の基原について、指標となる遺伝子が国際塩基配列データベースに登録されているかどうか調査し情報を整理した。また既存添加物酵素「アルギン酸リアーゼ」の生産菌*Flavobacterium multivorum*について、検討したDNAを指標にした同定法を実施したところ、*Flavobacterium*属の新種の可能性が高い*Flavobacterium* sp.と推定された。

研究協力者

西崎雄三 国立医薬品食品衛生研究所
杉本直樹 国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

平成7年に食品衛生法が改正された際に流通実態のあった天然添加物のうち、一般飲食物添加物及び天然香料以外のものを、既存添加物と呼ぶ。長い食経験があり、一般に安全と見なされている既存添加物の規格を整備する上で、基原（由来）を明確に設定することは、想定外の原料、すなわち食品衛生法改正時に使用されていなかった原料が使用されることを防ぐ目的があり、食の安全を保障する上で重要である。

既存添加物のうち、第9版公定書に収載される酵素67品目の基原のほとんどは、微生物由来であり、また属までしか明らかにされていないものも見受けられる。特に微生物の学名は、専門家による最新の研究によって見解が変わることも多く、流動的であるため、法的拘束力をもつ公定書を運用する上では、学名の変更履歴をたどれるようなトレーサビリティを有した情報に基づいて、同定を行うことが望ましい。そこで、微生物の分類において、必須の項目となりつつある、遺伝子を指標にした分類法について、既存添加物酵素の微生物基原の同定に応用可能か検討することにした。

遺伝子を指標にした同定法では、基原に由来する任意の指標遺伝子の塩基配列情報を取得した後、国際塩基配列データベースと照合する。米国生物学情報センター（NCBI; National Center of Biotechnology Information）が提供するTaxonomyデータベースでは、国際塩基配列データベースに登録されている塩基配列に由来する生物種の学名の旧名と現行名を管理しているため、遺伝子を指標にした同定法を実施すれば、NCBI Taxonomyを参考にして、流動的である微生物の学名に付随する成分規格上の齟齬の問題を解消できる。さらに、従来法である形態観察及び生理・生化学性状試験では種を特定できなかった基原についても、塩基配列情報という、客観的かつ再現性の高い情報を指標にすれば、一義的に種を同定することも期待できる。

そこで、本研究では既存添加物酵素67品目の微生物由来の基原について、指標となる遺伝子が国際塩基配列データベースに登録されているかどうか調査し情報を整理した。また既存添加物酵素「アルギン酸リアーゼ」の生産菌*Flavobacterium multivorum*について、検討した同定法を実施したので報告する。

B. 研究方法

B-1) 国際塩基配列データベース上の既存添加

物の基原由来の塩基配列情報の取得

第9版公定書に収載される既存添加物酵素の微生物由来の基原について、公定書に記された学名を NCBI が提供する塩基配列データベース GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) に入力し、16S rDNA または ITS1 配列の登録の有無を確認した。

B-2) アルギン酸リアーゼ生産菌の 16S rDNA 塩基配列情報の取得

日本食品添加物協会から供与されたアルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株から抽出した DNA を鋳型として、ユニバーサルプライマーを用いて 1,439 bp の 16S rDNA を増幅し、シーケンスし、塩基配列を決定した。

C. 研究及び考察

C-1) 既存添加物酵素の基原由来塩基配列情報の取得

既存添加物酵素の微生物由来の基原について、「細菌」、「放線菌」、「糸状菌」、「酵母」、「担子菌」の5つの群に分類し、各群に適した指標遺伝子について考察した。種々の公定法や文献を参考にして、「細菌」及び「放線菌」は、16S rDNA 塩基配列を指標とし、「糸状菌」、「酵母」及び「担子菌」は ITS1 塩基配列を指標とした。属及び sp. で定義された以外の基原について、国際塩基配列データベース GenBank に指標遺伝子が登録されているかどうか調査した。その結果、「細菌」52/56 基原、「放線菌」17/19 基原、「糸状菌」57/65 基原、「酵母」6/6 基原、「担子菌」6/6 基原の配列が登録されていた。配列が登録されていなかった基原の中には、トレーサビリティの得られない学名、すなわち公定書に記載する基原としてふさわしくない学名であるものが散見された。

C-2) アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株の種の同定

細菌に属すアルギン酸リアーゼの生産菌 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を決定し、国際塩基配列データベースに対して blastn による相同性検索を行った。検索結果の上位 20 配列中には

Flavobacterium 属由来の塩基配列が占めた。一方で、細菌において、同種の目安とされる相同値が 98.7% 以上の 16S rDNA 塩基配列は、存在しなかった。

次に、*Flavobacterium* 属各種の 16S rDNA 塩基配列と 71/58 株の 16S rDNA 塩基配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、71/58 株は *Flavobacterium* 属の種で形成されるクラスター内に含まれたが、いずれの既知種とも異なる分子系統学的位置を示し (Fig. 1), *Flavobacterium* 属の新種を構成する可能性が高いと考えられ、71/58 株を *Flavobacterium* sp. と同定した。

微生物などの学名が流動的である基原に対して規格を整備するためには、統一された方法、指針に基づいて情報を整理する必要がある。検討した DNA を指標にした同定法を実施した場合、アルギン酸リアーゼ生産菌 71/58 株のように、第9版公定書に記された基原の学名について、第10版で大幅な改正が求められる可能性がある。このような問題も含めて、今後 DNA を指標にした同定法について深く議論していく必要がある。

D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

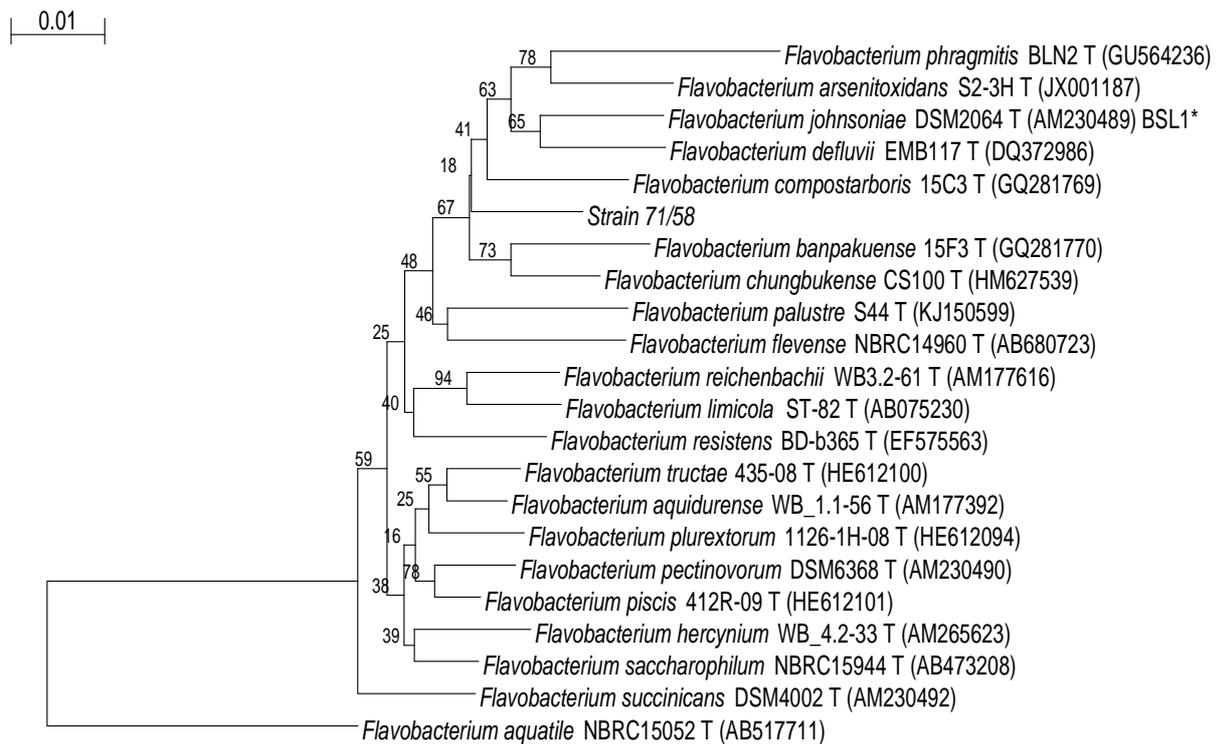


Fig. 1 BLAST 検索により近縁と考えられた *Flavobacterium* 属の既知種上位 20 種と 71/58 株の 16S rDNA に基づく分子系統樹.

左上の線はスケールバー、系統枝の分岐に位置する数字はブートストラップ値、株名の末尾の T はその種の基準株 (Type strain)、BSL はバイオセーフティレベル (BSL1*(日和見病原体)以上を表記) を示す.