

**組換え DNA 技術応用飼料添加物の  
安全性確認**

*Komagataella pastoris* 132 株を利用し  
て生産されたフィターゼ

令和 2 年 7 月 8 日  
農林水産省消費・安全局  
畜水産安全管理課

## 目次

I	はじめに	2
II	確認対象飼料添加物の概要	2
III	審議内容	3
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
2	組換え体等に関する事項	3
(1)	GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項	3
(2)	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	4
(3)	宿主に関する事項	4
(4)	ベクターに関する事項	5
(5)	挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	6
(6)	組換え体に関する事項	9
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	10
(1)	飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項	10
(2)	飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項	10
4	生産物に関する事項	10
(1)	組換え体の混入を否定する事項	10
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	10
(3)	精製方法及びその効果に関する事項	10
(4)	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	11
(5)	組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項	11
5	2 から 4 までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項	12
IV	審議結果	12
V	参考文献及び参考資料	12

「*Komagataella pastoris* 132 株を利用して生産されたフィターゼ」に係る  
安全性確認

I はじめに

5 「*Komagataella pastoris*132 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「AppA2 フィターゼ」とする。）について、令和元年 10 月 31 日付けで遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」（平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号）に基づき審議を行った。

10 II 確認対象飼料添加物の概要

添加物：*Komagataella pastoris* 132 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：Optiphos®

有効成分概要

一般名	化学名(IUPAC)	EC 番号	CAS 番号	機能
フィターゼ Phytase	<i>myo</i> -inositol- hexakisphosphate 6- phosphohydrolase (6-phytase)	3.1.3.26	9001-89-2	フィチン酸 の分解

15 用途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進、環境負荷を低減

申請者：HUVEPHARMA Japan 株式会社

開発者：HUVEPHARMA EOOD

20 AppA2 フィターゼは、フィチン酸の加水分解を触媒するフィターゼの生産性を高めるため、*Komagataella pastoris* GS115 株（以下、「*K.pastoris* GS115 株」とする。）を宿主として、*Escherichia coli* B 株由来のフィターゼ遺伝子（以下、「*appA2* 遺伝子」とする。）を宿主改変株の染色体へ導入して作成した *Komagataella pastoris* 132 株（以下、「*K. pastoris* 132 株」とする。）により生産されたフィターゼである。

25 日本では、遺伝子組換え微生物により生産されたフィターゼが、これまでに 6 件承認されている。これらのフィターゼのうち 2 件を対象として比較を行なった結果、アミノ酸配列の相同性に関して差異がみられたものの、生化学的性質、活性部位及び立

体構造の比較により、AppA2 フィターゼとの同等性が確認された。

30 また、宿主である *K. pastoris* GS115 株、*appA2* 遺伝子の供与体である *Escherichia coli* B 株及び生産菌である *K.pastoris* 132 株の安全性、製造器材・製造工程の安全性並びに不純物を含めた生産物の安全性について確認したところ、飼料添加物としての安全上の問題となる点は認められなかった。

35 農業資材審議会飼料分科会遺伝子組換え飼料部会における審議の結果、AppA2 フィターゼについて、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき、遺伝子組換え飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

40 なお、*K. pastoris* は、以前は *Pichia pastoris* (以下、*P. pastoris*) と分類されていたが、分子系統解析を用いた *Pichia* 属の再分類により *P. pastoris* を *Pichia* 属から独立させ、新属の *Komagataella* 属に移動する旨の提案に基づき、現在では *K. pastoris* と分類されている。

### III 審議内容

#### 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

45 AppA2 フィターゼは、*K.pastoris* 132 株に導入された *Escherichia coli* B 株由来の遺伝子によって産生される。既存のフィターゼ 2 品目を比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的解析(有効成分、酵素活性)、活性部位のアミノ酸残基の比較、立体構造の比較を実施した。その結果、AppA2 フィターゼが既存のフィターゼと同等と考えるに十分であると確認された。

#### 50 2 組換え体等に関する事項

(1) GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項

55 宿主 *K.pastoris* GS115 株は、分子生物学の研究分野で広く利用されている市販株で、全ゲノム配列が利用可能である。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定におけるバイオセーフティレベル 2 あるいは 3 に相当する病原体等のリストには含まれていない。

60 ベクター及び挿入遺伝子については、分子量及び制限酵素による切断地図等が明らかにされており、既知の有害な塩基配列は含まれておらず、組換え体の外界での安定性が増大するようなものではない。

組換え体の *K.pastoris* 132 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 *K.pastoris* GS115 株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、*K.pastoris* 132株はGILSP組換え体に該当すると考えられた。

65

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

*K. pastoris* 132 株は、飼料添加物フィターゼの生産効率を向上させる目的で利用され、既存の添加物の生産菌と同様の方法で利用される。なお、AppA2フィターゼは、家禽及び豚の飼料に添加することにより、飼料中に含まれるフィチンリンの利用効率を高めることができ、それに伴い排泄物中のリンが減少することにより、リンによる環境負荷を低減することが出来る。

70

(3) 宿主に関する事項

ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

75

学名：*Komagataella pastoris* GS115株（本文中、「*K.pastoris* GS115 株」と記載）

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項（非病原性であること。）

*K. pastoris* GS115 株は、分子生物学の分野で広く利用されている市販株（Invitrogen 社、米国カリフォルニア州）であり、有害生理活性物質を生産するという報告はない。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定におけるバイオセキュリティレベル2 あるいは3 に相当する病原体等のリストには含まれていない。

80

85

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

*K. pastoris*が、家畜等や他の生物に寄生又は定着するという報告はない。

エ ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

*K. pastoris* GS115 株は、バイオセキュリティレベル 1 の微生物のみを取り扱う工場内で閉鎖的に管理されており、病原性の外来因子に汚染されることはない。

90

オ 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

*K. pastoris* は樹木に生息する微生物群の中に存在しており、グルコース及びメタノールの存在下で増殖する能力を有する。宿主であるGS115 株についても同様である。

95

- カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項  
100 *K. pastoris* は窒素飢餓等の限られた条件以外では1倍体にとどまることから、  
遺伝子の伝播や交雑は起こらない。
- キ 飼料に利用された歴史に関する事項  
105 *K. pastoris*自体は、米国において、ブロイラー用のたん白質原料として、10%  
を超えない配合量での使用が認められている。
- ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項  
*K. pastoris* GS115 株の生存及び増殖にはヒスチジンが必須である。
- ケ 類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  
110 *K. pastoris* が属する *Komagataella* 属には、病原性及び有害生理活性物質を  
産生するとの報告はない
- (4) ベクターに関する事項
- ア 名称及び由来に関する事項  
115 *K. pastoris* 132 株の形質転換には、プラスミドpPIC9及びプラスミドpJAZ  
を用いている。
- イ 性質に関する事項
- (ア) DNAの分子量を示す事項  
120 プラスミドpPIC9 の塩基数は8,023 bp、プラスミドpJAZ の塩基数は4,134  
bpである。
- (イ) 制限酵素による切断地図に関する事項  
125 プラスミドpPIC9 及びpJAZの制限酵素による切断地図は明らかになってい  
る。
- (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項  
130 プラスミドpPIC9 及びpJAZ の機能及び性質は明らかであり、既知の有害  
なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。
- ウ 薬剤耐性に関する事項  
プラスミドpPIC9 にはアンピシリン耐性を付与する *AmpR* 遺伝子が、プラスミ

ドpJAZ には*AmpR*遺伝子及びゼオシン耐性を付与する*Sh Ble*遺伝子が組み込まれている。

135

エ 伝達性に関する事項

プラスミドpPIC9及びpJAZ には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

140

オ 宿主依存性に関する事項

プラスミドpPIC9及びpJAZ には*E. coli* 由来の複製起点が含まれているが、*E. coli*以外の菌で複製することは知られていない。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

145

プラスミドpPIC9及びpJAZにそれぞれ*appA2*遺伝子を組み込むことにより発現ベクターpPIC9-MF-*appA2* 及びpJAZ-MF-*appA2* の2種類を作成した。

キ 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

150

発現ベクターpPIC9-MF-*appA2* 及びpJAZ-MF-*appA2*は、電気穿孔法及び選択培地を利用して2段階で順に宿主に導入されている。

また、*K. pastoris* 132株についてillumina及びPacBioによる全シーケンスの解析を行い、挿入位置及びそのコピー数は明らかとなっている。更にコピー数についてはサザンハイブリダイゼーション法によっても確認しており、そのコピー数及び培養中の安定性が維持されることも確認された。

155

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

以下に詳細を示す。

挿入断片	供与体の由来	性質・機能
アルコール酸化酵素遺伝子 ( <i>AOX1</i> 遺伝子) プロモーター	<i>K. pastoris</i>	メタノールの存在下で <i>AOX1</i> 遺伝子の発現を誘導するプロモーターであり、挿入遺伝子の発現誘導に使用される。
$\alpha$ 因子シグナルペプチド配列	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (以下、 <i>S. cerevisiae</i> )	酵母の $\alpha$ 因子を分泌させる。
<i>appA2</i> コーディング領域	<i>E. coli</i> B株	AppA2フィターゼの23～432番目のアミノ酸をコードする。
<i>AOX1</i> 転写終結末端	<i>K. pastoris</i>	<i>AOX1</i> 遺伝子由来の転写を終結させる。

<i>His4</i> 遺伝子	<i>K. pastoris</i>	ヒスチジン欠乏下での増殖を可能とする(組換え株の選択マーカーとして使用)。
<i>AOX1</i> 遺伝子3'領域	<i>K. pastoris</i>	<i>AOX1</i> 遺伝子の下流側にある遺伝子配列で、相同組換えを誘導する。
アンピシリン耐性遺伝子 ( <i>AmpR</i> 遺伝子)	pBR322	$\beta$ ラクタマーゼをコードする遺伝子で、アンピシリンの加水分解を触媒し、 <i>E. coli</i> にアンピシリン耐性を付与する(本遺伝子は、原核生物由来のプロモーターにより発現が支配されているため、 <i>K. pastoris</i> 132株細胞内では発現しない)。
大腸菌クローニングベクター (pBR322) 複製開始点	—	<i>E. coli</i> 中でベクターの複製開始点として機能する。
ゼオシン耐性遺伝子 ( <i>Sh ble</i> 遺伝子) *1	<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> (以下、 <i>S. hindustanus</i> )	産生するたん白質がゼオシンと結合することにより、ゼオシンとDNAの結合を阻害することで、宿主にゼオシン耐性を付与する(組換え株の選択マーカーとして使用)。
Translation elongation factor 1a ( <i>TEF</i> )プロモーター *2	<i>Ashbya gossypii</i> (以下、 <i>A. gossypii</i> ) *3	挿入された <i>Sh ble</i> 遺伝子を常時発現させる。
<i>TEF</i> 終結終了配列	<i>A. gossypii</i>	挿入された <i>Sh ble</i> 遺伝子の転写を停止させる。

160

## イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

## (ア) ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

2.4. (カ) に記載のとおり、pPIC9プラスミド及びpJAZプラスミドにそれぞれ *appA2* 遺伝子を組み込むことにより発現ベクター pPIC9-MF-*appA2* 及び pJAZ-MF-*appA2* の2種類を作成した。pPIC9プラスミドには、まず目的のフィターゼの細胞外への分泌効率を上げるため、 $\alpha$ 因子シグナルペプチド配列を挿入し、更に *appA2* 遺伝子を挿入した。pJAZプラスミドには、 $\alpha$ 因子シグナルペプチド配列と *appA2* 遺伝子を融合させた物を化学合成し、ライゲーションすることで挿入した。

165

170

## (イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

宿主 *K. pastoris* GS115 株への発現ベクター pPIC9-MF-*appA2* 及び pJAZ-MF-*appA2* の挿入は、2段階で行われている。いずれも、電気穿孔法を用いてベクターを導入し、相同組み換えによりゲノムに導入された。



- 175 ウ 構造に関する事項  
(ア) プロモーターに関する事項  
α因子シグナルペプチド配列とAppA2 フィターゼの発現は、*K. pastoris*由来のメタノール誘発性アルコール酸化酵素遺伝子 (*AOX1*) プロモーターにより制御されている。
- 180 (イ) ターミネーターに関する事項  
α因子シグナルペプチド配列と *appA2* コーディング領域のターミネーターは、*K. pastoris* 由来の *AOX1* 遺伝子のターミネーター配列である。
- 185 (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項  
挿入DNAの配列には、既知の病原性又は感染性をコードする配列を含まない。
- エ 性質に関する事項  
(ア) 挿入DNAの機能に関する事項  
190 *K. pastoris* GS115 株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAからAppA2 フィターゼが産生される。
- (イ) DNAの分子量を示す事項  
挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている。
- 195 (ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項  
*K. pastoris* GS115 株に導入された遺伝子の制限酵素による切断地図は明らかとなっている。また、導入された遺伝子のコピー数は明らかとなっている。
- 200 オ 純度に関する事項  
各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は明らかとなっている。また、発現プラスミドは構築の各操作段階でクローン化され、塩基配列及び大きさを確認している。
- 205 カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項  
使用した抗生物質耐性マーカー遺伝子等は、*His4* 遺伝子と *Sh ble* 遺伝子であり、*His4* 遺伝子はヒスチジン非存在下での増殖を可能とさせる遺伝子である。また、*Sh ble* 遺伝子は、ゼオシン存在下における増殖を可能とさせるが、生産培養時に

210 はゼオシンは添加していない。また、導入ベクターに存在する*AmpR*遺伝子はアンピリシン耐性遺伝子であるが、原核生物由来のプロモーターで発現が支配されているため、*K. pastoris* 132株の細胞内では発現しない。

キ オープンリーディングフレーム (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

215 生産菌*K. pastoris* 132株の挿入遺伝子の近傍配列について、ORFfinderを用いてORF検索を行った。確認されたORFにおいて、UniProtKB/Swiss-Prot をデータベースとしたSmartBlast 検索及びBLASTp 検索を行ったところ、既知のタンパク質と相同性を示したものもあったが、それらのタンパク質が有害作用をもつという文献及び報告はなく、有害性は確認されなかった。

220 (6) 組換え体に関する事項

ア 組換えDNA操作により新たに獲得された性質に関する事項 (非病原性であること。)

225 *K. pastoris* 132 株は、AppA2フィターゼ 生成能とともに、ヒスチジン欠乏及びゼオシン存在下での増殖能を獲得しているが、いずれの表現型も本来の*K.pastoris* GS115 株の非病原性に変更を加えるものではない。なお、*K. pastoris* 132株には、pPIC-MF-appA2 及びpJAZ-MF-appA2 由来の*AmpR*遺伝子及び*E. coli* 由来の遺伝子断片も挿入されている。*AmpR*遺伝子については、原生生物由来のプロモーターで発現が支配されているため、*K. pastoris* 等の酵母では発現しない。また、*E. coli* 由来の遺伝子断片についても、*K. pastoris* 等の  
230 真核生物では機能しないと考えられ、発現しても有害性はないと考えられる。

イ 宿主との差異に関する事項

235 *K. pastoris* 132 株には、*appA2* 遺伝子を含むカセットを導入することにより AppA2 フィターゼの生成能が付与されるとともに、ヒスチジン欠乏及びゼオシン存在下における増殖能が付与されているが、これら以外には、宿主である*K. pastoris* G115 株との差異はない。

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

240 *K. pastoris* 132株と*K. pastoris* GS115 株の外界における生存性及び増殖性に相違はない。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

生産菌である*K. pastoris* 132株は、宿主である*K. pastoris* GS115株とは異なる

り、ヒスチジン欠乏下での増殖能が付与されている。

245

オ 不活化法に関する事項

製造工程中で回収された*K. pastoris* 132 株については、水酸化ナトリウムを用いてアルカリ化 (pH10) したのち、オートクレーブ処理 (120°C、45 分間) を行って滅菌し、不活化する。

250

3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

(1) 飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項

AppA2フィターゼの製造に用いられる製造原料は、いずれも食品及び飼料に使用される品質のものである。

255

(2) 飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項

AppA2フィターゼの製造に用いる製造器材は、いずれも飼料添加物の製造に長年安全に使用された実績があり、その製造工程はFCA (Feed Chain Alliance) 認証を受けている。

260

4 生産物に関する事項

(1) 組換え体の混入を否定する事項

AppA2フィターゼ製造用原体中に、*K. pastoris* 132 株由来の残存ゲノムが含まれていないことは、*AOX1*遺伝子、*appA2*遺伝子及び*AmpR*遺伝子指標としたPCR 解析により確認されている。さらに、選択培地により*K. pastoris* 132株の増殖がないことも確認している。

265

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

AppA2フィターゼの製造用原体3ロットについて、重金属及びカビ毒等を分析し、飼料添加物成分規格の基準値に適合していることを確認している。

270

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

生産培養終了後、遠心分離又はろ過により培養液の菌体を除去し、精製工程で得られたろ液を濃縮し、さらにろ過滅菌により濃縮液中の沈殿物を除去する。さらにPCR 解析により、最終製品中に*K. pastoris* 132 株が有している組換え遺伝子は含まれていないことを確認している。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析により純度は91%以上であることを確認した。

275

(4) 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資料

280

AppA2フィターゼ製造用原体3 ロットについて、飼料添加物の成分規格への適合性を確認した結果、酵素力単位、物理・化学的性質、純度試験、乾燥減量及び強熱残分のいずれも規格値の範囲内であったことから、常成分の変動範囲も従来の飼料添加物と同等であると考えられる。なお、これまでの製造実績において、有害性が示唆される常成分に関する事例はない。

285

(5) 組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項

以下に外国における認可状況を示す（2018年11月時点）。

地域	国名	承認日
EU	EU 域内の 28 ヶ国	2012 年 2 月
		2016 年 3 月（種豚の追加）
		2017 年 12 月（魚の追加）
EU 以外の欧州	スイス	2012 年 10 月 17 日
	ウクライナ	2014 年 7 月 21 日
北アメリカ	米国	2005 年 7 月 25 日
	カナダ	2012 年 10 月 3 日
中南米	アルゼンチン	2013 年 10 月 9 日
	エクアドル	2015 年 9 月 2 日
	エルサルバドル	2012 年 5 月 11 日
	グアテマラ	2016 年 7 月 13 日
	コスタリカ	2010 年 3 月 4 日
	コロンビア	2009 年 10 月 5 日
	チリ	2011 年 8 月 12 日
	ドミニカ	2009 年 11 月 19 日
	ニカラグア	2010 年 10 月 5 日
	パナマ	2009 年 6 月 8 日
	ブラジル	2013 年 11 月 1 日
	ペルー	2009 年 12 月 29 日

	ボリビア	2015年5月5日
	ホンジュラス	2010年10月5日
	メキシコ	2010年8月20日
オセアニア	オーストラリア	2013年11月5日
	タイ	2009年1月8日
	トルコ	2012年2月7日
	フィリピン	2009年12月19日
	ベトナム	2017年6月27日
	ヨルダン	2016年11月15日
アフリカ	エジプト	2017年8月13日

- 290 5 2から4までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項該当しない。

#### IV 審議結果

- 295 *K. pastoris* 132株を利用して生産されたフィターゼについて、「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

#### V 参考文献及び参考資料

300

##### 参考文献

- 305 [1] European Commission: Commission Implementing Regulation (EU) No 98/2012 of 7 February 2012, concerning the authorisation of 6-phytase (EC 3.1.3.26) produced by *Pichia pastoris* (DSM 23036) as a feed additive for chickens and turkeys for fattening, chickens reared for laying, turkeys reared for breeding, laying hens, other avian species for fattening and laying, weaned piglets, pigs for fattening and sows (holder of authorisation Huvepharma AD), Official Journal of the European Union, L 35/6, 2012.
- 310 [2] Y. Yamada, M. Matsuda, K. MAEDA and K. Mikata: The Phylogenetic Relationships of Methanol-assimilating Yeasts Based on the Partial Sequences of 18S and 26S Ribosomal RNAs: The Proposal of *Komagataella* Gen. Nov.

(Saccharomycetaceae), Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 59, 439-444, 1995.

- 315 [3] C. Kurtzman, J.W. Fell and T. Boekhout: The Yeasts 5th Edition, Elsevier Science, 2011.
- [4] European Commission: European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Annex I: List of additives, Edition 11/2019 (277), 2019.
- 320 [5] European Union: Commission Implementing Regulation (EU) 2016/348 of 10 March 2016, Amending Implementing Regulation (EU) No 98/2012 as regards the minimum content of the preparation of 6-phytase (EC 3.1.3.26) produced by *Komagataella pastoris* (DSM 23036) as a feed additive for pigs for fattening (holder of authorisation Huvepharma EOOD), Official Journal of the European Union, L 65, 56, 2016.
- 325 [6] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) : SCIENTIFIC OPINION Scientific Opinion on Ronozyme® P (6-phytase) as feed additive for chickens and turkeys for fattening, laying hens, and piglets (weaned), pigs, for fattening and sows (poultry and pigs) EFSA Journal 8(10), 1862, 2010.
- 330 [7] The FEEDAP Panel and the GMO Panel: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed and the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the safety and efficacy of the enzymatic preparation Phyzyme XP (6- Phytase) for use as feed additive for chickens for fattening, EFSA Journal 350, 1-14, 2006.
- 335 [8] UniProt: UniProtKB - Q6RK08 (Q6RK08 ECOLX). (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6RK08>)
- [9] UniProt: UniProtKB - Q96VH9 (Q96VH9 9HOMO). (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q96VH9>)
- 340 [10] UniProt: UniProtKB - P07102 (PPA ECOLI). (<https://www.uniprot.org/uniprot/P07102>)
- [11] 一般社団法人 日本科学飼料協会: 飼料添加物の成分規格及び評価基準等収載書 第二版, 2019.
- 345 [12] E. Rodriguez, Y. Han and X.G. Lei: Cloning, Sequencing, and Expression of an *Escherichia coli* Acid Phosphatase/Phytase Gene (*appA2*) Isolated from Pig Colon, Biochemical and Biophysical Research Communications 257, 117–123, 1999.

- [13] S.F. Lassen, J. Breinholt, P.R. Østergaard, R. Brugger, A. Bischoff, M. Wyss and C.C. Fuglsang: Expression, Gene Cloning, and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*, Applied and Environmental Microbiology, Oct. 4701-4707, Oct., 2001.
- 350
- [14] D. Lim, S. Golovan, C.W. Forsberg and Z. Jia: Crystal Structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate, Nature Structural Biology, 7 (2), 108-113, 2000.
- 355
- [15] P.B. Pillai, T. O'Connor-Dennie, C.M. Owens and J.L. Emmert: Efficacy of an *Escherichia coli* Phytase in Broilers Fed Adequate or Reduced Phosphorus Diets and Its Effect on Carcass Characteristics, Poultry Science 85:1737–1745, 2006.
- [16] A.L. Shaw, J.P. Blake and E.T. Moran Jr.: Evaluation of Commercial Phytases on Performance and Skeletal Strength of Two Broiler Strains, Journal of Poultry Science, 48: 47-50, 2011.
- 360
- [17] C.K. Jones, M.D. Tokach, S.S. Dritz, B.W. Ratliff, N.L. Horn, R.D. Goodband, J.M. DeRouchey, R.C. Sulabo and J.L. Nelssen: Efficacy of different commercial phytase enzymes and development of an available phosphorus release curve for *Escherichia coli*-derived phytases in nursery pigs, Journal of Animal Science, 88: 3631–3644, 2010.
- 365
- [18] National Center for Biotechnology Information (NCBI): Taxonomy – *Komagataella phaffii* (strain GS115 / ATCC 20864), (Yeast) (*Pichia pastoris*).
- [19] 国立感染症研究所：国立感染症研究所病原体等安全性管理規定，別冊 1 「病原体等の BSL 分類等」，2010.
- 370
- [20] U.S. Food and Drug Administration: Electronic Code of Federal Regulations, Title 21, Chapter I, Subchapter E, Part 573, Subpart B, § 573.750, *Pichia pastoris* dried yeast, 1993.
- [21] EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ): Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 6, suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2017, EFSA Journal, 15 (7) 4884, 2017.
- 375
- [22] J.M. Cregg, K.J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden: *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations, Molecular and Cellular Biology, 5, 3376-3385, 1985.
- 380
- [23] M.T. Chen, S. Lin, I. Shandil, D. Andrews, T.A Stadheim and B.K. Choi:

- Generation of diploid *Pichia pastoris* strains by mating and their application for recombinant protein production, Microbial Cell Factories, 11:91, 2012.
- 385 [24] U. S. Food and Drug Administration: Listing of Color Additives Exempt from Certification; Soy Leghemoglobin, 21 CFR part 73, 2019.
- [25] 食品安全委員会：遺伝子組み換え食品等評価書 PRF 株を利用して生産されたホスホリパーゼ C, 2017.
- [26] Snapgene: [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast\\_plasmids&plasmid=pPIC9](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=yeast_plasmids&plasmid=pPIC9)
- 390 [27] Snapgene: <https://s3.amazonaws.com/biogrammatic-site/vector+maps/pJAZ.dna>
- [28] Meredith H. Prysak, Christopher J. Mozdierz, Angela M. Cook, Ling Zhu, Yonglong Zhang, Masayori Inouye and Nancy A. Woychik: Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage, Molecular Microbiology, 71, 1071–1087, 2009.
- 395 [29] Nenad Ban, Poul Nissen, Jeffrey Hansen, Peter B. Moore and Thomas A. Steitz: The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution, SCIENCE, 905-920, 2000.
- 400 [30] National Center for Biotechnology Information (NCBI) : Taxonomy Browser  
([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=2017&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log\\_op=lineage\\_toggle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=2017&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle))
- 405 [31] National Center for Biotechnology Information (NCBI): Taxonomy Browser  
([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=284811&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log\\_op=lineage\\_toggle](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=284811&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=f&log_op=lineage_toggle))
- [32] S. Steiner and P. Philippsen: Sequence and promoter analysis of the highly expressed *TEF* gene of the filamentous fungus *Ashby gossypii*, Mol Gen Genet, 242, 263-271, 1994.
- 410 [33] Y. D-Li, A. Awati, H. Schulze and G. Partridge: Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors, Journal of the Science of Food and Agriculture, 95: 878-896, 2014.
- 415 [34] Life Technologies Corporation: *Pichia* Expression Kit for expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, 2014.



- [35] 一般社団法人 日本科学飼料協会: 飼料安全法関係通知集 第九版, 2018.
- 420 [36] European Commission: Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council of 7 May 2002 on undesirable substances in animal feed, 2002.
- [37] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) and Panel on Genetically Modified Organisms (GMO) : SCIENTIFIC OPINION, Scientific Opinion on the safety and efficacy of Optiphos® (6-phytase) as a feed additive for chickens and turkeys for fattening, chickens reared for laying, turkeys reared for breeding, laying hens, other birds for fattening and laying, weaned piglets, pigs for fattening and sows, EFSA Journal 2011, 9 (11): 2414, 2011.
- 425 [38] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) : Safety and efficacy of OPTIPHOS® (6-phytase) as a feed additive for finfish, EFSA Journal 2017;15 (4):4763, 2017.
- 430 [39] European Union: COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2017/2274 of 8 December 2017 concerning the authorisation of a new use of a preparation of 6-phytase (EC 3.1.3.26) produced by *Komagataella pastoris* (DSM 23036) as a feed additive for fish (holder of authorisation Huvepharma EOOD), Official Journal of the European Union, 326, 44, 2017.
- 435 [40] Association of American Feed Control Officials : Official Publication, 2016.

#### 添付資料

- 440 [1] EMBOSS Needle ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/))による AppA2、AppA および PhyA のアミノ酸配列の相同性の比較
- [2] J. Dias: Efficacy of supplemental phytase (OptiPhos 8000 L) on the growth performance, phosphorus digestibility and bone ash content of rainbow trout fed plant protein-rich diets, SPAROS Lda., 2016.
- 445 [3] Cornell Diagnostic Laboratory: Characterisation of the Recipient Microorganism - Amplification of bp 67-1299 of the *appA2* Phytase gene, 2002.
- [4] bisy GmbH: Genome characterization of *Komagataella pastoris* strain “*K. pastoris* 132”, 2020.
- [5] Cornell Diagnostic Laboratory: Characterisation of *E. coli* Isolate (Pig Colon) used as source of Cloned *appA2* phytase Gene, 2002.
- 450 [6] Annotated sequence of the reconstructed pPIC-MF-appA2 vector used

for transformation.

[7] pPIC9-MF-appA2 の ORF 調査, 2020.

455

[8] Annotated sequence of the reconstructed pJAZ-MF-appA2 vector used for transformation.

[9] pJAZ-MF-appA2 の ORF 調査, 2020.

[10] Biovet: Study Report on the *in vitro* digestibility of OptiPhos.

[11] 第 3 染色体の ORF 調査, 2020.

[12] 第 4 染色体の ORF 調査, 2020.

460

[13] BIOCOM: Feed Chain Alliance (FCA) Standard 2006.

[14] Samir I. Naimov: Qualitative and Quantitative Determination of DNA in OPTIPHOS Concentrate, 2009.

[15] Samir I. Naimov: Qualitative and Quantitative Determination of Residual Recombinant DNA in OPTIPHOS Concentrate Batch# C435190206001, 2019.

465

[16] S. Galabova: Testing for Presence of Viable Yeast in Optiphos Dry Concentrate, 2010.

[17] TLR International Laboratpries: Analytical Report, 2015.

[18] Biovet: Protocol from Microbiological Test, 2009.

470

[19] Biovet: Study on the acute peroral toxicity of Optiphos WSP (Huvepharma) in albino rats (Fischer - 344), 2014.

[20] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate 90-Day Toxicity Study with 28-Day Recovery in Rats FINAL REPORT, 2008.

[21] Research Institute for Organic Synthese, Inc.: FINAL REPORT OPTIPHOS Concentrate Bacterial Reverse Mutation Test, 2009.

475

[22] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate *in Vitro* Chromosomal Aberration Test, 2009.

[23] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate Micronucleus Test *in vivo* in Rats, 2009.

480

[24] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate, Skin Irritation Test in Rabbits, 2009.

[25] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate, Ocular Irritation Test in Rabbits, 2009.

485

[26] Biotest s.r.o.: OPTIPHOS Concentrate Skin Sensitization Test in Guinea Pig, 2009.

[27] ILVO Animal Science Unit: Optiphos in broiler chickens: zootechnical

trial, 2008.

- 490 [28] KAPOSVÁR UNIVERSITY FACULTY OF ANIMAL SCIENCE,  
Department of Animal Nutrition: Research Report (Project No.: Huvepharma  
2009/05), Effect and tolerance of Optiphos phytase supplementation on the  
performance of layers, 2009.
- [29] Schothorst Feed Research: The Efficacy and Tolerance of Optiphos™  
4000 in Weaned Piglets, 2009.
- 495 [30] Schothorst Feed Research: The Efficacy and Tolerance of Optiphos®  
4000 in Growing/Finishing pigs, 2009.
- [31] Sparos Ltd.: Effect of phytase (OptiPhos 8000 L) supplementation on  
the growth performance, digestibility and tolerance to high doses in rainbow  
trout fed plant protein-rich diets, 2017.
- [32] Huvepharma: Analysis of the purified OptiPhos, 2019.
- 500 [33] 一般財団法人日本食品分析センター: 試験報告書 第 17124965007-0101 号,  
2017.
- [34] FDA/CVM: No objection letter, 2005.
- [35] Canadian Food Inspection Agency (CFIA): Re: Applications for feed  
registration, 2012.

505