

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

Trichoderma reesei RF8694 株を利用し
て生産されたフィターゼ

令和 4 年 7 月 29 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	3
II	確認対象飼料添加物の概要	3
III	審議内容.....	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項.....	4
2	組換え体等に関する事項	4
	（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.....	4
	（2）組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	5
	（3）宿主に関する事項	5
	（4）ベクターに関する事項	6
	（5）挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	8
	（6）組換え体に関する事項	11
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	11
	（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..	11
	（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..	12
4	生産物に関する事項	12
	（1）組換え体の混入を否定する事項.....	12
	（2）製造に由来する不純物の安全性に関する事項	12
	（3）精製方法及びその効果に関する事項.....	12
	（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.....	12
	（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	12
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.....	13
IV	審議結果.....	13
V	参考文献及び参考資料.....	13

「*Trichoderma reesei* RF8694 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

「*Trichoderma reesei* RF8694 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「QPT2 フィターゼ」とする。）について、令和 4 年 1 月 19 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。

II 確認対象飼料添加物の概要

添加物：*Trichoderma reesei* RF8694 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：Quantum Blue®

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

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：AB Agri Limited. 日本支社

開発者：AB Agri Limited.

QPT2 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、*Trichoderma reesei* RF7727 株（以下、「*T.reesei* RF7727 株」とする。）を宿主として、*Escherichia coli* 由来のフィターゼ遺伝子に変異を導入して得られた *qpt2* 遺伝子を宿主改変株の染色体へ導入して作成した *Trichoderma reesei* RF8694 株（以下、「*T.reesei* RF8694 株」とする。）により生産されたフィターゼである。

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7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、アミノ酸配列において相同性が94.4~95.9%と高く、QPT2 フィターゼとの同等性が確認された。

また、宿主である *T.reesei* RF7727 株、*qpt2* 遺伝子の供与体である *Escherichia coli* 株及び生産菌である *T.reesei* RF8694 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。

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、QPT2 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。

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

QPT2 フィターゼは、*Trichoderma reesei* RF7727 株に導入された *Escherichia coli* 由来の遺伝子によって産生される。既存のフィターゼを比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的性質（有効成分、酵素活性）の比較を実施した。その結果、アミノ酸配列の相同性は94.4~95.9%と高く、生化学的性質に多少の違いはあるが、QPT2 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。

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

宿主 *T.reesei* RF7727 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。

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 *T.reesei* RF8694株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 *T.reesei* RF7727株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、*T.reesei* RF8694株はGILSP組換え体に該当すると考えられた。

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

T.reesei RF8694 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、QPT2フィターゼは、豚、家禽（鶏及びウズラ）及び養殖水産動物用配合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。

(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

学名：*Trichoderma reesei* RF7727 株（本文中、「*T.reesei* RF7727 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

*T. reesei*は飼料添加物及び食品添加物酵素の製造において主にセルラーゼ生産菌として広く使用されている糸状菌であり、その安全性が知られている。

また米国環境保護庁(EPA)は、*T.reesei* RF7727 株の由来である *T. reesei* QM6a株の安全性について評価を行っており、標準的な工業レベルの酵素生産において毒性物質を産生することはないと報告している（Federal Register, 2012）。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

T.reesei が、哺乳動物に対して寄生性又は定着性を持つとの報告はない。

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

T.reesei RF7727 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。

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

T. reesei は木材腐朽菌であり、セルラーゼ及びキシラナーゼ等を産生することによって木材中のセルロースやヘミセルロースを分解し、栄養源としている。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

*T. reesei*は有性生殖を行う子のう菌 *Hypocrea jecorina*の無性世代であることが知られている (Kuhls *et al.*, 1996)。またEPAは、*T. reesei* QM6a株の安全性についての評価において、交雑性についての安全性の懸念はないとしている (Federal Register, 2012)。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

T. reesei は、セルラーゼ等の生産菌として広く利用されている。また *T. reesei*は自然環境中に常在し、家畜は一般的に曝露していると考えられることから、家畜が摂取しても健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

T. reesei RF7727株の生存及び増殖能力を制限する条件は、野生型の条件と変わらない。

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

*Trichoderma*属についてはヒトへの病原性を持つ種が報告されているが、免疫不全の患者への日和見感染に限られており (Schuster and Schmoll, 2010)、*T. reesei*についてはこうした報告はなされていない。また一部の *Trichoderma* 属について、マイコトキシンの産生が報告されているが (Keswani *et al.*, 2014、Anitha and Murugesan, 2005)、*T. reesei*についてはこうした報告はなされていない。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

T. reesei RF7727株の形質転換には、導入用プラスミド pAB600を用いている。また *qpt2*遺伝子の導入には pAB600-QPT2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

pAB600の塩基数は4,583 bpである。pAB600-QPT2の塩基数は10,287 bpで

ある。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

pAB600及びpAB600-QPT2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

pAB600及びpAB600-QPT2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

pAB600及びpAB600-QPT2 にはアンピシリン耐性を付与する*AmpR*遺伝子が組み込まれている。

エ 伝達性に関する事項

pAB600及びpAB600-QPT2には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

オ 宿主依存性に関する事項

pAB600及びpAB600-QPT2 の複製には*E. coli* が必要である。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

プラスミドpUC19に*cbh1*遺伝子プロモーターを含むフラグメントをライゲーションすることで、導入用プラスミドpAB600を構築した。またpAB600に*qpt2*遺伝子等をライゲーションさせることで、導入用プラスミドpAB600-QPT2を構築した。

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

発現ベクターは、pAB600-QPT2から調製された発現カセットを用いて*T.reesei*プロトプラストへの形質転換を行った後、選択培地を利用して形質転換体を選抜した。

また、*T.reesei* RF8694株についてilluminaによる全ゲノム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。

(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
<i>cbh1</i> 遺伝子 プロモーター	<i>T. reesei</i> QM6a 株	メタノールの存在下で <i>cbh1</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。
<i>cbh2</i> シグナル配列及び糖鎖結合ドメイン (CBM)	<i>T. reesei</i> Vtt-D-80133 株	31 アミノ酸の <i>cbh2</i> シグナル配列、62 アミノ酸の CBM/リンカー領域からなり、その間に 49bp のイントロン I を有する。5' 末端で <i>cbh1</i> 遺伝子プロモーターに融合し、3' 末端で <i>qpt2</i> 遺伝子に融合する。
Kex II 切断部位	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kex II プロテアーゼが当該部位を認識し、タンパク質を切断する。
<i>qpt2</i> 遺伝子	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i> 酸性ホスファターゼ AppA を基に 17 アミノ酸を置換した QPT2 をコードする。
<i>cbh1</i> 遺伝子ターミネーター	<i>T. reesei</i> QM6a 株	<i>cbh1</i> 遺伝子プロモーターにより発現された遺伝子の転写を終結させる。
<i>amdS</i> 遺伝子プロモーター	<i>A. nidulans</i> VH1-TRSX6 株	<i>amdS</i> 遺伝子の発現を誘導する

挿入断片	供与体の由来	性質・機能
<i>amdS</i> 遺伝子	<i>A. nidulans</i> VH1-TRSX6 株	アセトアミダーゼをコードする遺伝子で、アセトアミドを唯一の窒素源として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>amdS</i> 遺伝子ターミネーター	<i>A. nidulans</i> VH1-TRSX6 株	<i>amdS</i> 遺伝子の転写を終結させる

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、プラスミド pUC19 に *cbh1* 遺伝子プロモーターを含むフラグメントをライゲーションすることで、導入用プラスミド pAB600 を構築した。また pAB600 に *qpt2* 遺伝子等をライゲーションさせることで、導入用プラスミド pAB600-QPT2 を構築した。

（イ）挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

2.（4）キに記載のとおり、発現カセットを用いて、プロトプラスト化した *T. reesei* に形質転換をおこなった。

ウ 構造に関する事項

（ア）プロモーターに関する事項

qpt2 遺伝子のプロモーターは、*T. reesei* QM6a 株由来の *cbh1* 遺伝子のプロモーター配列である。また、*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* 由来の *amdS* 遺伝子のプロモーター配列である。

（イ）ターミネーターに関する事項

qpt2 遺伝子のターミネーターは、*T. reesei* QM6a 株由来の *cbh1* 遺伝子のターミネーター配列である。また、*amdS* 遺伝子のプロモーターは、*A. nidulans* 由来の *amdS* 遺伝子のターミネーター配列である。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

ORF検索を行ったところ、多くのたん白質との相同性が確認されたが、これらたん白質は有害作用を持たないと判断された。

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

T.reesei RF8694株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるたん白質の性質、機能は明らかとなっている。

(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。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

T.reesei RF8694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。

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。

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

pAB600及びpAB600-QPT2には、宿主にアンピシリン耐性を有する*AmpR*遺伝子が含まれているが、発現カセットでは、*AmpR*遺伝子は制限酵素により切断除去されているため、生産菌*T.reesei* RF8694株に*AmpR* 遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子は導入されていない。

キ 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

T. reesei RF8694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、Non-redundant protein sequences (nr) をデータベースとしたBLASTp 検索を行ったところ、既知のたん白質と相同性を示したものもあったが、有害作用を持つことが知られるたん

白質はヒットしなかったことから、これらのORFから想定された、たん白質は有害作用は持たないと判断された。

(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

T. reesei RF8694株は、QPT2フィターゼ 生成能とともに、アセトアミド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*T. reesei*の非病原性に変更を加えるものではない。

イ 宿主との差異に関する事項

T. reesei RF8694 株には、*qpt2*遺伝子を含むカセットを導入することによりQPT2フィターゼの生成能が付与されるとともに、アセトアミドを唯一の窒素源としての増殖を可能とするが、これら以外には、宿主である*T. reesei* RF7727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

生産菌である*T. reesei* RF8694株と*T. reesei*野生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*T. reesei* RF8694株と*T. reesei*野生株の生存及び増殖能力に相違はない。

オ 不活化法に関する事項

製造工程中で回収された*T. reesei* RF8694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℃、45 分間) を行って滅菌し、不活化する。

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

QPT2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。

(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

QPT2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、FAMIQ-S（飼料添加物製造に関する品質安全管理システム）の認証を受けた工場で製造されている。

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

QPT2フィターゼ製造用原体中に、*T. reesei* RF8694 株由来の残存ゲノムが含まれていないことは、*qpt2*遺伝子及び*amdS*遺伝子指標としたPCR 解析により確認されている。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

QPT2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。

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

遠心分離又はろ過による菌体の除去、及び限外ろ過等により、非酵素成分が除去される。さらにPCR 解析により、最終製品中に *T. reesei* RF8694 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。

(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

QPT2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。

(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

2020年12月現在、EU諸国、米国、オーストラリアを含む、世界73か国で承認、販売されている。これらのうち、EUでは、2013年10月にEFSA（European Food Safety Authority）が、豚及び家禽用飼料添加物として安全性への懸念がない旨の評価を行い、2014年3月にEUの指令書において認可されている。ま

た、米国では、AAFCOのOfficial Publicationにも収載されている

- 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

T. reesei RF8694 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続」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

参考文献

- [1] 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 JPAo002 株を利用して生産されたフィターゼ, 2019.
- [2] 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.
- [3] 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 ASP595-1 株を利用して生産されたフィターゼ, 2016.
- [4] 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 MorphΔE8 BP17 4c 株を利用して生産されたフィターゼ, 2018.
- [5] 農林水産省：令和元年 5 月 31 日 農林水産省令第 6 号, 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令, 2019.
- [6] 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 LU17257 株を利用して生産されたフィターゼ, 2019.
- [7] 農林水産省：令和 2 年 1 月 30 日 農林水産省令第 4 号, 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令, 2020.
- [8] 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 Komogataeella pastoris 132 株を利用して生産されたフィターゼ, 2021.
- [9] 農林水産省：令和 3 年 4 月 15 日 農林水産省令第 30 号, 飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令の一部を改正する省令, 2021.
- [10] UniProt: UniProtKB-P07102 (PPA_ECOLI),

<https://www.uniprot.org/uniprot/P07102>

[11] UniProt: UniProtKB - Q6RK08.
(Q6RK08_ECOLX).<https://www.uniprot.org/uniprot/Q6RK08>)

[12] Dersjant-Li Y., Awati A., Schulze H. and Partridge G., Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors, *Journal of Science of Food and Agriculture*, 95, 878-896, 2015.

[13] Morgan N.K., Walk C.L., Bedford M.R., Scholey D.V. and Burton E.J.: Effect of feeding broilers diets differing in susceptible phytate content, *Animal Nutrition*, 2, 33-39, 2016.

[14] Pongmanee K., Kühn I. and Korver D.R.: Effects of phytase supplementation on eggshell and bone quality, and phosphorus and calcium digestibility in laying hens from 25 to 37 wk of age, *Poultry Science*, 99, 2595-2607, 2020.

[15] Kühn I. and Männert K.: Performance and apparent total tract phosphorus and calcium digestibility in grower-finisher pigs fed diets with and without phytase, *Journal of Animal Science*, 90, 143-145, 2012.

[16] ATCC (American Type Culture Collection) : Product Sheet *Trichoderma reesei*(ATCC®13631™),

<https://www.atcc.org/products/all/13631.aspx#documentation>

[17] Nevalainen H., Suominen P. and Taimisto K.: On the safety of *Trichoderma reesei*, *Journal of Biotechnology* 37, 193-200, 1994.

[18] 国立感染症研究所：国立感染症研究所病原体等安全管理規定，別冊 1「病原体等の BSL 分類等」，2010.

[19] Index Fungorum Partnership :
www.indexfungorum.org/names/NamesRecord.asp?RecordID=324906

[20] EPA (Environmental Protection Agency) : Microorganisms; General Exemptions From Reporting Requirements; Revisions to Recipient Organisms Eligible for Tier I and Tier II Exemptions, *Federal Register/Val.* 85, No. 47, 13760-13773, 2020.

[21] Gilbert K.B., Holcomb E.E., Allscheid R.L. and Carrington J.C.: Discovery of new mycoviral genomes within publicly available fungal transcriptomic datasets, 2019.

https://www.researchgate.net/publication/330121149_Discovery_of_New_Mycoviral_Genomes_Within_Publicly_Available_Fungal_Transcriptomic_Datasets

[22] Kuhls K., Lieckfeldt E., Samuels G.J., Kovacs W., Meyer W., Petrini O., Gams W., Börner T. and Kubicek C.P. : Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 7755-7760, 1996. Seidl V., Seibel C., Kubicek C.P. and Schmoll M.: Sexual development in the industrial workhorse *Trichoderma reesei*, PNAS, 106, 13909-13914, 2009.

[23] EPA : Microorganisms; General Exemptions From Reporting Requirements; Revisions to Recipient Organisms Eligible for Tier I and Tier II Exemptions, 2012.

[24] AAFCO (Association of American Feed Control Officials) : Official Publication, 2016.

[25] European Union: Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Edition 10/2020 (288), 2020.

[26] Suh D.H., Becker T.C., Sands J.A. and Montenecourt B.S.: Effects of Temperature on Xylanase Secretion by *Trichoderma reesei*, Biotechnology and Bioengineering, 32, 821-825, 1988.

[27] Hayward T.K., Hamilton J., Templeton D., Jennings E.D., Ruth M., Tholudur A., Mcmillan J.D., Tucker M. and Mohagheghi A.: Enzyme Production, Growth, and Adaptation of *T. reesei* Strains QM9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30 to Conditioned Yellow Poplar Sawdust Hydrolysate, Applied Biochemistry and Biotechnology, 77-79, 293-309, 1999.

[28] Vohra R.M., Shirkot C.K., Dhawan S. and Gupta KG.: Effect of Lignin and Some of its Components on the Production and Activity of Cellulase(s) by *Trichoderma reesei*, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 22, 1497-1500, 1980.

[29] Anitha R. and Murugesan K.: Production of gliotoxin on natural substrates by *Trichoderma virens*, Journal of Basic Microbiology, 45, 12–19, 2005.

[30] Schuster A. and Schmoll M.: Biology and biotechnology of *Trichoderma*: Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 787–799, 2010.

[31] Degenkolb T., Döhrenb Hv., Nielsenc K.F., Samuelsd G.J. and Brückner H.: Recent Advances and Future Prospects in Peptaibiotics, Hydrophobin, and Mycotoxin Research, and Their Importance for Chemotaxonomy of *Trichoderma*

and Hypocrea, Chemistry and Biodiversity, 5, 671-680, 2008.

[32] SnapGene: pUC19.dna (環状 / 2686 bp), 2020.

[33] Pentti M., Nevalainen H., Rätt M., Salminen E. and Knowles J. : A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*, Gene, 61, 155-164, 1987.

[34] Karhunen T., Mäntylä A., Nevalainen H. and Suominen P.L. : High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction, Mol. Gen. Genet., 241, 515-522, 1993.

[35] Corrick C.W., Twomey A.P. and Hynes M.J.: The nucleotide sequence of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans* and the molecular characterization of 5' mutations, Gene, 53, 63-71, 1987.

[36] 農林水産省畜産局長：飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について，昭和63年10月14日 第2050号(令和2年1月13日最終改正)，2021.

[37] 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.

[38] European Commission: Commission Regulation (EU) No 1275/2013 of 6 December 2013, amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for arsenic, cadmium, lead, nitrites, volatile mustard oil and harmful botanical impurities, Official Journal of the European Union, L328, 88-92, 2013.

[39] European Commission: Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding, Official Journal of the European Union, L229, 7-9, 2006.

[40] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific opinion on the efficacy and safety of Quantum® Blue (6-phytase) as a feed additive for poultry (except laying hens) and pigs, EFSA Journal, 11 (10), 3364, 2013.

[41] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP): Scientific Opinion on the safety and efficacy of Quantum® Blue (6-phytase) as a feed additive for laying hens and minor laying poultry species, EFSA Journal, 11 (10), 3433, 2013.

[42] European Commission: Concerning the authorisation of a preparation of 6-

phytase produced by *Trichoderma reesei* (CBS 126897) as a feed additive for poultry, weaned piglets, pigs for fattening and sows (holder of the authorisation ROAL Oy), 2014. Official Journal of the European Union, L87, 90-92, 2014.

添付資料

- [1] Westerdijk Fungal Biodiversity Institute: Declaration of Safe Deposit, 2020 (社内資料)
- [2] Centraalbureau voor Schimmelcultures: Declaration of Safe Deposit, 2010 (社内資料)
- [3] Compute pl/Mw: https://web.expasy.org/cgi-bin/compute_pi/pi_tool (社内資料)
- [4] EMBOSS Needle による QPT2 と AppA 及び AppA2 のアミノ酸配列の相同性の比較, https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ (社内資料)
- [5] AB Enzymes: Research Report No. 211102, To evaluate pH optimum of QUANTUM Blue phytase, 2011 (社内資料)
- [6] AB Enzymes: Research Report No. 212002, To evaluate temperature optimum of QUANTUM Blue, 2012 (社内資料)
- [7] QPT2 フィターゼの活性部位及び結晶構造 (社内資料)
- [8] Pontus Research Ltd.: Efficacy study in trout: Quantum Blue, 2019 (社内資料)
- [9] Westerdijk Fungal Biodiversity Institute: 宿主株の同定, 2020 (社内資料)
- [10] pAB600-QPT2 の塩基配列 (社内資料)
- [11] 発現カセットの塩基配列 (社内資料)
- [12] *T. reesei* RF8694 株上のカセット挿入部位の塩基配列 (社内資料)
- [13] ORF 検索結果 (社内資料)
- [14] AB Agri Ltd.: In silico protease digestion of QPT2 phytase, 2020 (社内資料)
- [15] AB Agri Ltd.: Analysis of the genome of RF8694 (*E. coli* QPT2 phytase production strain) by Southern blot, 2012 (社内資料)
- [16] 外来 ORF 検索結果 (社内資料)
- [17] Inspecta Sertifiointi OY: Certificate No 1495-07 (社内資料)
- [18] Inspecta Sertifiointi OY: Certificate No 2098-05 (社内資料)

- [19] DS Certificering A/S: Certificate (社内資料)
- [20] MicroMol: Establishment and validation of a test system and testing of lots of Phytase enzyme lots for contaminating DNA-traces, 2011. (社内資料)
- [21] MetropoliLab: 分析証明書, 2010. (社内資料)
- [22] Institut Kuhlmann: 分析証明書, 2010. (社内資料)
- [23] Braun W.H. (Harlan Laboratories Ltd.): Modified E. Coli phytase produced by *Trichoderma reesei*: 90-Day Oral Toxicity (Gavage) Study in the Wistar Rat, 2011. (社内資料)
- [24] Harlan Cytotest Cell Research GmbH: *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* Reverse Mutation Assay with Modified E.coli phytase produced by *Trichoderma reesei*, 2010. (社内資料)
- [25] Harlan Cytotest Cell Research GmbH: In vitro Chromosome Aberration Test in Chinese Hamster V79 Cells with Modified E.coli phytase produced by *Trichoderma reesei*, 2011. (社内資料)
- [26] Harlan Cytotest Cell Research GmbH: Micronucleus Assay in Bone Marrow Cells of the Rat with Modified E.coli phytase produced by *Trichoderma reesei*, 2011. (社内資料)
- [27] G. Arcelin (Harlan Laboratories Ltd.): QPT 2 (40000P) Primary Skin Irritation Study in Rabbits (4-Hour Semi-Occlusive Application), 2011. (社内資料)
- [28] Harlan Cytotest Cell Research GmbH: Local Lymph Node Assay (LLNA) in Mice with QPT 2 (40000P), 2011. (社内資料)
- [29] Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Efficiency and tolerance study of the novel phytase QPT 2 in broilers, 2011. (社内資料)
- [30] IRTA - RECERCA I TECNOLOGIA AGROALIMENTÀRIES: Tolerance Study with a Novel Phytase QPT2 on Layers, 2012. (社内資料)
- [31] Education and Research Centre Futterkamp of the Chamber of Agriculture Schleswig-Holstein: Effect of QPT2 Phytase at recommended and high application rate in feed on performance and health of piglets, 2011. (社内資料)
- [32] AquaBioTech Group: Tolerance Dstudy in European Sea bass: tolerance level of Quantum Blue, 2020. (社内資料)
- [33] 一般財団法人日本食品分析センター: 試験報告書, 第 21041103001-0101 号, 2021. (社内資料)
- [34] AB Agri Ltd.: 海外での承認状況, 2020 (社内資料)