組換え DNA 技術応用飼料添加物の
安全性確認
(案)

Trichoderma reesei RF5427 株を利用し
て生産されたキシラーゼ

令和 5 年 10 月 25 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	3
(3)	宿主に関する事項	3
(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	9
(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	9
(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	9
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	10
(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	10
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	10
IV	審議結果	11
V	参考文献及び参考資料	11

「*Trichoderma reesei* RF5427 株を利用して生産されたキシラナーゼ」に係る
安全性確認

I はじめに

5 「*Trichoderma reesei* RF5427 株を利用して生産されたキシラナーゼ」（以下、「AM24 キシラナーゼ」とする。）について、令和 4 年 6 月 29 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：*Trichoderma reesei* RF5427 株を利用して生産されたキシラナーゼ

製品名：Econase XT

有効成分概要

一般名	化学名(IUPAC)	EC 番号	CAS 番号	機能
キシラナーゼ Xylanase	Xylanase,endo- 1,4-β	3.2.1.8	9025-57-4	キシランの分解

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

申請者：AB Agri Limited.

開発者：AB Agri Limited.

20 AM24 キシラナーゼは、キシランの分解を触媒するキシラナーゼの生産性を高めるため、*Trichoderma reesei* RH7004/RF4847 株（以下、「RF4847 株」とする。）を宿主として、*Nonomuraea flexuosa* 由来の *am24* 遺伝子を宿主改変株の染色体へ導入して作成した *Trichoderma reesei* RF5427 株（以下、「RF5427 株」とする。）により生産されたキシラナーゼである。

25 日本では、遺伝子組換え微生物により生産されたキシラナーゼは承認されていないが、市販品として流通している非遺伝子組換えキシラナーゼ 1 件を対象として比較を行なった結果、アミノ酸配列の比較や生化学解析により、AM24 キシラナーゼとの同等性が確認された。

30 また、宿主である RF4847 株、*am24* 遺伝子の供与体である *Nonomuraea flexuosa* 及び生産菌である RF5427 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、AM24 キシラナーゼについて、「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」(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

40 AM24 キシラナーゼは、RF5427 株に導入された *Nonomuraea flexuosa* 由来の遺伝子によって産生される。既存のキシラナーゼを比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的解析(三次元構造や活性部位の比較)を実施した。その結果、AM24 キシラナーゼが既存のキシラナーゼと同等と考えるに十分であると確認された。

45 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

50 宿主である RF5427 株は、国立感染症研究所が発行する病原体等の BSL 分類におけるバイオセーフティレベル 2 及び 3 のいずれにも収載されていない。

ベクター及び挿入遺伝子については、塩基数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く、遺伝子の伝達性はない。

55 組換え体の RF5427 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 RF4847 株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、RF5427 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

60 RF5427 株は、飼料添加物であるキシラナーゼの生産効率を向上させる目的で利用され、既存の飼料添加物と同様の方法で利用される。なお、AM24 キシラナーゼは、家禽及び豚用配合飼料に添加することにより、飼料中に含まれる繊維質成分の代謝効率を高めることができる。

(3) 宿主に関する事項

65 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* RH7004株/RF4847株

RF4847株は、野生株である *T. reesei* QM6a株に由来する突然変異株である。

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

70 *T. reesei* は、病原性及び有害生理活性物質を産生することは知られていない。産業的に使用されている *T. reesei* には、抗菌活性が認められていないことが報告されている。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

75 *T. reesei* が家畜やほかの生物への寄生性及び定着性を有するという報告はない。また、米国環境保護庁（EPA）は *T. reesei* QM6a株について寄生性や定着性はないとしている。

以上のことから、*T. reesei* に、人及び家畜に対する寄生性及び定着性はないと考えられる。

80

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

RF4847株は、微生物株保存機関（CBS）に登録されている実験株であり、外来因子に汚染される可能性がある環境に接触したことはなく、病原性の外来因子により汚染されていないことが確認されている。

85

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、自然界に広く分布する木材腐朽菌である。自然環境下において、生存及び増殖能力を有し、宿主RF4847株も同様である。

90

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

T. reesei は子実体を生成することができない雌性不稔性を示す。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

95 *T. reesei* は家きん及び豚の飼料添加物用キシラナーゼ生産菌として広く利用されてきた。原株のQM6a株は、食品用の酵素生産株に先駆的な株であり、その使用の歴史は長い。RF5427株は、本キシラナーゼの生産菌としてEUで承認されている（2009年）。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

100 *T. reesei* の至適温度は24～26℃とされ、25～37℃の範囲でほぼ同様に増殖す

るが、37℃以上では増殖が抑制される。また、2g/L酢酸や0.5g/Lフルフラール、0.05%バニリンでも増殖が抑制される。

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

- 105 *T. reesei* が属するTrichoderma属の人への病原性は通常ないと考えられるが、一部免疫不全のヒトへの日和見感染が報告されている。また、Trichoderma属の中には、マイコトキシンを生産する種もあるが、*T. reesei* にはこのような報告はない。キノコの栽培においては、Trichoderma属の菌により、他の株による病害を防ぐ方法が実用化されている。*T. viride* は抗生物質を産生することが知られているが、*T. reesei* に抗生物質産生性はない。
- 110

(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 挿入遺伝子の宿主への導入は発現ベクターpALK1502を使用した。発現ベクターpALK1502は*E.coli* 由来のプラスミドpUC19を基に作成された。

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量を示す事項

プラスミドpUC19の塩基数は明らかとなっている。

120

(イ) 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。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

- 125 プラスミドpUC19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

- 130 プラスミドpUC19にはアンピシリン耐性を付与する*amp* 遺伝子が組み込まれている。この遺伝子がコードするβラクマターゼによってアンピシリン耐性が付与される。

エ 伝達性に関する事項

- 135 プラスミドpUC19には伝達性を付与する配列は含まれていないため、水平伝播の可能性はない。

オ 宿主依存性に関する事項

プラスミドpUC19には、*E. coli* 由来の複製起点が含まれるが、*E. coli* 以外の菌で複製することは知られていない。

140

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

まず、プラスミドpUC19に*am24* 遺伝子挿入することでpALK1501を作成し、さらに、*amdS* マーカー遺伝子及び*cbh1* 3'-フランキング領域を挿入して、形質転換に用いる発現ベクターpALK1502を作成した。このプラスミドは宿主内で挿入遺伝子が効率よく翻訳されるようにコドン最適化している。

145

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

作成した発現カセットは、宿主RF4847株をプロトプラスト化した後、PEG法により宿主のゲノム上に挿入し、選択培地上で発育した株から生産菌RF5427株を得た。

150

RF5427株の発現カセットの挿入位置は、全ゲノムシーケンスにより明らかになっている。

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

155

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

am24 遺伝子の供与体は放射菌 *Nonomuraea flexuosa* である。Nonomuraea 属は、Actinobacteria 門、Actinobacteria 綱、Streptomycetales 目、Streptosporangiaceae科に属し、好気性、グラム陽性、非抗酸菌及び非運動性がある。土壌から単離される。

160

Nonomuraea 属の放射菌について病原性の報告は確認されなかった。*N. flexuosa* は国立感染症研究所の病原体等安全管理規程において、BSL2及びBSL3の病原体等に分類されていない。

以下に詳細を示す。

挿入断片	供与体の由来	性質・機能
<i>pcbh1</i> 遺伝子	プラスミド pAH110	<i>T. reesei cbh1(cel7A)</i> プロモーター
<i>cbh2/cbd A+B</i> 遺伝子	<i>T. reesei</i> QM6a ゲノム DNA	キシラナーゼ生産量を向上させる

<i>kex2</i> 遺伝子	PCR による合成部位	Kex2 プロテアーゼ開裂部位をコードした DNA で、結合ポリペプチドが分泌される間に、キャリアポリペプチドとキシラナーゼに分かれる。
<i>am24</i> 遺伝子	<i>N. flexuosa</i> DSM43186	コドンの最適化をおこなった AM24 キシラナーゼをコードしたもの
<i>tcbh1</i> 遺伝子	<i>T. reesei</i> <i>cbh1</i> ターミネーター	<i>T. reesei cbh1(cel7A)</i> のターミネーター
<i>amdS</i> 遺伝子	p3SR2 プラスミド	形質転換時の選択マーカーとなる、 <i>Aspergillus nidulans amdS</i> (アセトアミダーゼ) 遺伝子
<i>cbh1 3'</i> 遺伝子	<i>T. reesei</i> isolate QM6a の <i>cbh1</i> 3' フランキンク領域	プロモーター領域と共に <i>cbh1</i> 座に対する発現カセットのターゲティングを可能にする。

165

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、ベクター pUC19 を用い、*am24* 遺伝子を含む発現カセットを挿入した pALK1502 を作成した。

170

(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、宿主 RF4847 株をプロトプラスト化した後、PEG法により宿主のゲノム上に挿入し、選択培地で RF5427 株を得た。

175

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

am24 遺伝子の発現には、*T. reesei* の *cbh1* 遺伝子のプロモーター配列を用いた。そのほか、*amdS* 遺伝子のプロモーター配列も用いた。

180

(イ) ターミネーターに関する事項

am24 遺伝子の発現には、*T. reesei* の *cbh1(cel7A)* のターミネーター配列を用いた。そのほか *amdS* 遺伝子のターミネーター配列も用いた。

185 (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

挿入遺伝子のORF検索及びBLASTp (NCBI) による検索の結果、既知の有害たん白質をコードする配列は確認されなかった。また、発現カセット挿入部位の境界領域を含めたORF検索を行ったところ、相同性のたん白質は検出されなかった。

190

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

RF4847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。

195

また、AM24キシラナーゼの物理化学処理に対する感受性を評価するため、人工胃液及び腸液に対する耐性を検討した結果、60分後も分解されなかった。一方、*in silico* 解析では消化酵素 (ペプシン及びパンクレアチン) の認識部位が確認され、消化されうることが示された。物理化学試験で消化されなかったことは、実際のタンパク質の構造や翻訳後修飾などが推定とは異なっていたためと考えられる。

200

(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。

205

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

RF4847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

210

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。発現プラスミドは精製されたものが用いられている。

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

215

生産菌RF5427株には、*amp* 遺伝子含めpUC19由来の遺伝子は残存していない。したがって、申請品について抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する懸念はないと考えられる。

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

220 2. (5) ウに記載のとおり、ORF検索及びBLASTp (NCBI) の検索の結果、挿入遺伝子及びその境界領域には、既知の有害たん白質をコードする配列は確認されなかった。

(6) 組換え体に関する事項

225 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

最終的に得られた生産菌RF5427株が新たに獲得した形質は、AM24キシラナーゼ生産能と、選択マーカーの*amdS* 遺伝子によるアセトアミド配合選択培地での増殖を可能にするアセトアミダーゼ産生能であり、これらは病原性等を付与するものではない。

230

イ 宿主との差異に関する事項

生産菌RF5427株はキシラナーゼ産生性が付与されたのみで、病害性または有害生理活性物質に関するものではない。

235

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

RF5427株は、*T. reesei* QM6a株から由来する宿主であるRF4847株の形質を受け継いでおり、外界における生存性及び増殖性も受け継いでいると考えられる。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

240 生存及び増殖能力はRF4847株の形質を引き継いでいる。

オ 不活化法に関する事項

生産菌RF5427株は、低温殺菌処理 (80°C、30分間) で不活化される。

245 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

AM24キシラナーゼの製造に使用する製造原料は、食品に使用される品質のものであり、欧州食品安全機関 (EFSA) 等の定めた規格を満たしている。

250 (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

AM24キシラナーゼの発酵器材やその他の設備は長年安全に使用された実績が

あり、その製造工程はEFSAに承認され、ISO9001、HACCP及びFAMI QSシステムにより管理している。

255 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

AM24キシラナーゼ製品に、生産菌RF5427株の混入がないことを、培養試験によって確認している。培地は製造に用いられるものであるため、検出効率は十分であると考えられる。

260

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

AM24キシラナーゼ製品について重金属とカビ毒の測定方法が規定されており、分析の結果、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。

265

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

ろ過による細胞分離工程及び限外ろ過等による精製工程により、非酵素成分が除去される。

(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

270

AM24キシラナーゼ製品は、従来の食品用あるいは飼料添加物用の酵素の製造と同様であり、生産物の構成・成分の変動の範囲は、従来と同等であると考えられる。

また、既存のキシラナーゼと同様の試験方法で規格試験を行い、同等であることを確認している。

275

以上のことから、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。

(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

280

以下に外国における認可状況を示す（2021年5月時点）。EUでは鶏用、七面鳥用及び豚用の飼料添加物として使用されている。

状況	国名
登録	EU

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

285 該当しない。

IV 審議結果

290 *Trichoderma reesei* RF5427 株を利用して生産されたキシラナーゼについて、「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

- 295 1. Paloheimo, M., Mäntylä, A., Kallio, J., and Suominen, P. 2003. High-yield production of a bacterial xylanase in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* requires a carrier polypeptide with an intact domain structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7073–7082.
- 300 2. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) 2017, Safety and efficacy of HOSTAZYM® X (endo-1,4-β-xylanase) as a feed additive for chickens reared for laying and minor poultry species reared for laying. *EFSA Journal*. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4708
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7010005/pdf/EFS2-15-e04708.pdf>
- 305 3. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (EFSA FEEDAP Panel) 2018, Safety and efficacy of Hostazym® X (endo-1,4-β-xylanase) as a feed additive for sows in order to have benefit in piglets. *EFSA Journal*. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5456
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7009514/pdf/EFS2-16-e05456.pdf>
- 310 4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊 1、2020 年
https://www.niid.go.jp/niid/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_2020101-1.pdf
- 315 5. Seidl, V., Gamauf, C., Druzhinina, I. A., Seiboth, B., Hartl, L., and Kubicek, C. P. 2008 The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics* 9: 327

- 320 6. Peterson, R. and Nevalainen, H. 2012 *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years
of strain improvement. *Microbiol.* 158: 58-68
- 325 7. Hjortkjaer R.K., Bille-Hansen V., Hazelden K.P., McConville M., McGregor D.B.,
Chapmann E., Gardner J.R., and Ashby R. 1986 Safety evaluation of celluclast , an
acid cellulose derived from *Trichoderma reesei*. *Food Chem Toxic* Vol 24 N°1: 55-63
- 330 8. Coenen T.M.M., Schoenmakers A.C.M., and Verhagen H. 1995 Safety evaluation of
beta-glucanase derived from *Trichoderma reesei* : summary of toxicological data.
Food Chem. Toxic Vol 33, N°10: 859-866
- 335 9. 国立感染症研究所の病原体等安全管理規程（国立感染症研究所、改訂第 3 版、令和
2 年 4 月 1 日改訂）
10. Council Directive 2000/54/EC
[https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000L0054-
20200624&from=EN](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:02000L0054-20200624&from=EN)
- 340 11. Nevalainen H. Suominen, P and Taimisto, K, 1994. Minireview On the safety of
Trichoderma reesei. *J. Biotechnol.* 37: 193-200
- 345 12. Environmental Protection Agency, 2020 Microorganisms; General Exemptions
From Reporting Requirements; Revisions to Recipient Organisms Eligible for Tier
I and Tier II Exemptions, Federal Register/Vl. 85, No. 47, 13760-13773
<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2020-03-10/pdf/2020-04746.pdf>
13. Seidl, V., Seibel, C., Kubicek, P., and Schmoll, M. 2009 Sexual development in the
industrial workhorse *Trichoderma reesei*. *PNAS* 106: 13909-13914
- 350 14. Suh D.H., Becker T.C., Sands J.A. and Montenecourt B.S. 1988 Effects of
temperature on xylanase secretion by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.* 32:
821-825
15. Hayward, T. K., Hamilton, J., Templeton, D., Jennings, E. D., Ruth, M., Tholudur,
A., Mcmillan, J. D., Tucker, M., and Mohagheghi A. 1999 Enzyme Production,

- 355 Growth, and Adaptation of *T. reesei* Strains QM9414, L-27, RL-P37, and Rut C-30
to Conditioned Yellow Poplar Sawdust Hydrolysate, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 77-
79: 293-309
16. Vohra, R. M., Shirkot, C. K., Dhawan, S.. and Gupta, K. G. 1980 Effect of Lignin
360 and Some of its Components on the Production and Activity of Cellulase(s) by
Trichoderma reesei, *Biotech. Bioeng*, 22: 1497-1500
17. Anitha, R. and Murugesan, K. 2005 Production of biotoxin on natural substrates
by *Trichoderma virens*, *J. Basic Microbiol.* 45: 12-19
- 365 18. Schuster, A. and Schmoll, M. 2010 Biology and biotechnology of *Trichoderma*.
Appl. Microbiol. Biotechnol. 87: 787-799
19. Degenkolb, T., von Döhren, H., Nielsen, K. F., Samuels, G. J., and Brückner, H.
2008 Recent advance and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and
370 mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and
Hypocrea. *Chem. Biodivers.* 5: 671-680
20. Li, C., Lin, F., Zhou, L., Qin, L., Li, B., Zhou, Z., Jin, M., and Chen, Z. 2017,
Cellulase hyper-production by *Trichoderma reesei* mutant SEU-7 on lactose.
375 *Biotechnol. Biofuels* 10:228
21. Leskinen, S., A. Mäntylä, R. Fagerström, J. Vehmaanpera, R. Lantto, M.
Paloheimo, and P. Suominen. 2005. Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A,
from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and
380 characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma*
reesei. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:495–505.
22. Paloheimo, M., Mäntylä, A., Kallio, J., Puranen, T., and Suominen, P. 2007
Increased Production of Xylanase by Expression of a Truncated Version of the
385 xyn11A Gene from *Nonomuraea flexuosa* in *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ.*
Microbiol. 73: 3215-3224
23. Kelly, J. M., and Hynes, M. J. 1985 Transformation of *Aspergillus niger* by the
amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 4:475-479
- 390

24. FAO 2006 General specifications and considerations for enzyme preparations used in food processing. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E03.htm>; last accessed November, 2018) Introduction の抜粋
395
25. Li, W., Huang, C., Chen, C., Chuang, Y., Tung, S., and Wang, T. 2017 *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. *Biotechnol. Biofuels*, 10:170
- 400 26. Goodfellow, M., Maldonado, L. A., and Quintana, E. T. 2005 Reclassification of *Nonomuraea flexuosa* (Meyer 1989) Zhang et al. 1998 as *Thermopolyspora flexuosa* gen. nov., comb. nov., nom. rev. *Int. J. System. Evolution. Microbiol.* 55, 1979-1983
- 405 27. Wang, X., Zhao, J., Liu, C., Wang, J., Shen, Y., Jia, F., Wang, L., Zhang, J., Yu, C. and Xiang, Y. 2013 *Nonomuraea solani* sp. nov., an actinomycete isolated from eggplant root (*Solanum melongena* L.) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 2418–2423
- 410 28. Qian, J., Chen, R., Wang, H., and Zhang, X. 2020 Role of the PE/PPE Family in Host-Pathogen Interactions and Prospects for Anti-Tuberculosis Vaccine and Diagnostic Tool Design *Front Cell Infect Microbiol.* 26:10:594288. doi: 10.3389/fcimb.2020.594288. eCollection 2020
- 415 29. Leskinen, S., Mäntylä, A., Fagerström, R., Vehmaanperä, J., Lantto, R., Paloheimo, M., and Suominen, P. 2005 Thermostable xylanases, Xyn10A and Xyn11A, from the actinomycete *Nonomuraea flexuosa*: isolation of the genes and characterization of recombinant Xyn11A polypeptides produced in *Trichoderma reesei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:495-505.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 420 1. CBS IDENTIFICATION SERVICE *Trichoderma reesei* RH7004/RF4847 株
2. *T. reesei* RH7004/RF4847 株から RF5427 株作成までのフロー
3. Econase XT の欧州における承認
- 425 4. 既存製品に含まれるキシラナーゼ成分と AM24 キシラナーゼのアミノ酸配列の比較

5. プラスミド pUC19
- 430 6. pALK1502 の情報
7. pALK1502 の構築
8. AM24 キシラナーゼ生産株 RF5427 株のインテグレーション部位の評価
- 435 9. サザンブロット法による RF5427 株 (*Nonomuraea flexuosa* キシラナーゼ生産株) ゲノムの分析(1)
10. pUC19 をプローブとして用いたサザンブロット法による *Trichoderma reesei* RF5427 株ゲノムの分析
- 440 11. サザンブロット法による RF5427 株 (*Nonomuraea flexuosa* キシラナーゼ生産株) ゲノムの分析(2)
12. pAKL1502 発現カセットの ORF 検索
- 445 13. ペプシン及びパンクレアチンを用いたキシラナーゼの安定性試験
14. 製造用株 (*Trichoderma*, *Aspergillus*) の検出成績と試験方法
- 450 15. 重金属検出法
16. 食品：ヘーゼルナッツ、ピーナッツ、ピスタチオ、イチジク及びパプリカ粉末におけるアフラトキシン B1 及びアフラトキシン B1、B2、G1 及び G2 総合の検出
- 455 17. 食品：大麦及び焙煎コーヒーのオクラトキシンの測定法イムノアフィニティーカラム洗浄による HPLC 法
18. 液体クロマトグラフィー及び蛍光検出によるイムノアフィニティー洗浄後のオーツ麦を含むシリアル中の T-2 毒素及び HT-2 毒素の測定法
- 460 19. エコナーゼ XT における品質管理試験（重金属及びカビ毒を含む）成績
20. 反復投与毒性試験（短期）胃管栄養法での投与によるラットの神経毒性スクリーニ

ングを併せた 13 週間毒性試験

465

21. 細菌復帰突然変異試験 *Salmonella typhimurium* TA 1535 株, TA 1537 株, TA 98 株
及び TA 100 株並びに *Escherichia coli* WP2uvrA 株による変異活性の試験

470

22. 染色体異常試験チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 *in vitro* 培養での染色体
異常試験

23. 眼刺激試験エコナーゼ XT L ロット番号 3135427510 を用いたウサギの眼刺激試験

475

24. 皮膚刺激性試験エコナーゼ XT P ロット番号 254275484、エコナーゼ XT L ロット
番号 3135427510、New Phytase Dry ロット番号 3135353513 及び New phytase
Liquid ロット番号 353535567 による皮膚刺激性試験

25. 皮膚感作試験エコナーゼ XT L ロット番号 3135427510 及び New phytase Liquid ロ
ット番号 353535567 による局所リンパ節検査