

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

**ATC 1562 株を利用して生産された
25-ヒドロキシコレカルシフェロール**

**平成 27 年 3 月 2 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

「ATC1562 株を利用して生産された 25-ヒドロキシコレカルシフェロール」に係る ..	2
安全性確認	2
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	6
(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	6
(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	6
(3) 宿主に関する事項	6
(4) ベクターに関する事項	8
(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	9
(6) 組換え体に関する事項	1 2
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 2
(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	1 2
(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	1 3
4 生産物に関する事項	1 3
(1) 組換え体の混入を否定する事項	1 3
(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項	1 3
(3) 精製方法及びその効果に関する事項	1 3
(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	1 4
(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	1 4
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	1 4
IV 審議結果	1 4
V 参考資料	1 4

「ATC1562 株を利用して生産された 25-ヒドロキシコレカルシフェロール」に係る 安全性確認

I はじめに

「ATC1562 株を利用して生産された 25-ヒドロキシコレカルシフェロール」（以下「25-ヒドロキシコレカルシフェロール」という。）について、平成 24 年 3 月 5 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：ATC1562 株を利用して生産された 25-ヒドロキシコレカルシフェロール
製剤名：ROVIMIX Hy・D 1.25%
有効成分概要

一般名	分子式(分子量)	化学名	CAS 番号
25-ヒドロキシコレカルシフェロール 25-hydroxycholecalciferol	$C_{27}H_{44}O_2 \cdot H_2O$ (418.66)	(3 β ,5 Z ,7 E)-9,10-secosteroid-5,7,10(19)-triene-3,25-diol monohydrate	63283-36-3

用 途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給
申請者：DSM ニュートリション ジャパン株式会社
開発者：DSM Nutritional Products Ltd.（スイス）

25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、遺伝子組換え酵母である *Saccharomyces cerevisiae* ATC1562 株が産生したコレスタトリエノールに、化学的修飾及び紫外線照射等を経て製造される。25-ヒドロキシコレカルシフェロールの製造原体は、97% 以上に精製されており、生産菌やそれに由来する有害性が示唆される非有効成分は含有していないことが確認されている。

S. cerevisiae ATC1562 株には抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与させる *bla* 遺伝子が導入されているが、上述のとおり、25-ヒドロキシコレカルシフェロール製造原体に生産菌等が含有していないことは確認されている。

本添加物は、海外で製造され日本に輸入される予定である。海外では EU、米国等で既に飼料添加物として使用されている。

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、25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、「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。

なお、25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律（昭和 28 年法律第 35 号）第 3 条に基づく飼料添加物として指定される必要があり、遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認と併せて行われた。

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

(1) 添加物について

25-ヒドロキシコレカルシフェロールは新規の飼料添加物として指定が必要な添加物であるため、生産物の既存のものに該当する 25-ヒドロキシコレカルシフェロールはない。そのため、25-ヒドロキシコレカルシフェロールの生理的な前駆体であり、既に飼料添加物として指定されているコレカルシフェロールの製造工程を参考に、遺伝子組換えに関して評価が必要な事項を検証した。

1) 25-ヒドロキシコレカルシフェロールの概要

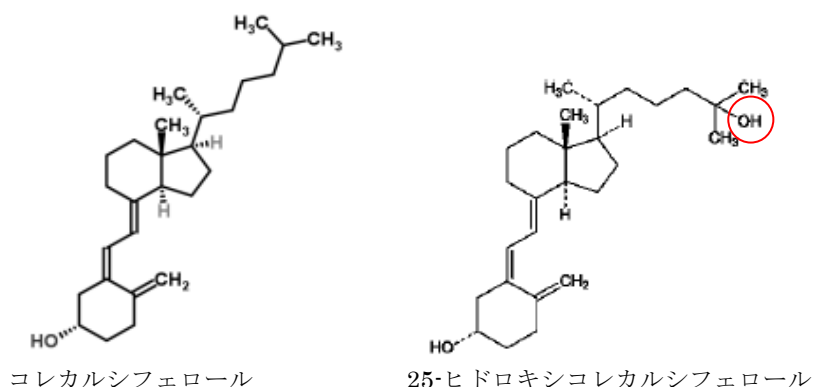
① 製剤名及び有効成分

製剤名：ROVIMIX Hy・D 1.25%

有効成分：25-ヒドロキシコレカルシフェロール

製剤の形状：粉状

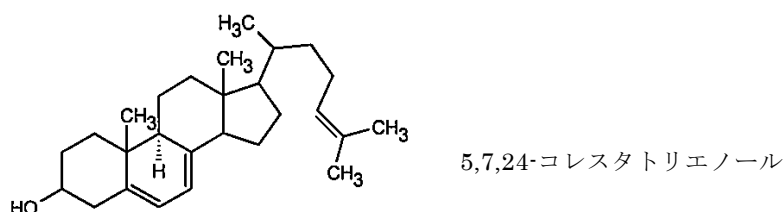
構造：下図のとおり、25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、既に飼料添加物として指定されているコレカルシフェロールの 25 位に水酸基が付いている。



② 製造方法

遺伝子組換え酵母である *S. cerevisiae* ATC1562 株から産生されるコレスタトリエノール(5,7,24-コレスタトリエノール)を前駆体とし、その後、化学的修飾、紫外線照射、熱異性化及び結晶化精製を経て生成される。

25-ヒドロキシコレカルシフェロールの製造原体（成分規格の含量として94%以上と設定）は、97%以上に精製されている。



③ 用途及び使用形態

用途及び使用形態はコレカルシフェロールと同じである。

なお、コレカルシフェロールは、食餌により家畜等に摂取された後、肝臓で代謝されて、25-ヒドロキシコレカルシフェロールとなり、さらに腎臓で活性型の 1 α ,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール（カルシトリオール）となって生理機能を有するようになることから、家畜等の肝機能の低下がコレカルシフェロールの利用効率を低下させるおそれがあるが、25-ヒドロキシコレカルシフェロールをコレカルシフェロールの代替利用することにより、肝機能の低下による利用効率の低下を防止できるとしている。

2) コレカルシフェロールの概要（参考）

① 名称、有効成分等

名称：コレカルシフェロール

有効成分：コレカルシフェロール

製剤の形状：液状又は粉状

② 製造方法

羊毛から抽出した 7-デヒドロコlesteroールを前駆体とし、その後、化学的修飾、紫外線照射、熱異性化及び結晶化精製を経て生成される。

③ 用途及び使用形態

飼料の栄養成分の補給を目的に飼料添加物として指定され、広く家畜等の飼料に利用されている。

コレカルシフェロールは家畜等のカルシウムやリンの代謝、骨格の形成などに必要なビタミン（ビタミン D₃）である。食餌により摂取されたコレカルシフェロールは、ヒトと同様に、肝臓で代謝されて、25-ヒドロキシコレカルシフェロールとなり、さらに腎臓で活性型の 1 α ,25-ジヒドロキシコレカルシフェロールとなって生理機能を有するようになる。コレカルシフェロールは不足するとくる病になる。

④ 摂取量

通常、コレカルシフェロールは、鶏及び豚用に 25～40 μ g/kg 飼料、肉牛 1 頭当たり 60 μ g/日、乳牛 1 頭当たり 600 μ g/日及び養魚用飼料中に 40 μ g/kg 飼料程度の割合で添加されている。

3) 25-ヒドロキシコレカルシフェロールとコレカルシフェロールの製造工程の比較

上述のとおり、25-ヒドロキシコレカルシフェロールは *S. cerevisiae* ATC1562 株から前駆体を得ており、コレカルシフェロールは羊毛から前駆体を得ている点が異なる。

一方、得られた前駆体に化学的修飾、紫外線照射、熱異性化及び結晶化精製を経て添加物原体を得ている点は共通している。

(2) 宿主及び導入 DNA について

1) 宿主

① 宿主の種名（学名）、株名及び由来

宿主：*Saccharomyces cerevisiae*

株名：*S. cerevisiae* ATCC740027 株（ATC 0402mu）

② 宿主微生物の添加物製造への利用経験又は飼料利用経験

S. cerevisiae はパンやアルコール発酵に欠かせない酵母として広く利用されている。飼料として飼料用酵母及び酵母抽出物が利用されている。また、欧州では、*S. cerevisiae* から生産されたセレノメチオニンや *S. cerevisiae* 製剤が飼料添加物として認可されている（参考資料 2）。

③ 宿主の構成成分等に関する事項

S. cerevisiae が有害生理活性物質を産生するという報告はない。*S. cerevisiae* は、OECD の GILSP 微生物基準が適用できる宿主微生物とされており、*S. cerevisiae* ATC 0402mu 株についても同様であると考えられる。

2) 導入 DNA

① DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

コレスタトリエノールの産生に関わるヒドロキシメチルグルタリル (HMG)-CoA リダクターゼをコードするヒドロキシメチルグルタリル-CoA リダクターゼ遺伝子 (HMG1 遺伝子) の N 末端半分が欠失した tHMG1 遺伝子、そのプロモーター領域及びターミネーター領域の DNA 供与体は、*S. cerevisiae* である。

また、tHMG1 遺伝子等とともに挿入された、発現プラスミドの構築に用いたプラスミド pUC の部分領域及びアンピシリン耐性遺伝子 (*bla* 遺伝子) の DNA 供与体は、*Escherichia coli* である。

② 挿入 DNA の性質及び導入方法

tHMG1 遺伝子は、HMG-CoA リダクターゼを発現することにより、25-ヒドロキシコレカルシフェロール前駆体のコレスタトリエノールの産生能を高めている。

bla 遺伝子は、生産菌 *S. cerevisiae* ATC1562 株において転写されていることが確認されているが（参考資料 9）、アンピシリンは真核生物に対し抗生物質として機能しないことから、アンピシリンに対する耐性を新たに付与することはない。

各遺伝子を含む発現プラスミドは、形質転換法を用いて宿主に導入され、相同組換えにより宿主ゲノムに挿入されている。

3) 組換え体と宿主の相違点

150 *S. cerevisiae* ATC1562 株は、tHMG1 遺伝子の導入により 25-ヒドロキシ
コレカルシフェロールの前駆体となるコレスタトリエノールの生産性を高めて
いる点及び *bla* 遺伝子を保持している点が宿主と異なる。

155 以上のことから、参考として比較したコレカルシフェロールとの製造に係る相
違点は *S. cerevisiae* ATC1562 株を用いて前駆体コレスタトリエノールを生産して
いる点であり、*S. cerevisiae* ATC1562 株と既存の非組換え酵母との相違点は、*S.*
cerevisiae ATC1562 株はコレスタトリエノールの生産性が高められている点であ
る。これらの点の安全性について、2 以降の事項に沿って確認した。

2 組換え体等に関する事項

160 (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

165 *S. cerevisiae* ATC1562株の宿主である *S. cerevisiae* は、OECDではGILSP
が適用できる宿主微生物とされている。

165 挿入遺伝子及びベクターについても有害配列を含んでいないことは明らかと
なっている。

S. cerevisiae ATC 1562株は、HMG-CoAリダクターゼをコードする遺伝子
を組み込んだ非病原性及び毒素非産生性の菌株である。

170 以上のことから、*S. cerevisiae* ATC 1562株はGILSP組換え体に該当すると
考えられる（参考資料1）。

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

175 25-ヒドロキシコレカルシフェロール前駆体のコレスタトリエノールは、*S.*
cerevisiae が一般的に生産する物質であるが、*S. cerevisiae* ATC 1562株は遺
伝子組換えによりその生産能が向上されている。

180 *S. cerevisiae* ATC 1562株は、25-ヒドロキシコレカルシフェロールの製造
工程の内、発酵工程におけるコレスタトリエノールの生産に利用される。コレ
スタトリエノールの生産後、紫外線照射や熱異性化などの化学工程を経て25-
ヒドロキシコレカルシフェロールとなり、最終製品には25-ヒドロキシコレカ
ルシフェロールの類縁化合物の代謝産物以外に *S. cerevisiae* ATC 1562株に由
来する不純物は含まれない。

(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

185 宿主：*Saccharomyces cerevisiae*

株名：*S. cerevisiae* ATCC740027 (ATC 0402mu)

分類学上の位置

名称：*Saccharomyces cerevisiae*

190

界：Fungi

門：*Ascomycota*

綱：*Hemisacomycetes*

目：*Saccharomycetales*

属：*Saccharomyces*

195

種：*cerevisiae*

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

S. cerevisiae について、病原性や有害生理活性物質の生産に関する報告はない。

200

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

S. cerevisiae について、寄生性や定着性に関する報告はない。

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

205

S. cerevisiae ATC 0402mu株は、病原性の外来因子に汚染されていない。

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

S. cerevisiae ATC 0402mu株は、温度、水分、栄養素等の条件が適切に揃うことにより生存及び増殖が可能となる。これら適切な条件が揃わなければ増殖は制限される（参考資料20）。自然環境を反映する実験条件下での生存及び増殖は困難である。

210

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

S. cerevisiae の通常の生殖は出芽による無性生殖である。有性生殖は、実験条件下においては可能であるが、自然界ではほとんどみられない。

215

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

S. cerevisiae は、我が国において、飼料用酵母及び酵母抽出物が飼料として安全に利用されている。また、欧州では、*S. cerevisiae* を利用して生産されたセレノメチオニンや*S. cerevisiae* 製剤が飼料添加物として認可されている（参考資料2）。

220

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

S. cerevisiae は、高濃度エタノールや高温、低温、乾燥等の様々な発酵条件下で機能しているが、これらの過酷なストレスを連続的または複合的に受けることにより、生育が阻害され、死に至る。

225

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

230 *Saccharomyces* 属株には、これまでに病原性や有害生理活性物質の産生
に関する報告はない。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

235 宿主への導入に用いられた2つの発現プラスミドは、*Escherichia coli*(*E. coli*) JM109株に由来するプラスミドpUC8を基に構築された。

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量又は塩基数を示す事項

240 プラスミドpUC8の塩基数は2665 bpである（参考資料3）。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミドpUC8の制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

245 プラスミドpUC8の構成は明らかにされており、既知の有害塩基配列
は含まないことが明らかとなっている（参考資料3）。

ウ 薬剤耐性に関する事項

250 プラスミドpUC8は抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与させるβ-ラ
クタマーゼをコードする *bla* 遺伝子を含む。β-ラクタマーゼは、アンピシリ
ンのβ-ラクタム環を加水分解することによりアンピシリンを不活化させる。

エ 伝達性に関する事項

255 プラスミドpUC8には伝達性に関与する領域は有さないことが明らかとな
っている。

オ 宿主依存性に関する事項

260 プラスミドpUC8は *E. coli* 由来であり、*E. coli* 中で複製することが知ら
れており、宿主依存性は高いと考えられている。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

265 2つの発現プラスミドは、各遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素処理及び
アガロースゲル電気泳動により精製し、得られた各DNA断片を制限酵素処
理及びライゲーションによりプラスミドpUC8に導入することで作成した。
なお、2つの発現プラスミドの塩基配列は明らかとなっている（参考資料
5,6）。

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

2つの発現プラスミドの宿主への導入には形質転換法が用いられている。

270

(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

tHMG1遺伝子の供与体は、*S. cerevisiae* S288c株である。

275

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

挿入遺伝子は、制限酵素処理及びライゲーションにより発現プラスミドに組み込まれた。

280

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

形質転換法により2つの発現プラスミドが宿主へ導入された後、一回交差相同組換えにより酵母ゲノムに発現プラスミド全体が部位特異的に組み込まれている。なお、*S. cerevisiae* では、自然状態において、相同組換えでの組込みが非相同組換えに比べ高い頻度で起こっていることが知られている（参考資料18）。発現プラスミドが導入された菌体は、宿主の遺伝子型を選択マーカーとし、選択されている。

285

S. cerevisiae ATC1562株における挿入された発現プラスミドの配列及びその両末端の近傍配列を用いたPCR法及び塩基配列解析の結果、2つの発現プラスミド由来の配列が、酵母ゲノム上の意図した位置に導入されていることが確認された（参考資料19,21）。

290

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

295

2つの発現プラスミドにそれぞれ用いられたプロモーターの供与体は*S. cerevisiae* S288c株である。

(イ) ターミネーターに関する事項

300

2つの発現プラスミドのうち、一方のみターミネーターが用いられており、その供与体は*S. cerevisiae* S288c株である。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

305

2つの発現プラスミドの構築に使用したプラスミド及び挿入遺伝子配列は、*S. cerevisiae*又は*E. coli*に由来し、既知の有害配列を含んでいないことが確認されている。2つの発現プラスミドの塩基配列は明らかとなっており（参考資料5,6）、*S. cerevisiae* ATC1562株にはプラスミド全体が組み込まれている。これらの発現プラスミド以外のDNA配列は導入されていない。

310

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

宿主*S. cerevisiae* ATC 0402mu株に導入された2つの発現プラスミドの構成、各遺伝子の由来及び機能は明らかとなっている。

315 (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（参考資料5,6）。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

2つの発現プラスミドの制限酵素による切断地図は明らかになっており（参考資料7,8）、*S. cerevisiae* ATC1562株において、挿入された発現プラスミドの配列は変化していない（参考資料21）。

320

オ 純度に関する事項

各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は上のエのとおり明らかとなっている。挿入DNAは、目的配列を含む発現プラスミドとして純化されており、目的配列を含む発現プラスミド以外の配列は含まない。

325

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

(ア) 遺伝子及び遺伝子産物の特性に関し、次の事項に関する事項

330 ① 構造及び機能

2つの発現プラスミドが含有している*bla* 遺伝子は*E. coli* のプラスミドに由来し、 β -ラクタマーゼをコードしている。 β -ラクタマーゼは、アンピシリンの β -ラクタム環を加水分解することにより不活化させる。その結果、*E. coli* にはアンピシリンに対する耐性が付与される。

335 *bla* 遺伝子は、GILSPの適用できる選択マーカー遺伝子として厚生労働省及び経済産業省により認められている。

② 耐性発現の機序、使用方法及び関連代謝産物

340 *bla* 遺伝子は原核生物の*E. coli* のプラスミドに由来し、発現プラスミドの構築の際の、*E. coli* 中での選抜・保持の目的にのみ使用されている。*bla* 遺伝子は*S. cerevisiae* ATC1562株で転写される可能性があるが（参考資料9）、真核生物はアンピシリンに対する感受性を有さないことから¹、*bla* 遺伝子が転写されることにより新たにアンピシリン耐性能が付与されることはない（参考資料9）。

345 なお、*S. cerevisiae* の形質転換体の選択には、生産菌の遺伝子型が選択マーカーとして使用されている。

¹アンピシリンは、大腸菌など原核生物の細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンの合成に関与する酵素を阻害することにより、抗菌活性を示す抗生物質だが、真核生物である酵母はペプチドグリカンを合成しないため、抗菌活性を示さない。

③ 同定及び定量方法

導入された *bla* 遺伝子のコードするβ-ラクタマーゼの同定及び定量方法は明らかとなっている。

④ 抗生物質耐性マーカー及び関連代謝物質の不活化法

発現プラスミドが導入された *S. cerevisiae* ATC1562株は、発酵後のコレスタトリエノール抽出工程において、65℃、15分の加熱処理により破壊され、精製工程において除去される。最終生産物（25-ヒドロキシコレカルシフェロール原体）について、リアルタイムPCR法で試験したところ、*bla* 遺伝子のDNA断片は検出されなかった（検出限界は300 fg/mL）（参考資料10）。

⑤ 消化管内環境における酸又は消化酵素による変化

25-ヒドロキシコレカルシフェロール原体及び製剤中に *S. cerevisiae* ATC1562株は存在しないため、家畜等が摂取するおそれはない。

（イ） 遺伝子及び遺伝子産物の摂取に関する事項

25-ヒドロキシコレカルシフェロール原体及び製剤中に *S. cerevisiae* ATC1562株は存在しないため、家畜等が25-ヒドロキシコレカルシフェロールから *bla* 遺伝子及び *bla* 遺伝子から発現されるβ-ラクタマーゼを摂取するおそれはない。

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

2つの発現プラスミドの全配列を対象に、6つの読み枠において、開始コドンから始まり、終始コドンで終結する連続する30アミノ酸以上のORFの検索を行った結果、意図的に導入されたORF以外に、新たなORFが8つ検出された。検出された8つのORFと既知の毒性たん白質との相同性の有無を確認するために、Swiss-Prot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たん白質は検出されなかった。さらに、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、食品アレルゲン用SDAP (SDAP for Food Allergens)データベースを用いて、相同性検索を行った結果、既知のアレルゲンと80アミノ酸以上で35%以上の相同性を示すORFは検出されなかった。次に抗原決定基の有無を確認するために、食品アレルゲン用SDAP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6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（参考資料11）。

また、*S. cerevisiae* ATC1562株における挿入された発現プラスミドの配列及びその両末端の近傍配列を用いた塩基配列解析の結果、*S. cerevisiae* ATC1562株に導入された2つの発現プラスミドの配列の挿入による新たなORFは形成されていないことが確認されている（参考資料21）。

390 (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

アセチルCoAから一連の過程を経てコレスタトリエノールを生合成する生成経路は、既存の非組換え酵母が有している経路である（参考資料12）。

395 この生合成経路では、HMG-CoAリダクターゼの働きによりヒドロキシメチルグルタリルCoAからメバロン酸へ移行し、いくつかの経路を経てコレスタトリエノールが産生される。*S. cerevisiae* ATC1562株は、tHMG1遺伝子の導入によりこの酵素の発現量が増加することにより、最終的にコレスタトリエノールの産生能が向上している。

400 なお、*S. cerevisiae* は、本来エルゴステロールからビタミンD₂、コレスタトリエノールからビタミンD₃を生成する系を有するが、*S. cerevisiae* ATC1562株の宿主である*S. cerevisiae* ATC 0402mu株は、エルゴステロールをつくる経路が阻害されている。そのため、炭素源がコレスタトリエノールの生成系に多く利用される（参考資料4）。

405 イ 宿主との差異に関する事項

組換え体*S. cerevisiae* ATC 1562株と宿主*S. cerevisiae* ATC 0402mu株との差異は、コレスタトリエノールの産生能の向上に関わる遺伝子を有する発現プラスミドが組換えDNA操作により組み込まれていることである。

410 宿主には、発現プラスミドの塩基配列以外の配列は挿入されておらず、非病原性及び有害生理活性物質の非生産に関する差異は生じていない。

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

組換え体*S. cerevisiae* ATC1562株の生存性及び増殖性は、宿主*S. cerevisiae* ATC 0402mu株と変わらない。

415

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

組換え体*S. cerevisiae* ATC1562株は宿主*S. cerevisiae* ATC 0402mu株と同様の方法により生存及び増殖が制限される。

420 オ 不活化法に関する事項

S. cerevisiae ATC1562株は、発酵後にコレスタトリエノールを抽出する工程において65℃、15分の加熱処理により破壊、精製工程において除去される。

425 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

25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、*S. cerevisiae* ATC1562株からコレスタトリエノールを抽出し、これを前駆体として化学工程を経て製造される。

430

S. cerevisiae ATC1562株の培養には、通常の飼料添加物製造に一般的に用いられる原料を用いており安全性は明らかとなっている。

435

(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

S. cerevisiae ATC1562株の培養は、通常の飼料添加物製造に用いられる製造器材を用いており、安全性は明らかとなっている（参考資料13）。

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

440

最終生産物（25-ヒドロキシコレカルシフェロール原体）について、PCR法で組換え体の混入の有無を確認したところ、*S. cerevisiae* ATC1562株に由来するDNA断片は検出されなかった（検出限界は300 fg/mL）（参考資料10）。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

445

アセチルCoAから一連の過程を経て8,24-コレスタジエノール（ザイモステロール）を生成し、ザイモステロールから、7,24-コレスタジエノールを経て25-ヒドロキシコレカルシフェロールの前駆体である(5,7,24-)コレスタトリエノールを生成する生成経路は既存の非組換え酵母が有している（参考資料12）。

450

25-ヒドロキシコレカルシフェロールの製造工程において、遺伝子組換え酵母*S. cerevisiae* ATC 1562株の培養工程を経た時点で得られるステロール画分には、25-ヒドロキシコレカルシフェロールの前駆体であるコレスタトリエノールのほか、ザイモステロール及び7,24-コレスタジエノールが含まれている可能性が考えられる。

455

また、3ロットの25-ヒドロキシコレカルシフェロールについてHPLC法による分析を実施した結果、含量は97%以上と高度に精製されており、不純物には前駆体のコレスタトリエノールから25-ヒドロキシコレカルシフェロールとなる過程で生じたと考えられるステロールのみを含むことが確認された（参考資料14）。なお、これらの物質は、いずれも動物がコレカルシフェロールを代謝した際に一般に生じる物質であり、自然界にも存在するものであることから、安全上の問題はないと考えられる。

460

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

465

25-ヒドロキシコレカルシフェロールは、*S. cerevisiae* ATC1562株からコレスタトリエノールを抽出し、これを前駆体として化学合成による生成、結晶化を経て精製される（成分規格の規格として94%以上と設定）。

HPLC法により、3ロットの25-ヒドロキシコレカルシフェロール結晶を分析した結果、それぞれ97.0、97.6及び97.3%と高度に精製されていた（参考資料14）。

470 (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
有害性が示唆される常成分は含まれない。

(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

475 アメリカにおいて、2007年に一般に安全とみなされる物質（GRAS物質）
として認定され（Federal Register Vol.72,No.51,2007年）、ブロイラー飼料
に上限69 ppbの添加が認められている（参考資料15）。

EUにおいて欧州食品安全機関（EFSA）のFEEDAP（the Panel on
Additives and Products or Substances used in Animal Feed）により評価さ
480 れ、2006年にはブロイラー用に100 µg/kg飼料、採卵鶏用に80 µg/kg飼料、七
面鳥用に100 µg/kg飼料を上限とした添加が、2009年には豚用に50 µg/kg飼料
を上限とした添加が認められている（参考資料16,17）。

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
485 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

490 ATC1562 株を利用して生産された 25-ヒドロキシコレカルシフェロール
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への安全上の問題はない
と判断された。

V 参考資料

参考文献

- 1 GILSP 声明書（社外秘）
- 2 ・Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances
used in Animal Feed (FEEDAP) on the Safety and Efficacy of the Product
Sel-Plex 2000 as a feed additive according to Regulation (EC) No
1831/2003. The EFSA Journal, 348, 1-40 (2006)
- ・Scientific Opinion on the safety and efficacy of Biosprint® (*Saccharomyces
cerevisiae*) for piglets (EFSA Panel on Additives and Products or
Substances used in Animal Feed (FEEDAP)). The EFSA Journal, 8
(10):1864 (2010)
- 3 ベクターpUC8 誘導体 (GenBank L09132.1) に関する事項
- 4 コレスタトリエノール生産菌 *Saccharomyces cerevisiae*(*S. cerevisiae*) ATC
1562 株の構築方法(社外秘)
- 5 プラスミド A の塩基配列(社外秘)
- 6 プラスミド B の塩基配列(社外秘)

- 7 プラスミド A のプラスミド地図(社外秘)
- 8 プラスミド B のプラスミド地図(社外秘)
- 9 ・Transcription of the bacterial β -lactamase gene in *S. cerevisiae*. Karin D.Breunig et al. Gene, 20, 1-10 (1982)
・Yeast /*E. coli* Shuttle Vectors with Multiple Unique Restriction Sites. John E. Hill et al. YEAST, 2, 163-167 (1986)
- 10 Opinion on the production of Hyd (25-OH-D₃) by a genetically modified yeast strain (社外秘)
- 11 Statement / Study on the possible occurrence of peptides that have toxic or allergenic properties in *S. cerevisiae* ATC 1562 (社外秘)
- 12 酵母におけるアセチル CoA からコレスタトリエノールまでの生合成経路 (社外秘)
- 13 DSM document on Fermentation Equipment (社外秘)
- 14 Certificate of Analysis of 25-OH-D₃ 及び HPLC 分析方法 (社外秘)
- 15 Part 584 Food Substances Affirmed as Generally Recognized as Safe in Feed and Drinking Water of Animals. Federal Register: Vol.72, No.51 (March 16, 2007)
- 16 Commission Regulation (EC) No 1443 / 2006 of 29 September 2006 concerning the permanent authorizations of certain additives in feedingstuffs and an authorization for 10 years for a coccidiostat. Official Journal of the European Union: (September 30, 2006)
- 17 Scientific Opinion: Safety and efficacy of 25-hydroxycholecalciferol as a feed additive for poultry and pigs (Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed). The EFSA Journal, 969, 1-32 (2009)
- 18 Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with Nonhomologous DNA: Illegitimate Integration of Transforming DNA into Yeast Chromosomes and *In Vivo* Ligation of Transforming DNA to Mitochondrial DNA Sequences. Robert H. Schiestl *et al.* Molecular and Cellular Biology, 13, 2697-2705 (1993)
- 19 挿入遺伝子のコピー数に関する資料 (社外秘)
- 20 *Saccharomyces cerevisiae* Final Risk Assessment, U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1997)
- 21 *S. cerevisiae* ATC1562 株に挿入されたプラスミドの単離と配列決定 (社外秘)