

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

**ASP595-1 株を利用して生産された
フィターゼ**

**平成 28 年 8 月 9 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	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	7
(6)	組換え体に関する事項	8
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	9
(1)	組換え体の混入を否定する事項	9
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	9
(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	11
IV	審議結果	11
V	参考文献及び参考資料	11

「ASP595-1 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 「ASP595-1 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「PhyzymeXP フィターゼ」とする。）について、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

10

添加物：ASP595-1 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：PhyzymeXP

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：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

15

申請者：ダニスコジャパン株式会社

開発者：Verenium Corporation、Danisco UK Ltd

20

PhyzymeXP 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、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 38399 株（以下、「ASP000 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、「*appA* 遺伝子」とする。）を導入して作成した ASP595-1 株により生産されたフィターゼである。

25

我が国では、遺伝子組換え微生物により生産されたフィターゼが、平成 12 年に 2 件承認されている。構造解析や生化学的解析により、これらのフィターゼと PhyzymeXP フィターゼの同等性が確認された。

30

また、宿主である ASP000 株、*appA* 遺伝子の供与体である *E.coli* B 株及び生産菌である ASP595-1 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。

なお、PhyzymeXP フィターゼは、海外で製造され日本に輸入される予定である。

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、PhyzymeXP 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

PhyzymeXP フィターゼは、ASP595-1 株に導入された *E.coli* B 株由来の *appA* 遺伝子によって産生される。既存のフィターゼであるナツフォス（飼料及び飼料添加物の成分規格等に関する省令（昭和 51 年 7 月 24 日農林省令第 35 号）別表第 2 の 8 フィターゼ（その 2 の（2）））及びロノザイム P（同フィターゼ（その 2 の（1）））を比較対象として、成分、構造解析、生化学的解析（酵素活性、至適 pH、至適温度及びグルコシル化パターン）、機能的解析（鶏及び豚を用いた試験）を実施した。その結果、アミノ酸配列の相同性に関して差異が認められたが、立体構造の相同性、pH 特性等の生化学的性質の同等性、摂取時の機能の同等性などから PhyzymeXP フィターゼが既存のフィターゼと同等であることが確認された（Bush *et al.*, 1991、Kessler *et al.*, 1992、Sisk *et al.*, 1994、Casey *et al.*, 1995、Wojczyk *et al.*, 1996、Noji *et al.*, 1997、Panchal and Wodzinski, 1998、Matthey *et al.*, 1999、Sheibani, 1999、Wyss *et al.*, 1999、Ziegler *et al.*, 1999、Farrell *et al.*, 2000、Lim *et al.*, 2000、Dilger *et al.*, 2004、Brana *et al.*, 2006、Sands and Kay, 2007、Santos *et al.*, 2008、Jones *et al.*, 2010、参考資料 1、2、3）。

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 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

S. pombe は、自然界に広く存在する酵母で、古くから様々な飲料の発酵に利用されており、人や動物は曝露した経験を有している（小崎, 1992、Adejemilua, 1995、吉沢, 1995、大塚, 2006）ことから、毒性及び病原性を有さない、安全性の明らかな微生物であると考えられる。また、*S. pombe* に関する遺伝子及び表現型の特性は十分に解明されており（Gutz *et al.*, 1974）、安全性を疑う報告はなく、*S. pombe* は取扱い及び保存に関して最小限の安全処置で十分なバイオセーフティーレベル 1 の微生物に分類される。

挿入遺伝子及びベクターは、分子量及び制限酵素による切断地図等が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでおらず、組換え体の外界での安定性を増大させるものでなく、遺伝子の伝達性を有さない。

組換え体の ASP595-1 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、ASP595-1 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

ASP595-1 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、ASP595-1 株により生産される PhyzymeXP フィターゼは、家禽及び豚の飼料に添加することにより、飼料中に含まれるリンの利用効率を高め、糞便中に排泄されるリン濃度を減

小さく、環境への負荷を抑えることができるとされている (Dilger *et al.*, 2004、Brana *et al.*, 2006、Sands and Kay, 2007、Santos *et al.*, 2008、Jones *et al.*, 2010)。

80 (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：*Schizosaccharomyces pombe* ATCC38399株 (本文中、「ASP000株」と記載)

85 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。)

Parizaら (Pariza and Foster, 1983、Pariza and Johnson, 2001)、国際食品バイオテクノロジー委員会のガイドライン並びにOECDガイドラインに準拠した評価により、*S.pombe*は宿主微生物として病原性及び毒性のない微生物としての基準を満たしていると考えられた。

90 また、*S.pombe*が有害生理活性物質を産生するという報告はない (Hurley *et al.*, 1987)。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

95 *Schizosaccharomyces*属は種々の発酵飲料中から分離されているが、一般にヒトの腸管に定着し、害を与える微生物ではないとされており (Skinner *et al.*, 1964)、ASP000株もヒト及び家畜に対しては寄生性や付着性は有していないと考えられた。

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

100 ASP000株は、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。

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

105 *S. pombe* は、50%グルコース-酵母エキス培地中で増殖が可能であり、グルコース、スクロース、マルトース及びラフィノースを発酵する (Slooff, 1970)。また、*S. pombe* は多糖デキストリンも発酵でき、一般的なビール酵母とは異なる。酢酸に対して高い増殖耐性を示す (Adejmilua, 1995)。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

110 出芽によって増殖する *Saccharomyces cerevisiae*と異なり、*S. pombe* は分裂によって増殖する。

115 *S.pombe*は、単細胞の二形性酵母であり、特定の条件下では真性菌糸が形成される。*S.pombe*は2つの接合型を持ち、融合して二倍体接合体を形成する。一般に、接合体は減数分裂によって4~6個の球形~楕円体の一倍体子嚢胞子を形成する (Slooff, 1970、Gutz, 1974、Sabatinos and Forsburg, 2010)。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

120 *S.pombe* は、家畜用の飼料として利用された歴史はないが、自然環境中に常在し（小崎, 1992、Adejemilua, 1995、吉沢, 1995、大塚, 2006）、家畜は一般的に曝露していると考えられること、*S. pombe*及び*S. pombe*の培養成分を鶏に6日間与えた成長試験において、それらの投与に起因する影響が認められていないこと（参考資料4）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。

125 ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

130 *S. pombe*は、50%グルコース-酵母エキス培地中で増殖が可能であり、増殖の最適温度は30~32°C付近、増殖可能な最高温度は40~42°Cである。接合と孢子形成の適温は25°Cであり、29°C以上では接合及び孢子形成は起こらない（Sabatinos and Forsburg, 2010、Slooff, 1970）。アルコール産生は42°Cでも緩やかに進行するが、有機酸産生は34~38°Cで抑制される（Ferreira, 1959）。最少培地による研究では、イノシトール、パントテン酸、ニコチン酸及びビオチンが不可欠な成長因子であることが明らかにされている（Slooff, 1970）。また酵母エキス-糖培地においては酵母エキス：グルコース比が1：5を超えると増殖に抑制が見られ、この場合の制限要因が酵母エキスであることが示唆されている（Perez-Guevara and Strehaiano, 1994）。

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

140 *S. pombe*は、一般的な酵母病原体とは分類学的に異なる（Berbee and Taylor, 1993）。*Schizosaccharomyces*属は上記（3）のイのとおり、病原性及び有害生理活性物質の生産に関する安全性上の懸念はないと考えられた。

（4）ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

145 挿入遺伝子の宿主への導入に用いられた2つの発現プラスミドは、*E. coli B*由来の *appA* 遺伝子のクローニングベクターとしてプラスミド pQE60(The QIAexpressionist, 2003)、大腸菌/酵母用シャトルプラスミドとしてプラスミド pTL2P3M5、プラスミド pTL2M5-XL及びプラスミド pTL2M5S-XUを使用して作成されている。これらのプラスミドは全て大腸菌由来のバックボーンを持ち、クローニングのホストとして大腸菌を使用している。

150

イ 性質に関する事項

（ア）DNAの分子量を示す事項

155 プラスミド pQE-60の分子量は3.4kbpである（The QIAexpressionist, 2003）。プラスミド pTL2P3M5、プラスミド pTL2M5-XL及びプラスミド pTL2M5S-XUの分子量はそれぞれ5.14kbp、8.4kbp及び6.5kbpである（参考資料5）。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

160 プラスミドpQE60、プラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XU の制限酵素による切断地図は明らかとなっている (参考資料5)。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

165 プラスミドpQE60、プラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XU に、病原性又は感染性をコードする有害な塩基配列は持たないことが明らかとなっている (The QIAexpressionist, 2003、参考資料6)。したがって、2つの発現プラスミドにも、病原性又は感染性をコードする有害な塩基配列は含まれない。

ウ 薬剤耐性に関する事項

170 プラスミドpQE60は、抗生物質アンピシリンに対する耐性を付与する *bla* 遺伝子を有する。またプラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XUは、*bla* 遺伝子及び抗生物質ネオマイシンに対する耐性を付与する *NeoR* 遺伝子を有する。*NeoR* 遺伝子は2つの発現プラスミドの構築途中で除去され (参考資料5)、*bla* 遺伝子は発現プラスミドが形質転換に用いられる前に、制限酵素によって切断除去されている (参考資料7)。生産菌ASP595-1株のゲノムに *bla* 遺伝子が存在しないことは、PCR法によって確認されている (参考資料8)。

エ 伝達性に関する事項

180 プラスミドpQE60、プラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XU は複製起点 (*ori*) を有し、*E. coli* 株内で複製する能力を有しているが、これらのプラスミドより構築された2つの発現プラスミドが形質転換に用いられる前に、複製起点は除去されているため、生産菌ASP595-1株中の導入遺伝子は自己複製することはできず、水平伝搬の可能性もない (参考資料7)。

185 オ 宿主依存性に関する事項

プラスミドpQE60、プラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XU は *E. coli* 由来であり、これらのプラスミドの複製には *E. coli* が必要であることから、宿主依存性は高いと考えられている。

190 カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

E. coli からPCRにより単離、増幅した *appA* 遺伝子、プラスミドpQE60、プラスミドpTL2P3M5、プラスミドpTL2M5-XL及びプラスミドpTL2M5S-XU を用い、制限酵素処理及びライゲーションにより2つの発現プラスミドを作成した (参考資料5)。

195 なお、2つの発現プラスミド構築過程において、挿入遺伝子に変異が生じていないことがDNAシーケンシングにより確認されている (参考資料9、11)。

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

200 2つの発現プラスミドは酢酸リチウム法 (Okazaki *et al.*, 1990) により宿主に導入されている (参考資料7)。

2つの発現プラスミドに由来する発現カセットの生産菌ASP595-1株への挿入位置は、サザンプロテイング法、PCR法及び挿入部近傍配列のDNAシーケンシングにより、明らかとなっている。

205 (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

appA 遺伝子の供与体は、*E. coli* B株である。

210 供与株は、1930年代後半～1940年代前半に分離され、American Type Culture Collectionに*E. coli* B ATCC 11303として保管されており、病原性及び有害物質の産生がないことが証明されている (Federal Register, 2001)。

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

215 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ている。

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

220 酢酸リチウム法により2つの発現プラスミドが宿主へ導入された後、相同組換えにより発現カセットが*S. pombe*ゲノムに部位特異的に組み込まれている。

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

225 各発現カセットのプロモーターは、ヒトCMV (サイトメガロウイルス) 初期即時型プロモーター断片 (561 bp) である。このプロモーターは、薬物療法及び遺伝子療法のためのプロモーターとして広く使用されている。

(イ) ターミネーターに関する事項

230 各発現カセットのターミネーターは、ヒトリポicolチン1のターミネーターと3' 非翻訳領域 (217 bp) である (Chung *et al.*, 1999、Idiris *et al.*, 2010)。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

235 2つの発現プラスミド由来である挿入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 (参考資料7)。

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

宿主ASP000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 (参考資料6)。

- 240 (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6)。
- (ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項
宿主ASP000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にな
245 っている(参考資料7)。
また、導入された遺伝子の挿入位置及びコピー数は明らかとなっている(参考
資料9、10、12)。
- オ 純度に関する事項
250 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(参考資料6)。
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が確
認されており、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されている。
- カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項
255 2の(4)のウに記載のとおり、2つの発現プラスミドに含まれる bla 遺伝子は、
発現プラスミドが形質転換に用いられる前に、制限酵素により切断除去されてい
る(参考資料7)。生産菌ASP595-1株のゲノムに bla 遺伝子が存在しないことは、
PCR法によって確認されている(参考資料8)。
- 260 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
生産菌ASP595-1株における挿入遺伝子の近傍配列について、DNAシークエン
ス及びGenenious Pro 5.5.6 プログラム(Biomatters Inc, New Zealand)を用い
てORFの検索を行った結果、遺伝子導入による未知のORFの形成を含む意図しな
265 い変化は発生していないことが確認されている(参考資料9)。
また、Phyzyme XPフィターゼの製造用原体によるSDS-PAGE分析の結果、ほ
ぼPhyzymeXPフィターゼのみが検出され、他の酵素活性を調べた結果、フィタ
ーゼ活性と比べ非常に低い活性しか測定されなかった(参考資料13)。
- 270 (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。)
生産菌ASP595-1株に導入されたのはフィターゼの生合成に関与する遺伝子群
であり、病原性等を付与するものはない。
- 275 イ 宿主との差異に関する事項
生産菌ASP595-1株は、 $appA$ 遺伝子を含む発現カセットが導入されることによ
りフィターゼ生成能が付与されていること以外に、宿主ASP000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

宿主ASP000株と生産菌ASP595-1株の生存及び増殖能力に相違はなく、生存及び増殖が可能となるのは温度、pH、栄養素等の条件が揃う場合に限られる。

285 エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

生産菌ASP595-1株は生存及び増殖能力に関し、宿主ASP000株と相違はなく同じ制限を受ける。

オ 不活化法に関する事項

290 0.1% w/v NaOHで処理する、又は90°Cで10分間加熱することにより、宿主ASP000株同様、生産菌ASP595-1株を完全に死滅させる事が可能である。最終製品中に生産菌ASP595-1株は存在しないことが確認されている(参考資料15)。

3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

295 (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

PhyzymeXPフィターゼの製造には、生産菌ASP595-1株以外に、飼料添加物の製造原料としての使用実績を有する原料が使用される(参考資料14)。また、すべての原料について社内規格(該当するFood Chemicals Codex (FCC) 基準と一致)に沿って、使用前に品質の検査を行なっている。

300 フィターゼの回収工程では、クエン酸、クエン酸ナトリウム及び水酸化ナトリウムを状況に応じて使用する。回収工程の細胞分離、清澄化及び仕上げろ過においてプレート&フレームろ過を行う場合には、食品グレードの珪藻土を使用する。

305 回収した濃縮物のpH調整の緩衝剤として、クエン酸、クエン酸ナトリウム及び水酸化ナトリウムを用い、さらに塩化ナトリウム及びソルビトールを加えて製剤化する。これらはいずれも食品添加物の規格を満たしている。

(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

添加物の製造で長年の使用実績がある飼料添加物の製造器材を用いている。

310 PhyzymeXPフィターゼの製品化までのいずれの工程も適正な工程管理と品質管理が実施されている。

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

315 設定した製造方法により製造したPhyzymeXPフィターゼに生産菌ASP595-1株が含まれていないことは、ドットプロットハイブリダイゼーション法により確認されている(参考資料15)。また、PhyzymeXPフィターゼの規格検査に、生産菌ASP595-1株が含まれていないことを確認する項目が設定されている(参考資料16)。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

320 生産菌ASP595-1株を用いて製造されたPhyzymeXPフィターゼの製造用原体3

ロットについて、自社規格への適合性を確認し、異常は認められなかった（参考資料16）。また、ラットを用いた毒性試験を実施した結果、経口LD₅₀はフィチン酸分解力単位として5万単位以上/kg体重であり、*in vitro* 及び*in vivo* の遺伝毒性試験（復帰突然変異試験、前進突然変異試験及び小核試験）の結果はいずれも陰性であった（参考資料17）。さらに、鶏及び豚を用いた飼養試験においても、畜産物の生産に悪影響を及ぼす事象は認められなかった（Dilger *et al.*, 2004、Brana *et al.*, 2006、Sands and Kay, 2007、Santos *et al.*, 2008、Jones *et al.*, 2010、参考資料17）。したがって、PhyzymeXPフィターゼに含まれる、製造に由来する不純物が家畜の健康に影響を及ぼすことはないと考えられた。

なお、Phyzyme XPフィターゼは、確立された規格基準（Food Chemical Cordex (FCC) に記載されている酵素製剤に関する純度基準を含む）を有し（Food Chemical Cordex, 1996、参考資料16）、FAO/WHO合同食品添加物専門家会議（JECFA）が提案した食品加工に使用する酵素製剤の一般規格（Compendium of Food Additive Specifications Addendum 9）に適合しているほか、FCC及びJECFAに記載されている重金属、鉛、生菌数、大腸菌群数、サルモネラ菌及び大腸菌に関する規格を満たしている。抗菌活性及びマイコトキシンの規格はJECFA規格に適合している（参考資料16）。

（3）精製方法及びその効果に関する事項

遠心又は回転真空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。これらの工程の工程管理及び品質管理によって最終製品中に生産菌ASP595-1株及び有害な不純物が存在しないことが確認されている（Food Chemical Cordex, 1996、参考資料16）。

（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

均一な機能を示す製品を供給するため、Phyzyme XPフィターゼのすべてについて、販売に供する製剤化前にフィターゼ活性及びその他の品質管理項目について分析を行っている。

また、PhyzymeXPフィターゼの製造用原体3ロットについて、飼料添加物成分規格（酵素力単位、性状、純度試験及び強熱残分）への適合性を確認した結果、すべて規格値の範囲内であったことから、本添加物の常成分の変動の範囲も従来の添加物と同じであると考えられた（参考資料18）。

なお、これまでのPhyzymeXPフィターゼ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報告はない（参考資料16）。

（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

Phyzyme XPフィターゼは、米国、EU等の53カ国で飼料添加物として承認・販売されている。このうち、米国、EU、カナダ及びオーストラリアでは、遺伝子組換え微生物を用いた飼料添加物としての安全性評価が行われ、その安全性が確認されている。

- 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

365

該当しない。

IV 審議結果

ASP595-1 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。

370

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. Adejemilua F. 1995, Processing and profile of Sorghum malt. MBAA Technical Quarterly, 32:15-18.
2. Berbee M. L. and J.W. Taylor, 1993, Dating the evolutionary radiations of the true fungi. Canadian Journal of Botany. 71:1114-1127.
3. Brana D. V., M. Ellis, E. O. Castaneda, J. S. Sands and D. H. Baker, 2006, Effect of a novel phytase on growth performance, bone ash, and mineral digestibility in nursery and grower-finisher pigs. Journal of Animal Science. 84:1839-1849.
4. Bush G. L., A. Tassin, H. Friden and D. I. Meyer, 1991, Secretion in Yeast, Purification and *in vitro* transcription of chemical amount of prepro- α -factor. Journal of Biological Chemistry. 266:13811-13814.
5. Casey J.L., P.A. Keep, K.A. Chester, L. Robson, R.E. Hawkins and R. H. J. Begent, 1995, Purification of bacterially expressed single chain Fv antibodies for clinical applications using metal chelate chromatography. J. Immunol. Methods. 179:105-116.
6. Chung B. H., D. J. Seo and S. W. Nam, 1999, High-level secretory production of recombinant human lipocortin-I by *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry. 35:97-101.
7. Dilger R. N., E. M. Onyango, J.S. Sands and O. Adeola, 2004. Evaluation of microbial phytase in broiler diets. Poultry Science. 83:962-970.
8. Farrell P. J., L. A. Behie and K. Iatrou, 2000, Secretion of cytoplasmic and nuclear proteins from animal cells using novel secretion modules. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics 41:144-153.
9. Federal Register, 2001, Department of health and human services 66:42555-42556, 64051-64052.
10. Ferreira J. D., 1959, The Growth and Fermentation Characteristics of Six Yeast Strains at Several Temperatures. American Journal of Enology and Viticulture. 10:1-7.

11. Food Chemicals Codex. 1996, General tests and assays, Phytase activity. National Academy Press, Washington, p.808–810.
12. Gutz H., H. Heslot, U. Leupold and N. Leprieno. 1974, *Schizosaccharomyces pombe*. Handbook of Genetics: Volume 1: Bacteria, Bacteriophages, and Fungi: Plenum press-New York and London, p.395-436.
13. Hurley R., J. de Louvois and A. Mulhall. 1987, Yeasts as human and animal pathogens and Biology of the cell cycle in Yeasts. The yeasts. vol. 1, second edition, Biology of yeasts, Academic Press. p.207-213.
14. Idiris A, H. Tohda, M. Sasaki, K. Okada, H. Kumagai, Y. Giga-Hama Y and K. Takegawa 2010, Enhanced protein secretion from multiprotease-deficient fission yeast by modification of its vacuolar protein sorting pathway. Applied Microbiology and Biotechnology. 85:667-677.
15. Jones CK, 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. 2010, 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.
16. Kessler D.A., M. R. Taylor, J. H. Maryanski, E. L. Flamm and L. S. Kahl. 1992, The safety of foods developed by biotechnology. Science. 256:1747-1749, 1832.
17. Lim D, S. Golovan, C. W. Forsberg and Z. Jia. 2000, Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. Nature Structural & Molecular Biology. 7:108-113.
18. Matthey B, A. Engert, A. Klimka, V. Diehl and S.Barth. 1999, A new series of pET-derived vectors for high efficiency expression of *Pseudomonas* exotoxin-based fusion proteins. Gene. 229:145-153.
19. Noji H., R. Yasuda, M. Yoshida and K. Kinoshita Jr. 1997, Direct observation of the rotation of F1-ATPase. Nature 386:299-302.
20. OECD 1992, Safety considerations of Biotechnology.
21. Okazaki K, N. Okazaki, K. Kume, S. Jinno, K. Tanaka and H. Okayama. 1990, High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Research. 18:6485-6489.
22. Panchal T. and R. J. Wodzinski. 1998, Comparison of glycosylation patterns of phytase from *Aspergillus niger* (*A. ficuum*) NRRL 3135 and recombinant phytase. Preparative Biochemistry and Biotechnology. 28:201-217.
23. Pariza M. W. and Foster E. M., 1983, Determining the Safety of Enzymes Used in Food Processing: Journal of Food Protection 46: 453-468
24. Pariza M. W. and Johnson E. A., 2001, Evaluating the Safety of Microbial Enzyme Preparations Used in Food Processing: Update for a New Century: Regulatory Toxicology and Pharmacology 33: 173-186

25. Perez-Guevara F., J.P. Riba and P. Strehaiano. 1994, Effect of yeast extract/sugar ratio on growth of *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioresource Technology*. 48:13-15.
26. Sabatinos S.A. and S. L. Forsburg. 2010, Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*. 470:759–795.
27. Sands J. S. and R. M. Kay. 2007, Phyzyme XP phytase improves growth performance and nutrient utilization in wheat-based diets fed to weaned pigs. *Livestock Science*. 109:264-267.
28. Santos F. R., M. Hruby, E. E. M. Pierson, J. C. Remus and N. K. Sakomura. 2008, Effect of Phytase Supplementation in Diets on Nutrient Digestibility and Performance in Broiler Chicks. *Journal of Applied Poultry Research*. 17:191-201.
29. Sheibani N. 1999, Prokaryotic gene fusion expression systems and their use in structural and functional studies of proteins. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 29:77-90.
30. Sisk W.P., J. D. Bradley, R. J. Leipold, A. M. Stoltzfus, M. Ponce de Leon, M. Hilf, C. Peng, G.H. Cohen and R. J. Eisenberg. 1994, High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus-infected insect cells. *Journal of Virology*. 68:766-775.
31. Skinner C. E., C. W. Emmons and H. M. Tsuchiya. 1964, Chapter XI Biological activities of yeasts: Ecology of yeasts: Henrici's Molds, Yeasts, and Actinomycetes. Second edition John Wiley & Sons, Inc. pp. 315-317.
32. Slooff, W. C. 1970, *Schizosaccharomyces* Lindner. In *The Yeast*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam-London, p.733-755.
33. The QIAexpressionist. 2003, A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins (fifth edition).
34. Wojczyk BS, M. Czerwinski, M.M. Stwora-Wojczyk, D. L. Siegel, W. R. Abrams, W. H. Wunner, S. L. Spitalnik, 1996, Purification of a secreted form of recombinant rabies virus glycoprotein: comparison of two affinity tags. *Protein Expression and Purification*. 7:183-193.
35. Wyss M, L. Pasamontes, A. Friedlein, R. Rémy, M. Tessier, A. Kronenberger, A. Middendorf, M. Lehmann, L. Schnoebelen, U. Röthlisberger, E. Kusznir, G. Wahl, F. Müller, H. W. Lahm, K. Vogel and A.P. van Loon. 1999, Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:359-366.
36. Ziegler FD, J. Cavanagh, C. Lubowski, R.B. Trimble. 1999, Novel *Schizosaccharomyces pombe* N-linked GalMan9GlcNAc isomers: role of the Golgi GMA12 galactosyltransferase in core glycan galactosylation. *Glycobiology*. 9:497-505.

37. 大塚 謙一. 2006, 酒の履歴. 技報堂出版. 175-176.
38. 小崎 道雄, 季 福臨, K. R. Kuswanto, 飯野 久和. 1992, ジャワ島の「酎」醪から分離した酵母. 昭和女子大学大学院生活機構研究科紀要 2:77-82.
39. 吉沢 淑. 1995, 酒の科学 5) 酒造りに使われる主な酵母. 朝倉書店. 24-25.

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. Summary of N-glycosylation sites mapping on the Phyzyme XP (*E. coli* phytase produced in *S. pombe*) sample
2. Biochemical characterization of the expressed DAN Phytase
3. Physical characterization of the expressed DAN Phytase
4. *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) の鶏ひなの成長試験
5. Plasmid construction for Phytase expression
6. Designation of plasmids for Phytase expression
7. Schematic of ASP 595-1 strain construction
8. Absence of antibiotic resistance marker gene
9. Information on DNA sequencing for the inserted site and surrounding areas in the genome of the production strain ASP595-1
10. Restriction enzyme mapping analysis of genomic DNA
11. Letter from Dr. Hiromichi Kumagai
12. Copy number measurement of phytase gene in recombinant *S. pombe* genomic DNA
13. Comparison of impurities in Phyzyme XP product
14. Phyzyme XP の製造方法に関する資料
15. Demonstration of the absence of transformable rDNA sequences in the enzyme preparation
16. Phyzyme XP の規格及び検査方法に関する資料
17. Phyzyme XP の安全性に関する資料
18. フィチン酸分解力試験法に関する資料