

組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

**JPBL001 株を利用して生産された
アルカリ性プロテアーゼ**

**平成 30 年 1 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	2
II	確認対象飼料添加物の概要	2
III	審議内容	2
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	2
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	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	9
(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	10
V	参考文献及び参考資料	10

「JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」に係る安全性確認

I はじめに

「JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」（製品名 RONOZYME ProAct）（以下、「本飼料添加物」とする。）について、平成 29 年 2 月 8 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：JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ

製品名：RONOZYME ProAct

有効成分概要

一般名	EC 番号	CAS 番号	機能
アルカリ性 プロテアーゼ	3.4.21.1	37259-58-8	飼料中のたん白質 の消化率改善

用 途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

15 申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S（デンマーク）

20 本飼料添加物は、消化管におけるたん白質の消化を促進し、飼料中のたん白質利用効率を上昇させるアルカリ性プロテアーゼの生産性を高めるため、*Bacillus licheniformis* Si3 株（以下、「Si3 株」とする。）を宿主として、放線菌 *Nocardiopsis prasina* NRRL18262 株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子（以下、「*pep10R* 遺伝子」とする。）を導入して作成した *B. licheniformis* JPBL001 株（以下、「JPBL001 株」とする。）により生産されたアルカリ性プロテアーゼである。

25 宿主である Si3 株、*pep10R* 遺伝子の供与体である *N.prasina* NRRL18262 株及び生産菌である JPBL001 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。

30 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、本飼料添加物について、「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

35 1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

本飼料添加物は、JPBL001 株に導入された *N.prasina* NRRL18262 株由来の

40 *pep10R* 遺伝子によって産生される。既存のアルカリ性プロテアーゼである PWD-1
及び Alcalase を対象として、成分、構造、生化学的性質（酵素活性、至適 pH）を
比較することで同等性を検討した(参考資料 1,2,3,4,5、X. Lin *et al.* 1995)。その結
45 果、アミノ酸配列の相同性に関して差異が認められたが、いずれもたん白質のペプ
チド結合をエンド型で加水分解するセリンプロテアーゼに分類されること(石井
2007)、また活性部位のアミノ酸残基の種類的一致や立体配置の相同性などから本
飼料添加物が比較した既存のアルカリ性プロテアーゼとアルカリ性プロテアーゼと
50 しての機能が同等であることが認められた。なお、現在流通しているアルカリ性プ
ロテアーゼには今回比較した PWD-1 及び Alcalase とアミノ酸配列の相同性が高く
45 ないものもあり(参考資料 6)、配列の相同性が高くなくても安全性に問題なく使用
されてきた実績があることも確認している。

2 組換え体等に関する事項

50 (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 生産菌 JPBL001株を含む *B. licheniformis* の組換え体が、OECD の優良工業製
造規範 (GILSP) に準拠していることが認められ、工業的使用を許可されるなど
して、これまで安全に利用されてきている (De Boer AS *et al.*, 1994)。

挿入遺伝子及びベクターは、塩基数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 (参考資料10)。

60 組換え体の JPBL001株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 Si3
株と同程度に安全であると考えられる (参考資料10)。

以上のことから、JPBL001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

65 JPBL001株は、飼料添加物アルカリ性プロテア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、
JPBL001株により生産される ProAct アルカリ性プロテアーゼは、飼料に添加す
ることにより、飼料中に含まれるたん白質の利用効率を高め、増体または栄養価
調整のために添加されている結晶アミノ酸の低減に寄与することが期待できる。

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

学名 : *B. licheniformis* Si3 株

75 Si3 株は、*B. licheniformis* Ca63 株 (以下、「Ca63 株」とする。) の孢子形
成能欠損株である。

Ca63 株は自然界から分離された菌株であり、DSMZ (Deutsche Sammlung
von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、ドイツ微生物細胞培養コレク

ション) によって、*B. licheniformis* と同定された。

80 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。）

B. licheniformis が病原性及び有害生理活性物質を生産することは知られていない。国立感染症研究所の病原体等安全管理規定において、*B. licheniformis* はバイオセーフティーレベル（BSL）2 及びBSL3 の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない。また、ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがなく、
85 病原体等のリスク群分類のリスク群1 に分類される。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis 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。

90 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

B. licheniformis が、ウイルス等の外来因子に汚染されたという報告はない。

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

B. licheniformis は自然界に広く分布する孢子形成菌であり、自然環境下において生存及び増殖する能力を有する。一方、宿主であるSi3株は孢子形成能欠損株であるため孢子を形成せず、自然環境下では生存及び増殖する能力は非常に低い。
95

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

100 *B. licheniformis* は他のバクテリアと同様、有性生殖周期を持たず、分裂で増殖する。一般的に、分類学上近縁種同士の微生物の交雑は起こり得るとされているが、自然界において*B. licheniformis* とその近縁種間で交雑が起きたという報告はない。なお、宿主であるSi3株は孢子形成能を欠損しているため、自然環境下で増殖することは難しく、他の微生物と交雑する可能性は低い。

105

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

B. licheniformis は、家禽及び家畜の飼料用のアルカリ性プロテアーゼの生産菌として、長年利用されてきた。

110 ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

B. licheniformis は自然界に広く分布する孢子形成菌であり、栄養源の欠乏等、環境が悪化した場合に細胞内に孢子を形成する。孢子は熱、乾燥、酸、アルカリ等に対して抵抗性を持ち、環境が好転するまで長期間休眠する。

一方、宿主であるSi3 株は孢子形成能欠損株で孢子を形成しないため、自然界でSi3 株が生存及び増殖する可能性は低い。なお、Si3 株の至適生育温度は30～
115 50℃、増殖可能最高温度は55℃であり、90℃付近で死滅する。

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

120 *Bacillus* 属の中で *B. licheniformis* と比較的近い近縁種は、*B. subtilis* 及び *B. pumilus* であるが、EPA の Decision Document によると、これらは *B. licheniformis* と同様、非病原性かつ非毒素産生性とみなされており、毒性物質を産生することが知られている *B. cereus* 等とは明確に区別されるとしている (*Bacillus licheniformis* TSCA)。

125 (4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

挿入遺伝子の宿主への導入に用いられたベクター pJPV002 及び pJPV003 は、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド pE194 (Horinouchi S *et al.* 1982) を基に作製した。

130

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 pE194 の塩基数は 3728bp である。

135 (イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

プラスミド pE194 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

プラスミド pE194 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。

140

ウ 薬剤耐性に関する事項

プラスミド pE194 には、エリスロマイシン耐性を付与する *ermC* 遺伝子を有する。*ermC* 遺伝子は *S. aureus* 由来であり、この遺伝子がコードするアデニンメチラーゼによってエリスロマイシン耐性が付与される (米 EPA)。

145

ermC 遺伝子は発現プラスミドが形質転換に用いられる前に脱落するため、生産菌 JPBL001 株には挿入されない。この遺伝子が生産菌 JPBL001 株に存在しないことは、挿入遺伝子座の解析及びゲノム DNA をサンプルとしたサザンプロット解析により確認されている (参考資料 7, 8)。

150

エ 伝達性に関する事項

プラスミド pE194 は、英国における遺伝子組換え体の封じ込め利用に関する規制法 (*The Genetically Modified Organisms Regulations, 2000*) の中にあるリスクアセスメントに添付された資料 (*Risk Assessment of Genetically Modified Microorganisms other than Eukaryotic viruses*) において、「non-mobilisable (非可動性)」プラスミドとして、他の生体に伝達のリスクを持たないものとして分類されている (*Example of Host-Vector Systems and Access Factors*)

155

オ 宿主依存性に関する事項

160 プラスミドpE194 は*S. aureus* 由来のプラスミドであり、同じグラム陽性細菌である*Bacillus* 属で複製可能であることが知られているが、それ以外の菌で複製することは知られていないことから、宿主依存性は高いと考えられた。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

165 プラスミドpE194に*pep10R* 遺伝子又はその断片及びその他の挿入DNA を組み込むことにより発現ベクターpJPV002 及びpJPV003 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

170 2つの発現ベクターは相同組換えにより宿主に導入されている。2つの発現ベクターに由来する発現カセットの生産菌JPBL001株への挿入位置は明らかとなっている(参考資料9)。

(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

175 *pep10R* 遺伝子の供与体は*N. prasina* NRRL18262 株である。*N. prasina* を含むNocardiosis属は自然界に広く分布している。ヒトへの病原性が報告されている種は、*N. dassovillei*及び*N. synnematoformans*の2種のみである(参考資料16)。*N. prasina*はキチナーゼやアルカリ性プロテアーゼ等産業的に有用な細胞外分泌酵素の生産がよく知られている(参考資料16)一方、当該菌種から病原性及び有害生理活性物質が生産されることは知られていない。

180 なお、*N. prasina*は国立感染症研究所の病原体等安全管理規定別冊1「病原体等にBSL分類等」(平成22年6月)において、バイオセーフティレベル(BSL)2及び3の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない。

185 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ている(参考資料10)。

190 (イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

相同組換えにより発現プラスミドが宿主に部位特異的に組み込まれている。また、Si3株の一部遺伝子は欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより、機能を欠失させている(手順の詳細は参考資料10、11、12)。なお、目的とした領域に各DNAが挿入されていることはシーケンス解析により確認している(参考資料7)。

195

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

200 各発現カセットのプロモーターは、*B. licheniformis* Ca63 株由来の*amyL4199* プロモーター、*B. amyloliquefaciens* DSM 7 株由来の*amyQsc* プ

ロモーター及び*B. thuringiensis subsp.tenebrionis* DSM5526株由来*cryIIIA*プロモーターで構成されるP3 プロモーターを用いている(Widner B *et. al* 2000、Federici B.A. 2005)。

205 (イ) ターミネーターに関する事項

各発現カセットのターミネーターは、*amyL* ターミネーターを用いている。なお、*amyL* ターミネーターは*B.licheniformis* Ca63 株由来*amyL* 遺伝子のターミネーターである。

210 (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

*pep10R*遺伝子発現カセットに含まれる全ての遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

エ 性質に関する事項

215 (ア) 挿入DNAの機能に関する事項

宿主 JPBL001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。本たん白質に対して人工消化液を用いた物理化学的処理に対する感受性を確認したところ、人工胃液では処理開始後30分以内で完全に消化され、人工腸液においては易消化性を示さなかった(参考資料13)。人工腸液において易消化性を示さなかったことについては、当該アルカリ性プロテアーゼが家畜の腸管内で作用することを意図して選抜しているために、アルカリ性条件または腸内たん白質消化酵素等に何らかの耐性を有するためと考えられた。

225 (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

230 宿主 JPBL001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っている。

また、導入されたそれぞれの挿入領域はシーケンス解析によって明らかとなっている(参考資料7)。

オ 純度に関する事項

235 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9)。発現プラスミドは陰イオン交換樹脂のカラムにより精製されたものが用いられており、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

240 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*ermC*遺伝子は導入する過程で脱落しており、生産菌JPBL001株はエリスロマイシン耐性を示

さない。生産菌JPBL001株のゲノムに*ermC*遺伝子が存在しないことは、宿主菌の挿入部位の塩基配列の解析及びゲノムDNAをサンプルとしたサザンブロット解析によって確認されている（参考資料7,8）。

245

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JPBL001株における挿入遺伝子の近傍配列について、The European Molecular Biology Open Software Suite(EMBOSS)のORF 検索用プログラム「Getorf」を使用して、6通りの読み枠でストップコドンからストップコドンに挟まれた30アミノ酸以上のORFの検索を行った結果、合計で174個のORF が検出された。

250

検出されたORFのうち、MvirDBデータベース(C.E.Zhou *et al.*, 2007) を用いて既知の毒性たん白質との相同性を検索したところ、MvirDBデータベースのたん白質が10種類検出された。この10種類のたん白質の毒性について検討したところ、いずれのたん白質も毒性を有する報告はなく、新たに生じたORFが発現したとしても、本酵素製剤中にアレルギー誘発性または毒性を有するたん白質が含まれている可能性は低いと考えられた(参考資料14、15)。

255

260

（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 JPBL001株に導入されたのはアルカリ性プロテアーゼの生合成に関与する遺伝子群であり、病原性及び有害生理活性を付与するものはない。

265

イ 宿主との差異に関する事項

生産菌JPBL001株は、*pep10R*遺伝子が導入されることによりアルカリ性プロテアーゼ生成能が付与されている。導入された形質は病害性または有害生理活性物質に関するものではなく、Si3株の非病原性及び有害生理活性物質の非産出性に影響することはないと考えられた。

270

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

生産菌JPBL001株は孢子形成能欠損株であるため、外界において栄養源の枯渇や乾燥・低温状態など環境が悪化した場合に孢子を形成することができず、長期間休眠することが出来ない。そのため、生産菌JPBL001株が生存及び増殖性を示すのは、実験室の培養装置や酵素製造用の培養タンク内のみとなる。

275

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

生産菌JPBL001株は宿主Si3株と同様、孢子形成能を欠損しているため、自然環境で生存及び増殖する能力が低い。よって、生存及び増殖能力に関し、宿主Si3株と相違はなく同じ制限を受ける。

280

オ 不活化法に関する事項

285 90°Cの加熱及び生石灰(CaO)を用いたアルカリ処理 (pH11以上) によって、
宿主Si3株同様、生産菌 JPBL001株を不活化することが可能である。

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

290 ProActアルカリ性プロテアーゼの製造に用いられる発酵原料、精製・ろ過助
剤、安定化及び製剤化原料を含むすべての製造原料は、いずれも食品に使用され
る品質のものである。また、すべての原料について社内規格は米国Federal
Communications Commission(FCC) に沿って、設定されている。

(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

295 ProActアルカリ性プロテアーゼの製造に用いる発酵器材及びその他の設備 (精
製、製剤化) は、いずれも食品用酵素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ISO 9001 適合の認証を受けている(参考資料16)。

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

300 設定した製造方法により製造したProActアルカリ性プロテアーゼに生産菌
JPBL001株が含まれていないことは、ドットブロット解析により確認されている
(参考資料17)。また、ProActアルカリ性プロテアーゼの規格検査に生産菌
JPBL001株が含まれていないことを確認する項目が設定されており、本飼料添加
305 物を溶解したサンプルを細菌用の寒天培地に塗布し、生育可能な高温(50-55°C)で
生育する細菌が現れないことで確認している。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

310 生産菌JPBL001株を用いて製造されたProActアルカリ性プロテアーゼの製造
用原体について、重金属等の飼料添加物成分規格収載書の規格への適合性を確認
している(参考資料18)。また、原体を被験物質として行った反復投与毒性試験
(短期)を実施した結果、特筆すべき影響は観察されなかった(参考資料19)。同
様に行った復帰突然変異試験及び染色体異常試験においても、変異原性や染色体
315 異常の誘発はないと結論づけられた(参考資料20、21)。したがって、本飼料添加
物に含まれる、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。

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

320 粗ろ過、除菌ろ過 (膜サイズは0.2 μ m)、限外ろ過 (平均分画分子量
10,000) 等の精製工程により、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 JPBL001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。

(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

325 本飼料添加物の製造に用いられる原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造
に用いられてきたものであり、遺伝子組換え技術で構築された生産菌であっても、
生産される生産物の構成・成分の変動の範囲は、従来の酵素剤の変動の範囲内
である。よって、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
えられた。

330

(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

335 ProActアルカリ性プロテアーゼは、2009年にEFSA（欧州食品安全機関）、
2011年にFDA（米国食品医薬局）、2012年にAPVMA（豪州農薬・動物用医薬品
局）において安全性が確認され、飼料中のたん白質の消化率改善の目的で飼料添
加物として使用されている。

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

340 該当しない。

IV 審議結果

345 JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼについて、「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. Nucleotide sequence and expression of kerA, the gene encoding a keratinolytic protease of *Bacillus licheniformis* PWD-1
X. Lin et al., Appl. Environ. Microbiol. vol. 61 (4) 1469-1474 (1995)
2. 多様性を増すセリンプロテアーゼ類の構造と活性：その最新版
石井信一、蛋白質 核酸 酵素 Vol. 52 No. 11 (2007)
3. On the industrial use of *Bacillus licheniformis*: A review.
De Boer AS, Priest F, Diderichsen B. Appl Microbiol Biotechnol.
1994;40(5):595-8.
4. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 別冊 1 「病原体等の B S L 分類等」
(平成 22 年 6 月)
5. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程 (平成 22 年 6 月)
6. *Bacillus licheniformis* TSCA Section 5(h)(4)
Exemption: Final Decision Document
Biotechnology Program Under Toxic Substances Control Act (TSCA),
Environmental Protection Agency (EPA), US, 1997

7. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics.
Horinouchi S, Weisblum B. J Bacteriol. 1982;150(2):804-14
8. The Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 2000 (March, 2000, United Kingdom)
9. Risk Assessment of Genetically Modified Microorganisms other than Eukaryotic viruses (The Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 2000 (March, 2000, United Kingdom))
10. Examples of Host-Vector Systems and Access Factors updated in 1997)
11. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial Enzymes
Widner, B. et. al., Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 25, 204-212 (2000)
12. Insecticidal bacteria: An overwhelming success for invertebrate pathology
Federici, B. A., Journal of Invertebrate Pathology, 89, 30-38 (2005)
13. MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications
C. E. Zhou et. al., Nucleic Acids Research, 35, Database issue, D391-D394 (2007)
14. SCIENTIFIC OPINION, Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (European Food Safety Authority (EFSA) Journal 2015; 13(12):4331)
15. Association of American Feed Control Official, 2014 Official Publication (抜粋)
16. Commonwealth of Australia Gazette
Agricultural and Veterinary Chemicals No. APVMA2, Tuesday, 1 February 2011 (抜粋)

350

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. 10R のアミノ酸配列
2. pH activity profile for Ronozyme ProAct
3. CIBENZA DP 100 の有効成分のアミノ酸配列
4. たん白質分解酵素（プロテアーゼ）バイオフィード®プロ（プロダクトシート）
5. バイオフィード®プロ CT の有効成分のアミノ酸配列
6. The comparison of amino acid sequence between Alcalase and alkaline proteases produced by *Aspergillus* (some are known as food enzyme producers)
7. *DNA sequences in amyL and xylA loci*

8. Absence of genes of concern
9. DNA sequences of pJPV002 and pJPV003
10. Outline of pJPV002 and pJPV003 construction
11. Insertions of pep10R gene expression cassette
12. Gene deletions in JPBL001
13. Digestibility of 10R protein in a product formulation
14. Sequence homology of ORFs in the amyL locus on the genome of ProAct to proteins from MvirDB and allergens
15. Sequence homology of ORFs in the xylA locus on the genome of ProAct to proteins from MvirDB and allergens
16. Novozymes A/S, ISO 9001:2008
17. The analysis of residual DNA in Ronozyme ProAct® by means of dot blot hybridization
18. 分析試験成績書（抗菌活性等：PPA27077、RHFR25A、RHFR23）
／（一財）日本食品分析センター
19. 10R Protease, PPA 26797: A 13-Week Oral (Gavage) Toxicity Study in Rats, Scantox (2007)
20. 10R Protease, PPA 26797: Test for Mutagenic Activity with Strains of Salmonella typhimurium and Escherichia coli (2007)
21. 10R Protease: Induction of Chromosome Aberrations in Cultured Human Peripheral Blood Lymphocytes, Covance (2007)