

# **組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認**

**JPAo002 株を利用して生産された  
フィターゼ**

**平成 31 年 1 月 11 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	4
(5)	挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	5
(6)	組換え体に関する事項	7
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	8
(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	8
(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	8
4	生産物に関する事項	8
(1)	組換え体の混入を否定する事項	8
(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	8
(3)	精製方法及びその効果に関する事項	8
(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	9
(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	9
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	9
IV	審議結果	9
V	参考文献及び参考資料	9

# 「JPAo002 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 「JPAo002 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「JPAo002 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：JPAo002 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：RONOZYME HiPhos

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

15

申請者：ノボザイムズジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S

20

JPAo002 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、*Aspergillus oryzae* IFO4177 株（以下、「IFO4177 株」とする。）を宿主として、*Citrobacter braakii* ATCC51113 株由来のフィターゼ遺伝子（以下、「*CbPhyt#1* 遺伝子」とする。）を宿主株の染色体へ導入して作成した JPAo002 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、これまでに 3 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、アミノ酸配列の相同性に関して差異がみられたものの、生化学的性質、活性部位及び立体構造の比較により、JPAo002 フィターゼとの同等性が確認された。

30

また、宿主である IFO4177 株、JPAo002 フィターゼ遺伝子の供与体である *C. braakii* ATCC51113 株及び生産菌である JPAo002 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、JPAo002 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

JPAo002 フィターゼは、JPAo002 株に導入された *C. braakii* ATCC51113 株由来の *CbPhyt#1* 遺伝子によって産生される。既存のフィターゼ 2 品目を比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的解析（有効成分、酵素活性）、活性部位のアミノ酸残基の比較、立体構造の比較を実施した。その結果、JPAo002 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IFO4177株は、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（Barbesgaard *et al.*, 1992）。

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。

組換え体の JPAo002株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 IFO4177株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、JPAo002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

JPAo002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、JPAo002株により生産されるJPAo002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ることができるとされている

##### (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：*Aspergillus oryzae* IFO4177株（本文中、「IFO4177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（非病原性であること。）

*A. oryzae*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程（国立感染症研究所, 2010a）においては、*A. oryzae* 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さず見込みがなく（Barbesgaard *et al.*, 1992）、病原体等のリスク群分類のリスク群1に分類される（国立感染症研究所, 2010b）。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

*A. oryzae* 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。

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

80 IFO4177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

85 *A. oryzae* は自然界に広く分布する糸状菌であり、自然環境下において生存及び増殖する能力を有する。宿主であるIFO4177株についても同様である。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

90 *A. oryzae* は有性生殖周期は見つかっておらず、無性生殖周期のみが知られているため、不完全菌類に分類されている。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 *A. oryzae* とその近縁種間で交雑が起きたという報告はない。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

95 *A. oryzae* は、家禽及び家畜の飼料用フィターゼの生産菌として、長年利用されてきた。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

100 *A. oryzae* は自然界に広く分布する糸状菌で、至適増殖温度は32–36℃であり、増殖可能最高温度は42℃である。また、80℃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

105 *A. oryzae* の近縁種の病原性については、*Aspergillus section Fumigati* に属する *A. fumigatus* が日和見感染により肺炎の原因菌となることが知られている。また有害生理活性物質の生産について、*A. oryzae* と同じ *Aspergillus section Flavi* に属する *A. flavus*、*A. parasiticus*、*A. nomius*、*A. pseudotamarii* 及び *A. bombycs* は、有害生理活性物質であるアフラトキシンを産生する (Varga *et al.*, 2003)。一方、*A. oryzae* はアフラトキシン生合成遺伝子クラスターを有するものの、ほとんどの菌株において当該遺伝子は転写機能を失っている (Tominaga *et al.*, 2006)。

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に用いられた発現ベクター pJPV009 及び pJPV010は、*E. coli* 由来のプラスミド pUC19を基に作製されている。

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の塩基対数は2686bpである。

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

プラスミドpUC19の機能及び性質は明らかであり、これらに病原性又は感染性を持つ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。

125

ウ 薬剤耐性に関する事項

プラスミドpUC19は、アンピシリン耐性を付与する *amp* 遺伝子を有する。 *amp* 遺伝子は *E. coli* 由来であり、この遺伝子がコードする  $\beta$  ラクタマーゼによってアンピシリン耐性が付与される。

130

なお *amp* 遺伝子は発現ベクターを作製する際に脱落するため、生産菌 JPAo002 株には挿入されない。この遺伝子が生産菌 JPAo002 株に存在しないことは、シーケンス解析により確認されている(参考資料5)。

135

エ 伝達性に関する事項

プラスミドpUC19には伝達性を付与する配列は含まれておらず、水平伝搬の可能性はない。

オ 宿主依存性に関する事項

140

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

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

145

プラスミドpUC19に1コピーの *CbPhyt#1* 遺伝子及びその他の挿入DNAを組み込むことにより発現ベクター pJPV009及びpJPV010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

150

発現ベクター pJPV009及びpJPV010はプロトプラスト形質転換を利用して2段階で順に宿主に導入されている。これらの発現ベクターに由来する発現カセットの生産菌 JPAo002 株への挿入位置は、次世代シーケンス解析により、それぞれ宿主の第4及び第1染色体上であることが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

155

*CbPhyt#1* 遺伝子の供与体は、 *C. braakii* ATCC51113株である。

*C. braakii* を含む *Citrobacter* 属は腸内細菌科に属し、自然界に広く分布している。 *C. braakii* は国立感染症研究所の病原体等安全管理規定において、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。

160

## 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8)

165

### （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、プロトプラスト形質転換法により *CbPhyt#1* 遺伝子発現ユニットが宿主の染色体へ導入される。

170

また、IFO4177株が保有しているシクロピアゾン酸合成遺伝子クラスター及びアフラトキシン合成遺伝子クラスターは、 $\gamma$ 線照射により機能を欠失させている(参考資料9)。

## ウ 構造に関する事項

### （ア）プロモーターに関する事項

175

*CbPhyt#1* 遺伝子のプロモーターは、*na2* プロモーター及び *na2/tpi* プロモーターを用いている。*na2* プロモーターは、*A. niger* BO-1株由来の中性アミラーゼ II をコードする *na2* 遺伝子のプロモーター配列であり、*na2/tpi* プロモーターは、*A. nidulans* Glasgow 野生株のトリオースリン酸異性化酵素をコードする *tpi* 遺伝子と *na2* プロモーター配列を連結したプロモーターである。

180

### （イ）ターミネーターに関する事項

*CbPhyt#1* 遺伝子のターミネーターは、*AMG* ターミネーターを用いている。*AMG* ターミネーターは、*A. niger* BO-1株由来のグルコアミラーゼをコードする *AMG* 遺伝子のターミネーター配列である

185

### （ウ）既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

各ベクター由来の挿入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。

190

## エ 性質に関する事項

### （ア）挿入DNAの機能に関する事項

宿主IFO4177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

### （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

200 宿主IFO4177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。また、導入された遺伝子のコピー数は明らかとなっている。

#### オ 純度に関する事項

205 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7)。  
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

210 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 *amp* 遺伝子  
は導入する過程で脱落しており、生産菌JPAo002株はエリスロマイシン耐性を示  
さない。生産菌JPAo002株のゲノムに *amp* 遺伝子が存在しないことは、シーケン  
ス解析によって確認されている(参考資料5)

#### 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

215 生産菌JPAo002株における挿入遺伝子の近傍配列について、次世代シーケン  
ス解析を用いて決定し、ORF検索プログラムGetorfによるORFの検索を行った  
(参考資料11~13、23~26)。その結果、621個のORFが検出され、これらにつ  
いてMvirDBデータベース(C. E. Zhou et al., 2007)で検索したところ、8個の  
既知の毒性たん白質との相同性が見られたが、いずれも生産菌において発現する  
220 可能性は低く、また万が一発現したとしても毒性を示す可能性は考えにくい。

#### (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。)

225 生産菌JPAo002株が新たに獲得したのは、*CbPhyt#1*遺伝子によるJPAo002フ  
ィターゼの産生能のみであり、これらは病原性等を付与するものではない。

##### イ 宿主との差異に関する事項

230 生産菌JPAo002株は、*CbPhyt#1*遺伝子が導入されることによりフィターゼ産  
生能が付与されている。またシクロピアゾン酸合成遺伝子クラスター及びアフラ  
トキシン合成遺伝子クラスターが欠損しており、これにより有害生理活性物質産  
生リスクが低下している。これらの他、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、IFO4177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。

235

##### ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

JPAo002株が属する *A. oryzae* は自然界に広く分布する糸状菌であり、外界に  
おける生存性及び増殖性を有すると考えられる。

- 240      **エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項**  
            JPAo002株及びIFO4177株の至適増殖温度は32－36℃であり、増殖可能最高温度は42℃である。また、80℃付近で死滅する。
- オ 不活化法に関する事項**
- 245      宿主IFO4177株同様、生産菌JPAo002株は90℃の加熱あるいは生石灰(CaO)を用いたアルカリ処理（pH11以上）によって、不活化する事が可能である。
- 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**
- 250      JPAo002フィタ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り、米国Federal Communications Commission(FCC)等の定めた規格を満たしている。
- 255      **(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**  
            JPAo002フィタ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15）。
- 260      **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**  
            製造されたJPAo002フィターゼ製品に生産菌JPAo002株が含まれていないことは、培養試験及びドットプロット法により確認されている(参考資料16)。またJPAo002フィターゼ製品の社内規格として、生産菌JPAo002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。
- 265      **(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項**  
            生産菌JPAo002株を用いて製造されたJPAo002フィターゼの製造用原体3ロットについて、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。
- 270      **(3) 精製方法及びその効果に関する事項**  
            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JPAo002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。
- 280

(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

285 JPAo002フィターゼ製品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（参考資料18）。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。

290 (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

JPAo002フィターゼは2012年にEUで評価を受けており、鶏用及び豚用の飼料  
添加物として使用されている。

295 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

300 JPAo002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。

V 参考文献及び参考資料

305 参考文献

1. “On the Safety of *Aspergillus oryzae*: a Review” Barbesgaard, P. *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 569-572. (1992)
2. “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)
3. “Molecular analysis of an inactive aflatoxin biosynthesis gene cluster in *Aspergillus oryzae* RIB strains” Tominaga, Mihoko *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 72, 484-490 (2006)
4. “Evolutionary relationships among *Aspergillus* species producing economically important mycotoxins” Varga, J. *et al.*, Food Technology and Biotechnology, 41(1), 29-36 (2003)
5. 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程 別冊1 「病原体等のBSL分類等」”, (2010a)
6. 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程”, (2010b)

参考資料（申請者提出 社外秘）

1. CbPhyt、EcPhyt 及び PIPhyt のアミノ酸配列
2. How much phosphorus can a phytase release? (DSM 社パンフレット)
3. Ronozyme P-(L) (プロダクトデータシート)
4. CERTIFICATE OF FREE SALES、Environmental Protection Agency, Ministry of Environment (Denmark), 11 June 2009
5. Genome sequencing and analysis of the phytase expression strain *Aspergillus oryzae* strain JPAo002
6. Alignment of DNA and protein sequences used in *Citrobacter braakii* production strain
7. 遺伝子導入用ベクター pJPV009 及び pJPV010 の DNA 塩基配列
8. Outline of pJPV009 and pJPV010 constructions
9. Gene deletions in JPAo002
10. *Aspergillus oryzae* BECh2 株に関する情報
11. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV009 on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
12. Sequence homology of ORFs in the inserted expression plasmid pJPV010 on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
13. Sequence homology of ORFs in the AmyC locus on the genome of JPAo001 to proteins from MvirDB and allergens
14. JPAo002 株染色体上における CbPhyt#1 遺伝子のコピー数の推定
15. Novozymes A/S, ISO 9001:2008
16. The analysis of residual DNA in Ronozyme HiPhos by means of dot blot hybridization
17. DNA alignments
18. 分析試験成績書（抗菌活性等：HKFR 7A、HKFR 8A、HKFR 10）／（一財）日本食品分析センター
19. Phytase, PPQ 28623: Toxicity study by oral gavage administration to CD rats for 13 weeks
20. HK Phytase, batch PPQ 28623: Test for mutagenic activity with strains of *Salmonella typhimurim* and *Escherichia coli*
21. Induction of micronuclei in cultured Human peripheral blood lymphocytes
22. 分析試験成績書（フィチン酸分解力単位/g：HKFR 7A、HKFR 8A、HKFR 10）／（一財）日本食品分析センター
23. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking regions of the pJPV009 insertion on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
24. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking regions of the pJPV009 insertion on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
25. Sequence homology of ORFs in the 5' flanking regions of the pJPV010 insertion on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
26. Sequence homology of ORFs in the 3' flanking regions of the pJPV010

- insertion on the genome of JPAo002 to proteins from MvirDB and allergens
27. *C. braakii* Phytase HK Toxbatch PPQ 28623 (*A. oryzae* Cp-1; NN049997) compared with the recovered individual batches HKFR 7A, HKFR 8A and HKFR 10 by means of SDS-PAGE
  28. Purity of CbPhyt1 protein in a product formulation