

# 組換え DNA 技術応用飼料添加物の 安全性確認

*Komagataella phaffii* BSY0007 株を利用  
して生産されたフィターゼ

令和 4 年 7 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 .....                                                                                                            | 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 .....                                                                                            | 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 .....                                                           | 11 |
| IV  | 審議結果 .....                                                                                                            | 11 |
| V   | 参考文献及び参考資料 .....                                                                                                      | 11 |

「*Komagataella phaffii* BSY0007 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 「*Komagataella phaffii* BSY0007 株を利用して生産されたフィターゼ」（以下、「A2P フィターゼ」とする。）について、令和 3 年 10 月 7 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：*Komagataella phaffii* BSY0007 株を利用して生産されたフィターゼ

製品名：Optiphos<sup>®</sup> Plus

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<br>Phytase | <i>myo</i> -inositol-<br>hexakisphosphate<br>6-<br>phosphohydrolase<br>(6-phytase) | 3.1.3.26 | 9001-89-2 | フィチン酸の<br>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、環境負荷を低減

15 申請者：HUVEPHARMA Japan 株式会社

開発者：HUVEPHARMA Japan 株式会社

20 A2P 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、*Komagataella phaffii* BG10 株（以下、「*K.phaffii* BG10 株」とする。）を宿主として、*Escherichia coli* B 株由来の *appA2* 遺伝子に変異を導入した遺伝子（以下、「*appA2P* 遺伝子」とする。）を宿主改変株の染色体へ導入して作成した *Komagataella phaffii* BSY0007 株（以下、「*K. phaffii* BSY0007 株」とする。）により生産されたフィターゼである。

25 日本では、遺伝子組換え微生物により生産されたフィターゼが、これまでに 7 件承認されている。これらのフィターゼのうち 1 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は 96% と高く、A2P フィターゼとの同等性が確認された。

また、宿主である *K. phaffii* BSY0007 株、*appA2P* 遺伝子の供与体である

*Escherichia coli* B 株及び生産菌である *K.phaffii* BSY0007 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、A2P 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

A2P フィターゼは、*K.phaffii* BSY0007 株に導入された *Escherichia coli* B 株由来の遺伝子によって産生される。既存のフィターゼを比較対象として、アミノ酸配列の比較、生化学的性質（有効成分、酵素活性）の比較を実施した。その結果、アミノ酸配列の相同性は 96% と高く、生化学的性質に多少の違いはあるが、A2P 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 *K.phaffii* BG10 株は、分子生物学の研究分野で広く利用されている市販株で、全ゲノム配列が利用可能である。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定におけるバイオセーフティレベル 2 あるいは 3 に相当する病原体等のリストには含まれていない。

ベクター及び挿入遺伝子については、分子量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い。

組換え体の *K.phaffii* BSY0007 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 *K.phaffii* BG10 株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、*K.phaffii* BSY0007 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

*K.phaffii* BSY0007 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、A2P フィ

ターゼは、豚及び家禽（鶏及びウズラ）用配合飼料に添加することにより、飼料中に含まれるフィチンリンの利用効率を高めることができ、それに伴い排泄物中のリンが減少することにより、リンによる環境負荷を低減することが出来る。

(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：*Komagataella phaffii* BG10株（本文中、「*K.phaffii* BG10 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

*K. phaffii* BG10 株は、分子生物学の分野で広く利用されている市販株（BioGrammatics 社、米国カリフォルニア州）であり、有害生理活性物質を生産するという報告はない。また、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定におけるバイオセキュリティレベル2 あるいは3 に相当する病原体等のリストには含まれていない。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

*K. phaffii* が、哺乳動物に対して寄生性又は定着性を持つとの報告はない。

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

*K. phaffii* BG10 株は、バイオセキュリティレベル 1 の微生物のみを取り扱う工場内で閉鎖的に管理されており、病原性の外来因子に汚染されることはない。

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

*K. phaffii* BG10株の原株は、樹液や分解された樹木に生息する野生株であり、グルコース及びメタノールの存在下で増殖する能力を有する。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

*K. phaffii* は窒素飢餓等の限られた条件以外では1倍体にとどまることから、通常の培養条件では遺伝子の伝播や交雑は起こらない。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

*K. phaffii* 自体は、米国において、ブロイラー用のたん白質原料として、10%を超えない配合量での使用が認められている。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

*K. phaffii* BG10 株の生存及び増殖能力を制限する条件は、野生型の条件と変わらない。

100

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

*K. phaffii* が属する *Komagataella* 属には、病原性及び有害生理活性物質を生ずるとの報告はない

105

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

*K. phaffii* BG10 株の形質転換には、導入用プラスミド pBSYPDF-MF-AppA2P を用いている。

110

イ 性質に関する事項

(ア) DNA の分子量を示す事項

pBSYPDF-MF-AppA2P の塩基数は 4,583 bp である。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

115

pBSYPDF-MF-AppA2P 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

pBSYPDF-MF-AppA2P 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生産する塩基配列は含まれていない。

120

ウ 薬剤耐性に関する事項

pBSYPDF-MF-AppA2P にはゼオシン耐性を付与する *ZeoR* 遺伝子が組み込まれている。

125

エ 伝達性に関する事項

pBSYPDF-MF-AppA2P には、伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

オ 宿主依存性に関する事項

pBSYPDF-MF-AppA2P の複製には *E. coli* が必要である。

130

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

pBSYPDF\_blunt1 と MF-AppA2 領域をギブソン・アセンブリ法で繋ぎ合わせ、

導入用プラスミドpBSYPDF-MF-AppA2Pを構築した。

135 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

直線化したpBSYPDF-MF-AppA2Pは、電気穿孔法により導入し、選択培地で *K. phaffii* BSY0007株を選択した。

また、*K. phaffii* BSY0007株についてillumina及びPacBioによる全ゲノムシーケンスの解析を行い、挿入位置及びそのコピー数は明らかとなっている。

140

(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

以下に詳細を示す。

| 挿入断片                             | 供与体の由来                                                             | 性質・機能                                                                        |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| ギ酸デヒドロゲナーゼプロモーター領域 (PDF)         | <i>Hansenula polymorpha</i><br>(以下、 <i>H. polymorpha</i> とする。)     | <i>H. polymorpha</i> のギ酸デヒドロゲナーゼのプロモーターであり、A2P フィターゼの発現誘導に使用される。             |
| $\alpha$ 因子シグナルペプチドコーディング領域 (MF) | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>(以下、 <i>S. cerevisiae</i> とする。) | A2P フィターゼに細胞外への分泌を誘導する。                                                      |
| A2P コーディング領域 (AppA2P)            | <i>E. coli</i>                                                     | A2P フィターゼのコーディング領域である。                                                       |
| アルコールオキシダーゼ AOX1 転写終結末端 (AOX1TT) | <i>K. phaffii</i>                                                  | A2P フィターゼの転写を終結させる。                                                          |
| ILV5 プロモーター領域 (PIVL5)            | <i>K. phaffii</i>                                                  | <i>ILV</i> 遺伝子のプロモーターであり、 <i>K. phaffii</i> における <i>ZeoR</i> 遺伝子の発現誘導に使用される。 |

| 挿入断片                           | 供与体の由来                                | 性質・機能                                                                            |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| EM72 プロモーター領域 (PEM72)          | <i>E. coli</i>                        | <i>E. coli</i> におけるプロモータであり、 <i>E. coli</i> における <i>ZeoR</i> 遺伝子の発現誘導に使用される。     |
| ゼオシン耐性遺伝子コーディング領域 (ZeoR)       | <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> | 産生するたん白質がゼオシンと結合することにより、ゼオシンと DNA の結合を阻害することで、宿主にゼオシン耐性を付与する。（組換え株の選択マーカーとして使用）。 |
| アルコールオキシダーゼ AOD 転写終結末端 (AODTT) | <i>K. phaffii</i>                     | <i>K. phaffii</i> における <i>ZeoR</i> 遺伝子の転写を終結させる。                                 |
| pUC プラスミド複製起点 (pUC ori)        | <i>E.coli</i>                         | <i>E. coli</i> における pUC プラスミドの複製起点である。                                           |

#### 145 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、MF-AppA2 領域を除く pBSYPDF\_blunt1 と人工遺伝子合成サービスを用いて合成した MF-AppA2 領域をギブソン・アセンブリ法で繋ぎ合わせた。

#### 150

##### (イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

宿主 *K. phaffii* BG10 株への発現ベクター pBSYPDF-MF-AppA2P の挿入は、電気穿孔法及び選択培地を利用して2段階で行われている。

#### 155 ウ 構造に関する事項

##### (ア) プロモーターに関する事項

$\alpha$  因子シグナルペプチドと A2P フィターゼの発現は、*H. polymorpha* のギ酸デヒドロナーゼのプロモーターにより制御されている。

#### 160 (イ) ターミネーターに関する事項

$\alpha$  因子シグナルペプチドと A2P コーディング領域のターミネーターは、*K. pahaffii* 由来の *AOX1* 遺伝子のターミネーター配列である。

- (ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項
- 165           ORF検索を行ったところ、多くのたん白質との相同性が確認されたが、これらたん白質は有害作用を持たないと判断された。
- エ 性質に関する事項
- (ア) 挿入DNAの機能に関する事項
- 170           *K. phaffii* BG10 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。
- (イ) DNAの分子量を示す事項
- 175           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
- K. phaffii* BG10 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。
- 180           オ 純度に関する事項
- 各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は明らかとなっている。また、pBSYPDF-MF-AppA2Pはクローン化されている。
- カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項
- 185           使用したマーカー遺伝子は、*ZepR* 遺伝子であり、ゼオシン存在下における増殖を可能とさせるが、A2Pフィターゼの生産培養時にはゼオシンは添加していない。
- 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
- 190           生産菌 *K. phaffii* BSY0007株の挿入遺伝子の近傍配列について、ORFfinderを用いてORF検索を行った。確認されたORFにおいて、Non-redundant protein sequences (nr) をデータベースとしたBLASTp検索を行ったところ、既知のたん白質と相同性を示したものもあったが、有害作用を持つことが知られるたん白質
- 195           はヒットしなかったことから、これらのたん白質は有害作用を持たないと判断された。

(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

- 200 *K. phaffii* BSY0007 株は、A2Pフィターゼの生成能とともに、ゼオシン存在下での増殖能を獲得しているが、いずれの表現型も本来の*K.phaffii* の非病原性に変更を加えるものではない。

イ 宿主との差異に関する事項

- 205 *K. phaffii* BSY0007 株には、A2Pフィターゼコーディング領域を含むカセットを導入することによりA2P フィターゼの生成能が付与されるとともに、ゼオシン存在下における増殖能が付与されているが、これら以外には、宿主である*K. phaffii* BG10 株との差異はない。

210 ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

生産菌である*K. phaffii* BSY0007株と*K. phaffii* 野生株の外界における生存性及び増殖性に相違はない。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

- 215 生産菌である*K. phaffii* BSY0007株と*K. phaffii* 野生株の生存及び増殖能力に相違はない。

オ 不活化法に関する事項

- 220 製造工程中で回収された*K. phaffii* BSY0007株については、水酸化ナトリウムを用いてアルカリ化 (pH10) したのち、オートクレーブ処理 (120℃、45 分間) を行って滅菌し、不活化する。

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

- 225 A2Pフィターゼの製造に用いられる製造原料は、いずれも食品及び飼料に使用される品質のものである。

(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

- 230 A2Pフィターゼの製造に用いる製造器材は、いずれも飼料添加物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FCA (Feed Chain Alliance) 認証を受けている。

#### 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

235 A2Pフィターゼ製造用原体中に、*K. phaffii* BSY0007株由来の残存DNAが含まれていないことは、*ZeoR*コーディング領域及びPDF-A2P-AOX1TTに跨る領域のPCR 解析により確認されている。

##### (2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

240 A2Pフィターゼの製造用原体3ロットについて、重金属及びカビ毒等を分析し、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。

##### (3) 精製方法及びその効果に関する事項

245 遠心分離又はろ過による菌体の除去、及び限外ろ過等により、非酵素成分が除去される。さらにPCR 解析により、最終製品中に*K. phaffii* BSY0007株が有している組換え遺伝子は含まれていないことを確認している。また、SDS・ポリアクリルアミドゲル電気泳動解析により純度は98%以上であることを確認した。

##### (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

250 A2Pフィターゼ製造用原体3ロットについて、飼料添加物の成分規格への適合性を確認した結果、酵素力単位、物理的・化学的性質、純度試験及び強熱残分のいずれも規格値の範囲内であったことから、常成分の変動範囲も従来の飼料添加物と同等であると考えられる。なお、これまで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事例はない。

255 (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  
以下に外国における認可状況を示す（2021年2月時点）。

|     | 国名                                                                                                                                                                   |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| EU  | 域内の 27 か国（アイルランド、イタリア、エストニア、オーストリア、オランダ、キプロス、ギリシャ、クロアチア、スウェーデン、スペイン、スロバキア、スロベニア、チェコ、デンマーク、ドイツ、ハンガリー、フィンランド、フランス、ブルガリア、ベルギー、ポーランド、ポルトガル、マルタ、ラトビア、リトアニア、ルーマニア、ルクセンブルク） |
| 中南米 | アルゼンチン、グアテマラ、コスタリカ、ニカラグア、パナマ、ブラジル、ペルー                                                                                                                                |

|      | 国名               |
|------|------------------|
| 大洋州  | オーストラリア、ニュージーランド |
| アジア  | タイ               |
| アフリカ | 南アフリカ            |
| 中東   | ヨルダン             |

- 260 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

- 265 *K. phaffii* BSY0007 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

- 270 参考文献
1. 食品安全委員会：遺伝子組換え食品等評価書 *Komagataella pastoris* 132 株を利用し  
て生産されたフィターゼ, 2021.
  - 275 2. Sturmberger L, Chappell T, Geier M, Geiera M., Krainerd F., Dayf K.J., Vided U.,  
Trstenjakd S., Schiefera A., Richardsong T., Soriagag L., Darnhofer B., Birner-  
Gruenberger R., Glickf B.S., Tolstorukove I., Cregge J., Maddene K. and Gliederaet  
A.: Refined *Pichia pastoris* reference genome sequence, J Biotechnol, 235:121-  
131.doi:10.1016/j.jbiotec.2016.04.023, 2016.
  - 280 3. 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（抜粋版）, 2020.
  - 285 4. U.S. Food and Drug Administration: Code of Federal Regulations, Title 21. Silver  
Spring; 1993.( [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/textidx?SID=2b0b8a026a583a3664a6df45fc5a73f0&mc=true&node=se21.6.573_1750&rgn=div8)  
SID=2b0b8a026a583a3664a6df45fc5a73f0&mc=true&node=se21.6.573\_1750&rgn=di  
v8)

5. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) : Update of the list of QPS - recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 11: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2019. EFSAJournal, 2020;18 (2) 5965, 2020.
6. Association of American Feed Control Officials: 2016 Official Publication, 2016.
7. Kozłowski K., Nollet L., Lanckriet A., Vanderbeke E., Mielnik P., Outchkourov N. and Petkov S.: Effect of different phytases derived from *E. coli* AppA gene on the performance, bone mineralisation and nutrient digestibility of broiler chicken, Journal of Applied Animal Nutrition, 7, 1 of 9, 2019.
8. De Cuyper C., Nollet L., Aluwé M., De Boever J., Doudah L., Vanderbeke E., Outchkourov N., Petkov S. and Millet S.: Effect of supplementing phytase on piglet performance, nutrient digestibility and bone mineralization, Journal of Applied Animal Nutrition, ISSN 2049-257X online, DOI 10.3920/JAAN2019.0003, 2020.
9. Wiśniewska Z., Nollet L., Lanckriet A., Vanderbeke E., Petkov S., Outchkourov N., Kasprówicz-Potocka M., Zaworska-Zakrzewska A. and Kaczmarek S.A.: Effect of Phytase Derived from the *E. coli* AppA Gene on Weaned Piglet Performance, Apparent Total Tract Digestibility and Bone Mineralization, Animal, 121, 1-10, 2020.
10. National Center for Biotechnology Information: Taxonomy Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=460519>), Accessed January 15, 2020.
11. Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y. and Madden K.R.: *Pichia pastoris* as a host system for transformations, Mol Cell Biol, 5(12):3376-3385. 1985.
12. Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T.: The Yeasts A Taxonomic Study 5th ed.: Elsevier Science, Amsterdam, 2011.
13. Chen M-T., Lin S., Shandil I., Andrews D., Stadheim T.A. and Choi B-K.: Generation of diploid *Pichia pastoris* strains by mating and their application for

recombinant protein production, Microb Cell Fact, 11(1):91. doi:10.1186/1475-2859-11-91, 2012.

325

14. European Union: European Union Register of Feed Additives pursuant to Regulation (EC) No 1831/2003, Annex I: List of additives Edition 02/2021 290), 2021.

330 15. EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzyme and Processing Aids (CEP): Safety evaluation of the food enzyme phospholipase C from a genetically modified *Komagataella phaffii* (strain PRF), EFSA Journal, 17 (4) 5682, 2019.

335 16. Manfrão-Netto J.H.C., Gomes A.M.V. and Parachin N.S.: Advances in Using *Hansenula polymorpha* as Chassis for Recombinant Protein Production, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 7, doi:10.3389/fbioe.2019.00094, 2019.

17. Japan Bioindustry Association: DataBiosafety for Industrial Applications of Microbes. doi:10.18908/lbdba.nbdc01076-04-000

340 18. Dersjant - Li Y., Awati A., Schulze H. and Partridge G.: Phytase in non - ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors, J. Sci. Food Agric.,95(5):878-896. doi:10.1002/jsfa.6998, 2014.

345 19. 農林水産省: 飼料の有害物質の指導基準及び管理基準について, 63 畜 B 第 2050 号, 昭和 63 年 10 月 14 日, 農林水産省畜産局長通知 (最終改正 令和 3 年 1 月 13 日), 2021.

350 20. European Commission: Directive 2002/32/EC of The European Parliament and of The Council of 7 May 2002 on Undesirable Substance in Animal Feed. 2002.

355 21. European Commission: Commission Regulation (EU) No 1275/2013 of 6 December 2013 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for arsenic, cadmium, lead, nitrites, volatile mustard oil and harmful botanical impurities, 2013.22. Nováková J., Vértési A., Béres E., Petkov S., Niederberger K.E., Gaver D.V. Hirka G. and Balázs Z.: Safety assessment of a novel thermostable phytase, Toxicology Reports 8, 139-147, 2021.

22. Nováková J., Vértési A., Béres E., Petkov S., Niederberger K.E., Gaver D.V. Hirka  
360 G. and Balázs Z.: Safety assessment of a novel thermostable phytase, Toxicology  
Reports 8, 139-147, 2021.
23. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
(FEEDAP): Safety and efficacy of OptiPhos® PLUS for poultry species for fattening,  
365 minor poultry species reared for breeding and ornamental birds, EFSA Journal, 18  
(6) 6141, 2020.
24. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
(FEEDAP): Safety and efficacy of OptiPhos® PLUS (6 phytase) for laying hens,  
370 turkeys for breeding, chickens for breeding, minor poultry species for egg production  
purposes and breeding, EFSA Journal, 18(6):6161, 2020.
25. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed  
(FEEDAP): Safety and efficacy of OptiPhos® PLUS for suckling and weaned piglets,  
375 pigs for fattening, sows, other minor pig species for fattening and other minor  
reproductive pig species, EFSA Journal, 18(7):6204, 2020.
26. European Commission: Commission Implementing Regulation (EU) 2020/2121 of  
16 December 2020 concerning the authorisation of a preparation of 6-phytase  
380 produced by Komagataella phaffii DSM 32854 as a feed additive for all poultry  
species, ornamental birds, piglets, pigs for fattening, sows and minor porcine species  
for fattening or reproduction (holder of authorisation: Huvepharma EOOD), Official  
Journal of the European Union, L426/28, 2020.

参考資料（申請者提出 社外秘）

- 385 1. A2P フィターゼをコードする塩基配列及びアミノ酸組成（非公表）
2. AppA2 フィターゼと AP2 フィターゼの至適 pH の比較（非公表）
3. Biovet: Comparative feed pelleting test for OptiPhos® 5000 CT and OptiPhos® Plus  
390 5000 G（非公表）
4. Biovet: Molecular weight, optimum temperature, phytase activity of AppA2P（非公

表)

- 395 5. bisyGmbH : Thermostable phytase expression strain *K.phaffii* “BSY007”  
Strain generation report (非公表)
6. pBSYPDF-MF-AppA2P の塩基配列 (非公表)
- 400 7. 遺伝的安定性に関する検討 (非公表)
8. ベクターの ORF 検索調査結果 (非公表)
9. Biovet: Study report on the in vitro digestibility of OptiPhos Plus (非公表)
- 405 10. 挿入部位の前後 1000 bp を含む塩基配列 (非公表)
11. ゲノムの ORF 検索調査結果 (非公表)
- 410 12. OVOCOM: Feed Chain Alliance (FCA) Standard 2006. (非公表)
13. Biovet: Analytical Report, 2017 (非公表)
14. TLR International Laboratories: Analytical Report, 2018 (非公表)
- 415 15. Biovet: Study on the acute oral toxicity of Optiphos Plus – liquid concentrate  
(Huvepharma) in albino rats (Fischer - 344), 2020 (非公表)
16. Currie D.: Rosin Nutrition LTD, Evaluation of the Tolerance of Phytase TSP161  
420 Administered in Feed in Broilers, 2019 (非公表)
17. Dedeurwaerder: Poulpharm, Tolerance of Phytase TSP 161 administered via feed  
in Layers, 2019 (非公表)
- 425 18. Currie D.: To Evaluate the Tolerance of Phytase TSP161 in Weaned Piglets, 2019  
(非公表)

19. Biovet: Purity of AppA2P active substance of OptiPhos® Plus (非公表)

430 20. 一般財団法人日本食品分析センター, 試験報告書, 第 21003042001-0101 号, 2021  
(非公表)

21. 一般財団法人日本食品分析センター, 試験報告書, 第 20057535001-0101 号, 2020  
(非公表)

435