

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

NZYM-JA 株を利用して生産された
 β -アミラーゼ

2016年4月

食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会

目 次

	頁
<審議の経緯>.....	3
<食品安全委員会委員名簿>.....	3
<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>.....	3
要 約.....	4
Ⅰ. 評価対象添加物の概要.....	5
Ⅱ. 食品健康影響評価.....	5
第1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに 遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違.....	5
1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料.....	5
2 宿主及び導入 DNA.....	6
3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料.....	6
4 宿主の構成成分等に関する資料.....	6
5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料.....	6
6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加 物及び組換え体と宿主等の相違点.....	7
第2 宿主に関する事項.....	7
1 分類学上の位置付け(種名(学名)・株名等)に関する事項.....	7
2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項.....	8
3 寄生性及び定着性に関する事項.....	8
4 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項.....	8
5 宿主の近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.....	8
第3 ベクターに関する事項.....	8
1 名称及び由来に関する事項.....	8
2 性質に関する事項.....	8
第4 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項.....	9
1 挿入 DNA の供与体に関する事項.....	9
2 挿入 DNA 又は遺伝子(抗生物質耐性マーカを含む。)及びその遺伝子産物 の性質に関する事項.....	9
3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカ遺伝子の発現に関わる領域に関する 事項.....	10
4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項.....	10
5 構築された発現ベクターに関する事項.....	10
6 DNA の宿主への導入方法に関する事項.....	11
7 抗生物質耐性マーカ遺伝子の安全性に関する事項.....	12
第5 組換え体に関する事項.....	12
1 宿主との差異に関する事項.....	12
2 遺伝子導入に関する事項.....	12
第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項.....	12

1	添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること	12
2	添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること	12
第7	遺伝子組換え添加物に関する事項	12
1	諸外国における認可、食用等に関する事項	12
2	組換え体の残存に関する事項	13
3	製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	13
4	精製方法及びその効果に関する事項	13
5	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	13
第8	第2から第7までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項	13
Ⅲ.	食品健康影響評価結果	13
<参照>		14

<審議の経緯>

- 2016年3月2日 厚生労働大臣から遺伝子組換え食品等の安全性に係る食品健康影響評価について要請（厚生労働省発生食0302第1号）、関係書類の接受
- 2016年3月8日 第598回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2016年3月23日 第147回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2016年4月19日 第603回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）
熊谷 進
吉田 緑
石井 克枝
堀口 逸子
村田 容常

<食品安全委員会遺伝子組換え食品等専門調査会専門委員名簿>

澤田 純一（座長）
小関 良宏（座長代理）
岡田 由美子 中島 春紫
橘田 和美 樋口 恭子
児玉 浩明 飯 哲夫
近藤 一成 山川 隆
柘植 郁哉 和久井 信
手島 玲子

要 約

「NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼ」について、申請者提出の資料を用いて食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、 β -アミラーゼの生産性を高めるために、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Bacillus flexus* 由来の β -アミラーゼ遺伝子 (*bmyFzyn2* 遺伝子) 及びタンパク質の分泌に関与する *prsA* 遺伝子を導入して作製した NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼである。本添加物は、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-結合を非還元末端から加水分解し、マルトースを生成させる酵素であり、マルトースシロップ製造の糖化工程に使用される。

「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」(平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定)に基づき、挿入遺伝子の安全性、挿入遺伝子から産生されるタンパク質の毒性及びアレルギー誘発性等について確認した結果、従来の添加物と比較して新たに安全性を損なうおそれのある要因は認められなかった。

したがって、「NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼ」については、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

I. 評価対象添加物の概要

品 目：NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼ
用 途：デンプン糖製造時の加工助剤
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)

本添加物は、 β -アミラーゼの生産性を高めるために、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主として、*Bacillus flexus* 由来の β -アミラーゼ遺伝子 (*bmyFzyn2* 遺伝子) 及びタンパク質の分泌に関与する *prsA* 遺伝子を導入して作製した NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼである。本添加物は、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-結合を非還元末端から加水分解し、マルトースを生成させる酵素であり、マルトースシロップ製造の糖化工程に使用される。

II. 食品健康影響評価

第1 安全性評価において比較対象として用いる添加物及び宿主等の性質並びに遺伝子組換え添加物及び組換え体との相違

1 従来の添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 名称、基原及び有効成分

従来の添加物の名称、基原及び有効成分は、以下のとおりである。

名 称： β -アミラーゼ F

基 原：*Bacillus flexus* APC9451 株

有効成分： β -アミラーゼ

(EC 番号：EC 3.2.1.2、CAS 番号：9000-91-3)

(2) 製造方法

β -アミラーゼ F 製剤は、*B. flexus* APC9451 株を生産菌として用い、培養工程、抽出等の製剤化工程を経て製造される。

(3) 用途及び使用形態

β -アミラーゼ F は、アミロースやアミロペクチン等の α -1,4-結合を非還元末端から加水分解し、マルトースを生成させる酵素であり、デンプンからマルトースシロップを製造する際に加工助剤として使用される。また、餅などデンプン食品の老化抑制の用途も考えられるとしている。(参照 1)。

(4) 摂取量

β -アミラーゼ F が全ての糖の製造及び餅を含む米加工品の製造に使用され、100%残存すると仮定した場合の一日最大摂取量は、0.032 mg/kg 体重/日と試算されている(参照 2)。

2 宿主及び導入 DNA

(1) 宿主の種名（学名）、株名等及び由来

宿主は、*B. licheniformis* Ca63 株である。*B. licheniformis* Ca63 株は、自然界から分離された菌株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

bmyFzyn2 遺伝子及びタンパク質の分泌に関与する *prsA* 遺伝子の供与体は、*Bacillus flexus* APC9451 株及び *B. licheniformis* Ca63 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

bmyFzyn2 遺伝子は、Fzyn2 をコードする。Fzyn2 は、従来品と同一の β -アミラーゼである。*prsA* 遺伝子は、菌体外分泌を促進する細胞膜タンパク質である PrsA タンパク質をコードする。

B. licheniformis Ca63 株染色体の複数の遺伝子座に相同組換えによりそれぞれマーカー遺伝子と att 配列を挿入した後、インテグラーゼを発現する導入用ベクターを用いて att 配列を介してマーカー遺伝子を脱落させて挿入遺伝子発現カセットを導入した。その際、挿入遺伝子発現カセットが挿入された遺伝子座の遺伝子が有する機能が欠失された（参照 3）。

なお、 β -アミラーゼの生産性を高めるために、*B. licheniformis* Ca63 株のアルカリプロテアーゼをコードする *aprL* 遺伝子を含む 10 種類の遺伝子を、欠失導入用ベクターを用いた相同組換えにより欠失させている（参照 4）。

3 宿主の添加物製造への利用経験又は食経験に関する資料

B. licheniformis は、長期にわたり食品や食品製造用酵素の製造に安全に使用されてきた経験がある。*B. licheniformis* Ca63 株は α -アミラーゼの生産菌として使用されてきた。

4 宿主の構成成分等に関する資料

B. licheniformis が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する（参照 5）。

5 遺伝子組換え添加物の性質及び用途等に関する資料

(1) 製品名及び有効成分

本添加物の製品名及び有効成分は以下のとおりである。

製品名：Secura®

有効成分： β -アミラーゼ（Fzyn2）

（EC 番号：EC 3.2.1.2、CAS 番号：9000-91-3）

(2) 製造方法

Fzyn2 は、NZYM-JA 株を生産菌として製造される。製造方法は、従来の添加物と同様であり、培養工程、ろ過等の製剤化工程を経て製造される。生産菌は、2 回の除菌ろ過により分離・除去される。

(3) 用途及び使用形態

Fzyn2 は、従来の添加物と同様にデンプンからマルトースシロップを製造する際に加工助剤として使用される。マルトースシロップの製造工程において、デンプンは液化工程で分解されてデキストリンとなり、糖化工程において Fzyn2 を用いることによってマルトースまで分解される。用途及び使用形態は、従来の添加物と変わらない。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

Fzyn2 は、従来の添加物の生産菌から得られた β -アミラーゼ遺伝子に改変を加えず発現させたものであるため、Fzyn2 と従来品の有効成分は同一である。

6 安全性評価において検討が必要とされる遺伝子組換え添加物と従来の添加物及び組換え体と宿主等の相違点

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

Fzyn2 と従来の添加物の有効成分は、同一である。

(2) 組換え体と宿主

NZYM-JA 株と宿主との相違点は、NZYM-JA 株には *bmyFzyn2* 遺伝子が導入され、 β -アミラーゼ (Fzyn2) 産生性を獲得している点である。また、 β -アミラーゼの産生性を高めるため、*prsA* 遺伝子の導入並びに *aprL* 遺伝子を含む 10 種類の遺伝子の欠失及び遺伝子導入座での遺伝子欠失がなされている点が相違点である。

以上 1～6 より、本添加物及び本添加物の生産菌の比較対象となり得る従来の添加物及び宿主があると判断し、第 2 以下の各事項について評価を行った。

第 2 宿主に関する事項

1 分類学上の位置付け (種名 (学名)・株名等) に関する事項

宿主は *B. licheniformis* Ca63 株である。

B. licheniformis は、広く自然界に存在し、食品中にも存在している。*B. licheniformis* Ca63 株は生産菌として酵素生産に長年の使用実績がある。

また、経済開発協力機構 (OECD) において、優良工業製造規範 (GILSP) が適用できる宿主微生物として認定されている。

2 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

B. licheniformis が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル1に相当する。

3 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis が腸管内に定着することは知られていない。

4 病原性の外来因子(ウイルス等)に汚染されていないことに関する事項

B. licheniformis には、病原性の外来因子の存在を示唆する報告はない。

5 宿主の近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

B. licheniformis の近縁種である *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus pumilus* は、毒性物質を産生することが知られている *Bacillus cereus* とは明確に区別されている。

第3 ベクターに関する事項

1 名称及び由来に関する事項

遺伝子導入用ベクター pAN1025 及び pAN1057 の作製には、プラスミド pE194 が用いられた。

2 性質に関する事項

(1) DNA の塩基数及びその塩基配列を示す事項

プラスミド pE194 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている (参照 6)。

(2) 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。

(3) 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 の塩基配列は明らかになっており、既知の有害塩基配列は含まれていない。

(4) 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遺伝子が含まれている。なお、エリスロマイシン耐性遺伝子は宿主の染色体に導入されない。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pE194 には伝達を可能とする塩基配列は含まれていない。

(6) 宿主依存性に関する事項

プラスミド pE194 の複製開始配列は、*Bacillus* 属で機能する。

第4 挿入 DNA、遺伝子産物、並びに発現ベクターの構築に関する事項

1 挿入 DNA の供与体に関する事項

(1) 名称、由来及び分類に関する事項

bmyFzyn2 遺伝子及び *prsA* 遺伝子の供与体は、*B. flexus* APC9451 株及び *B. licheniformis* Ca63 株である。

(2) 安全性に関する事項

B. flexus が有害生理活性物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所病原体等安全管理規程におけるバイオセーフティレベル 1 に相当する。β-アミラーゼの生産菌として用いられてきた経験がある（参照 1）。

B. licheniformis Ca63 株は長年の使用経験があり、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。

2 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカを含む。）及びその遺伝子産物の性質に関する事項

(1) 挿入遺伝子のクローニング若しくは合成方法に関する事項

bmyFzyn2 遺伝子は、*B. flexus* APC9451 株のゲノムより PCR により得られた。また、*prsA* 遺伝子は、*B. licheniformis* Ca63 株ゲノムより PCR により得られた（参照 7）。

(2) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

挿入 DNA の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

・ *bmyFzyn2* 遺伝子

bmyFzyn2 遺伝子が発現する Fzyn2 は、アミロースやアミロペクチン等の α-1,4-結合を非還元末端から加水分解し、マルトースを生成させる酵素である。

Fzyn2 を有効成分とする β-アミラーゼ F は、これまで安全に使用されている。

・ *prsA* 遺伝子

prsA 遺伝子がコードする PrsA タンパク質は、細胞膜タンパク質の一つであり、Fzyn2 の分泌量を増加させる。PrsA タンパク質については、アレルギー誘発性及び毒性を示唆する報告はない。また、PrsA タンパク質と既知アレルゲンとの相同性検索の結果、相同性を示す既知アレルゲンは見いだされなかった（参照 8）。

3 挿入遺伝子及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の発現に関わる領域に関する事項

(1) プロモーターに関する事項

bmyFzyn2 遺伝子のプロモーターは、*amyL4199* プロモーター、*amyQsc* プロモーター及び *cry3A* プロモーターで構成される P3 プロモーターである。*amyL4199* プロモーターは、*B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* プロモーターに変異を導入したものであり、*amyQsc* プロモーターは、*B. amloliquefaciens* DSM 7 株由来の *amyQ* プロモーターに変異を導入したものである。*cry3A* プロモーターは、*Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株に由来する。

P3 プロモーターは、*prsA* 遺伝子のプロモーターとしても機能する。

(2) ターミネーターに関する事項

bmyFzyn2 遺伝子のターミネーターは、*amyL* ターミネーター及び *aprH* ターミネーターである。*amyL* ターミネーターは、*B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* 遺伝子のターミネーター配列であり、*aprH* ターミネーターは、*Bacillus clausii* PP159 株由来の *aprH* 遺伝子のターミネーター配列である。

(3) その他、挿入遺伝子の発現制御に関わる塩基配列を組み込んだ場合には、その由来、性質等が明らかであること

目的遺伝子の翻訳に必要な *B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* RBS 配列及び mRNA を安定化させるため *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列を付加した。*cry3A* mRNA 安定化配列は、殺虫活性を示すタンパク質をコードする遺伝子のプロモーター領域に存在する配列であり、タンパク質をコードする領域は含まれない。

また、相同組換えに利用するため、Lactococcal bacteriophage TP901-1 株由来の att 配列が導入された。

4 ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

プラスミド pE194 に、インテグラーゼ遺伝子/*xyIR* 遺伝子断片、*oriT* 断片、*cry3A* mRNA 安定化配列、*amyL* RBS/*bmyFzyn2* 遺伝子断片及び *amyL* ターミネーター/att 配列断片を挿入することによって、遺伝子導入用ベクター pAN1025 が作製された。遺伝子導入用ベクター pAN1057 は、pAN1025 に挿入された DNA の他に *prsA* 遺伝子が挿入されている。

5 構築された発現ベクターに関する事項

(1) 塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図に関する事項

遺伝子導入用ベクター pAN1025 及び pAN1057 の塩基数、塩基配列及び制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(2) 原則として、最終的に構築された発現ベクターには、目的以外のタンパク質を組換え体内で発現するオープンリーディングフレームが含まれていないこと

生産菌に挿入されるのは、遺伝子導入用ベクターpAN1025 及び pAN1057 の *amyL* RBS/ *bmyFzyn2* 遺伝子断片、*prsA* 遺伝子及び *amyL* ターミネーター/att 配列であることから、生産菌におけるそれぞれの遺伝子座の挿入 DNA 断片及びその近傍配列を含む領域について、六つの読み枠においてオープンリーディングフレーム (ORF) 検索を行った。その結果、終止コドンから終止コドンで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 543 個見いだされた。

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、アレルゲンデータベース^aを用いて相同性検索を行った結果、80 アミノ酸残基で 35%以上及び連続した 8 アミノ酸配列が完全に一致する既知のアレルゲンは検出されなかった。

さらに、これらの ORF と既知の毒素タンパク質との相同性の有無を確認するために、MvirDB データベース (参照 9) を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、各遺伝子座での検索結果を総合すると、2 個の ORF に対してそれぞれ 1 種類又は 3 種類のタンパク質が検索されたが、これらのタンパク質は、全てタンパク質自体が毒性を有するとの報告はなかった。したがって、本添加物中に毒性タンパク質が含まれる可能性は低いと考えられたとしている。

(3) 宿主に対して用いる導入方法において、意図する挿入領域が発現ベクター上で明らかであること

意図する挿入領域は、遺伝子導入用ベクター pAN1057 の *amyL* RBS/*bmyFzyn2* 遺伝子断片、*prsA* 遺伝子及び *amyL* ターミネーター/att 配列並びに遺伝子導入用ベクター pAN1025 の *amyL* RBS/ *bmyFzyn2* 遺伝子断片及び *amyL* ターミネーター/att 配列を含む領域である。

(4) 導入しようとする発現ベクターは、目的外の遺伝子の混入がないよう純化されていること

遺伝子導入用ベクター pAN1025 及び pAN1057 は、目的外の遺伝子の混入がないように構築されている。

6 DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主ゲノムの標的遺伝子座を *neo* 遺伝子などのマーカー遺伝子で置換するとともに、その上流に P3 プロモーター及び *cry3A* mRNA 安定化配列を、下流に *aprH* ターミネーター及び att 配列を挿入した。遺伝子導入用ベクター pAN1025 及び pAN1057 を用いて、インテグラーゼによる att 配列を利用した相同組換えにより *bmyFzyn2* 遺伝子及び *prsA* 遺伝子を導入して NZYM-JA 株を得た。

^a The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version 15

なお、マーカー遺伝子への置換は、それぞれのマーカーが示す形質に基づいて選抜し、目的遺伝子の導入は、エリスロマイシンに対する感受性で選抜後、シーケンス解析により確認した。

7 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクターpAN1025及びpAN1057はエリスロマイシン耐性遺伝子を持つが、宿主の染色体には導入されない。生産菌の遺伝子挿入領域のシーケンス解析により、抗生物質耐性マーカーを含むマーカー遺伝子は存在していないことを確認しているとしている。

第5 組換え体に関する事項

1 宿主との差異に関する事項

NZYM-JA株は、Fzyn2を産生する点で宿主と異なる。

2 遺伝子導入に関する事項

(1) 制限酵素による切断地図に関する事項

NZYM-JA株の遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図は、挿入領域の塩基配列の解析により明らかになっている（参照10）。

(2) 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

NZYM-JA株に挿入された *bmyFzyn2* 遺伝子を含む断片及び隣接する配列のオープンリーディングフレーム検索の結果は、第4-5-(2)のとおりである。

第6 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

1 添加物の製造原料又は製造器材としての使用実績があること

Fzyn2の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、また、本製品の製品規格は、Food Chemical Codexの食品酵素規格に適合していることから、有害性はないと考えられる。

2 添加物の製造原料又は製造器材としての安全性について知見が得られていること

Fzyn2の製造原料は、食品又は食品添加物製造用として一般的に用いられているものを使用し、製造器材は従来から食品用酵素剤の製造に用いられているものを使用する。

第7 遺伝子組換え添加物に関する事項

1 諸外国における認可、食用等に関する事項

Fzyn2は、2014年から欧米において販売されている。

2 組換え体の残存に関する事項

ドットブロット分析により、Fzyn2 の製剤中には組換え DNA が残存しないことが確認された（参照 11）。

3 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

Fzyn2 の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値及び Food Chemical Codex の規定値を満たしている。また、製造原料は食品原料又は食品への使用が認められた品質のものが用いられ、安全性に問題のある非有効成分が含まれるとは考えにくい。

4 精製方法及びその効果に関する事項

Fzyn2 の精製は、粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の工程で行われ、安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

5 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

Fzyn2 の製造原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造に使用されているものと同様であり、有害性はないと考えられる。

第 8 第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見が得られていない場合に必要な事項

第 2 から第 7 までの事項により安全性の知見は得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「NZYM-JA 株を利用して生産された β -アミラーゼ」については、「遺伝子組換え微生物を利用して製造された添加物の安全性評価基準」（平成 16 年 3 月 25 日食品安全委員会決定）に基づき評価した結果、ヒトの健康を損なうおそれはないと判断した。

<参照>

1. *Bacillus flexus* 由来の耐熱性 β -アミラーゼについて (社内報告書)
2. 平成 25 年 国民健康・栄養調査報告、厚生労働省
3. マーカー遺伝子発現カセットの挿入 (社内報告書)
4. *Bacillus licheniformis* Ca63 株における欠失導入用ベクターを用いた DNA 欠失の概要 (社内報告書)
5. 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)
6. Horinouchi, S. et. al., Nucleotide Sequence and Functional Map of pE194, a Plasmid That Specifies Inducible Resistance to Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin Type B Antibiotics, *Journal of Bacteriology*, 150(2), 804-814 (1982)
7. Outline of pAN1057 and pAN1025 construction (社内報告書)
8. Sequence homology of PrsA from *B. licheniformis* to allergens (社内報告書)
9. C. E. Zhou et. al., MvirDB-a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications *Nucleic Acids Research*, **35**, Database issue, D391-D394 (2007)
10. NZYM-JA 株の●●●の遺伝子導入領域における DNA 塩基配列 (社内報告書)
11. Analysis of residual DNA in Secura® (社内報告書)