

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPTR001 株を利用して生産された
ヘミセルラーゼ

2018年7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 of 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	7
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ーを含む。）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ー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	11
5. 構築された発現ベクターに関する事項	11
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ー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.....	13
第7. 遺伝子組換え添加物に関する事項.....	13
1. 諸外国における認可、食用等に関する事項.....	13
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事項.....	13
Ⅲ. 食品健康影響評価結果.....	13
<参照>.....	14

<審議の経緯>

- 2018年5月31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0531第1号）、関係書類の接受
- 2018年6月5日 第699回食品安全委員会（要請事項説明）
- 2018年6月22日 第176回遺伝子組換え食品等専門調査会
- 2018年7月17日 第705回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

(2018年6月30日まで)	(2018年7月1日から)
佐藤 洋（委員長）	佐藤 洋（委員長）
山添 康（委員長代理）	山本 茂貴（委員長代理）
吉田 緑	川西 徹
山本 茂貴	吉田 緑
石井 克枝	香西 みどり
堀口 逸子	堀口 逸子
村田 容常	吉田 充

<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>

中島 春紫（座長）	
小関 良宏（座長代理）	
児玉 浩明（座長代理）	
岡田 由美子	手島 玲子
橘田 和美	樋口 恭子
近藤 一成	山川 隆
鈴木 秀幸	吉川 信幸
柘植 郁哉	

要 約

「JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」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、*Trichoderma reesei* QM6a 株を宿主として、*Talaromyces pinophilus* ATCC 36839 株由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ（アラビノフラノシダーゼ）である。本添加物は、アラビノキシラン中において、 α -1,2 及び α -1,3 結合を有する非還元末端の L アラビノフラノースを主鎖からエキソ型で加水分解する酵素であり、デンプン糖の製造における収量向上を目的として使用される。

「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、「JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」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

名称：JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ
用途：デンプン糖製造時の収量の向上
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、*Trichoderma reesei* QM6a 株を宿主として、*Talaromyces pinophilus* ATCC 36839 株由来のアラビノフラノシダーゼ遺伝子を導入して作製した JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ（アラビノフラノシダーゼ）である。本添加物は、アラビノキシラン中において、 α -1,2 及び α -1,3 結合を有する非還元末端の L アラビノフラノースを主鎖からエキソ型で加水分解する酵素であり、デンプン糖の製造における収量向上を目的として使用される。

本生産菌には、選択マーカーとして、*Aspergillus nidulans* に由来するアセトアミダーゼ遺伝子が導入されている。

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：アラビノフラノシダーゼ（BakeZyme ARA 10,000）

基原：*Aspergillus niger*

有効成分：アラビノフラノシダーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 55

CAS No. : 9067-74-7

(2) 製造方法

BakeZyme ARA 10,000 は、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、除菌ろ過により分離除去される。

(3) 用途及び使用形態

BakeZyme ARA 10,000 は、パンの製造工程時に原料となる小麦粉中のアラビノキシランに作用することで、生地を保水率及び弾力向上させることを目的として使用される（参照 1）。

(4) 摂取量

BakeZyme ARA 10,000 が全てのパンの製造工程に使用され、最終製品中に 100% 残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.002 mg / kg 体重/日である（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、自然界から分離された *Tr. reesei* QM6a 株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

アラビノフラノシダーゼ (*afuTP*) 遺伝子の供与体は、*Ta. pinophilus* ATCC 36839 株である。

選択マーカーであるアセトアミダーゼ (*amdS*) 遺伝子の供与体は、*A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

afuTP 遺伝子は、アラビノフラノシダーゼ (AFUTP) をコードする。自身の野生型分泌シグナル配列を有し、AFUTP は菌体外に分泌される。

amdS 遺伝子は、アセトアミドを分解するアセトアミダーゼをコードし、選択マーカーとして用いた。

amdS 遺伝子を含む *afuTP* 遺伝子発現カセットを、相同組換えにより宿主ゲノムの 1 つの遺伝子座に導入した。その際、導入遺伝子座において内在性遺伝子の欠失が確認された。

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

Tr. reesei は、長期にわたり食品や食品用酵素の製造に安全に使用されている (参照 3、4)。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

Tr. reesei が有害生理活性物質及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく (参照 3、4)、国立感染症研究所病原体等安全管理規程においてバイオセーフティレベル (BSL) 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：AFUTP

有効成分：アラビノフラノシダーゼ

IUB No. : EC 3. 2. 1. 55

CAS No. : 9067-74-7

(2) 製造方法

AFUTP は、JPTR001 株を生産菌として、従来の添加物と同様に、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

AFUTP は、デンプン糖の製造の原料調製工程において、植物組織の細胞壁成分を分解することにより、デンプン糖の製造時の収量を向上させることを目的として使用される。AFUTP が全てのデンプン糖製造に使用され、最終製品中に 100%残存すると仮定した場合の最大一日摂取量は、0.004 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日と試算されている（参照 2）。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

AFUTP の有効成分は、従来の BakeZyme ARA 10,000 と同じくアラビノキシランの α 結合を非還元末端から加水分解するアラビノフラノシダーゼである。従来品は、 α -1,2、 α -1,3 及び α -1,5 結合を加水分解する一方、AFUTP は、 α -1,2 及び α -1,3 結合を加水分解する点で異なる（参照 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

(1) 遺伝子組換え添加物と従来の添加物

AFUTP と従来の BakeZyme ARA 10,000 との相違点は、構造遺伝子の基原及びアミノ酸配列が異なる点並びにアラビノキシランの α 結合を加水分解する際の反応特異性が異なる点である（参照 7）。

(2) 組換え体と宿主

JPTR001 株と宿主との相違点は、JPTR001 株には、*afuTP* 遺伝子が複数コピー導入され AFUTP 産生性を獲得している点、*amdS* 遺伝子が導入されている点及び遺伝子導入に伴い内在性遺伝子が欠失している点である。

以上 1～6 から、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、*Tr. reesei* QM6a 株である。

2. 病原性及び有害生理活性物質等の生産に関する事項

Tr. reesei が病原性を有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 BSL1 に相当する（参照 5）。

Tr. reesei は、カビが産生する抗生物質や抗菌物質を含む二次代謝産物の一種であるペプチン酸を産生し得る能力を有するという報告がある。しかしながら、ペプチン酸は貧栄養条件下で産生されるという報告（参照 8、9）や、これらの知見に基づく米国 EPA のリスク評価結果（参照 10）から、栄養素が豊富な産業利用においては、安全上の懸念は低いと考えられる。

なお、JPTR001 株の作製過程において、ペプタイボルの 1 つであるパラセルシンの合成に関与する酵素遺伝子は欠失している。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

Tr. reesei には、腸管内への寄生性及び定着性の報告はない。

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

Tr. reesei 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

Tr. reesei の近縁種には、ヒトへの日和見感染が知られている *Tr. longibrachiatum* 等や、トリコテセンを産生し得る *Tr. brevicompactum* 等が知られている。

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 pJPV007 の作製には、*E. coli* 由来のプラスミド pUC19 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 pUC19 の塩基数及び塩基配列は明らかになっている。

(2) 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。

(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 pUC19 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 pUC19 には、アンピシリン耐性遺伝子が含まれている。

(5) 伝達性に関する事項

プラスミド pUC19 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 pUC19 の複製開始配列は、*E. coli* 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

afuTP 遺伝子及び *amdS* 遺伝子の供与体は、それぞれ *Ta. pinophilus* ATCC 36839 株及び *A. nidulans* Glasgow 野生株である。

(2) 安全性に関する事項

Ta. pinophilus の食経験は知られていないが、*Ta. pinophilus* が生産するバイオマス分解酵素及び二次代謝産物の食品産業への応用可能性が報告されており（参照 11）、また、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照 5）。

A. nidulans の食経験は知られていないが、*A. nidulans* のアセトアミダーゼをコードする *amdS* 遺伝子は、選択マーカーとして長年利用されてきた実績がある。また、*A. nidulans* は、国立感染症研究所病原体等安全管理規程における BSL1 に相当する（参照 5）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカーを含む。）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

afuTP 遺伝子及び *amdS* 遺伝子は、それぞれ *Ta. pinophilus* ATCC 36839 株及び *A. nidulans* Glasgow 野生株のゲノムから PCR により得られた。

(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

afuTP 遺伝子の塩基数、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

① *afuTP* 遺伝子

afuTP 遺伝子が発現する AFUTP は、アラビノキシラン中において、非還元末端の α -1,2 又は α -1,3 結合を有する L アラビノフラノースを主鎖からエキソ型で加水分解するアラビノフラノシダーゼである。

a. 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

Ta. pinophilus のアレルギー誘発性の可能性を調べるために文献検索^aを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

b. 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

AFUTP を有効成分とする酵素製剤について、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。*Ta. pinophilus* のヘミセルラーゼにおけるアレルギー誘発性

^a PubMed、検索日：2017 年 9 月

の可能性を調べるために文献検索^aを行った結果、アレルギー誘発性を示唆する報告はなかった。

c. 遺伝子産物の物理化学的処理に対する感受性に関する知見

(a) 人工胃液に対する感受性

AFUTP の人工胃液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 30 分以内に分解されることが示された（参照 12）。

(b) 人工腸液に対する感受性

AFUTP の人工腸液中での消化性について確認するために、SDS-PAGE 分析及びウェスタンブロット分析を行った結果、両試験において、試験開始後 6 時間においても、分解されないことが示された（参照 12）。

(c) 加熱処理に対する感受性

AFUTP の加熱処理に対する感受性について確認した結果、50°C30 分で失活することが示された（参照 13）。

d. 遺伝子産物と既知のアレルゲンとの構造相同性に関する知見

AFUTP と既知のアレルゲンとの構造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^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンは検出されなかった（参照 14）。

② *amdS* 遺伝子

amdS 遺伝子がコードするアセトアミダーゼは、アセトアミドを加水分解する酵素であり、アセトアミドの存在下でのみ発現する。アセトアミドを唯一の窒素源として含む培養液中では、本遺伝子が導入された菌株のみが生育できることから、選択マーカーとして使用された。アセトアミダーゼがアレルギー誘発性及び毒性を示す報告はない。

以上のことから総合的に判断し、AFUTP 及びアセトアミダーゼは、アレルギー誘発性を有する可能性は低いと考えられた。

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

afuTP 遺伝子のプロモーターは、*Tr. reesei* ATCC 56765 株由来の *Cellobiohydrolase 1 (cbh1)* 遺伝子プロモーター配列である。

^b The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version 17

(2) ターミネーターに関する事項

afuTP 遺伝子のターミネーターは、*Tr. reesei* ATCC 56765 株由来の *cbh1* 遺伝子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

該当する塩基配列はない。

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 pUC19 に、宿主ゲノム上の標的遺伝子座への相同組換えに必要な配列並びに複数コピーの *afuTP* 遺伝子及び 1 コピーの *amdS* 遺伝子から成る遺伝子発現カセット等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV007 を作製した（参照 15）。

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 pJPV007 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（参照 16）。

(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
第 5-2-(2) に記載のとおりである。

(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

遺伝子導入用ベクター pJPV007 上の意図する挿入領域は、標的遺伝子座の 5' 領域及び 3' 領域との相同配列で挟まれた *afuTP* 遺伝子発現カセットを含む領域である。

(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 pJPV007 は、目的外の遺伝子の混入がないように純化されている。

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に、相同組換えにより遺伝子導入用ベクター pJPV007 の目的とする領域を挿入した。挿入領域に含まれる *amdS* 遺伝子が付与するアセトアミド要求性を指標に形質転換体を選抜し、JPTR001 株を得た。

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pJPV007はアンピシリン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されない。抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことを全ゲノム解析により確認している（参照 17）。

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

JPTR001 株は、*afuTP* 遺伝子発現カセットが導入され、導入遺伝子座において内在性遺伝子が欠失してい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

afuTP 遺伝子発現カセットの宿主ゲノムへの導入を確認するためにシーケンス解析を行った結果、標的遺伝子座に導入されていることが確認された（参照 17、18）。また、遺伝子挿入領域の各構成要素及び制限酵素切断地図は明らかになっている（参照 19）。

(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

導入 DNA と宿主ゲノムの接合部位に生じるオープンリーディングフレーム (ORF) の有無を調べるために、導入 DNA の 5' 近傍領域及び 3' 近傍領域を含む領域における ORF 検索を行った。その結果、6 つの読み枠において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 260 個検出された。

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^bを用いて相同性検索を行った結果、連続する 80 アミノ酸以上の配列に対して 35%以上の相同性を示す既知のアレルゲン及び連続する 8 アミノ酸配列が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 と既知の毒性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 20）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、2 個の ORF がデータベース中のタンパク質と相同性を示したが、いずれのタンパク質も毒性を有するとの報告はなかった（参照 21~24）。

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

AFUTP の製造原料及び製造器材は、食品用酵素の製造に安全に使用されてきた実績があり、また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合している。

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

AFUTP の製造原料及び製造器材は、上記のとおり安全に使用されてきた実績を有することから、有害性はないと考えられる。

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

AFUTP は、米国で 2017 年に GRAS として認証され（参照 25）、フランスでは食品用加工助剤として安全性が確認されている（参照 26）。

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、AFUTP 製剤中には組換え DNA が検出されないことが確認された（参照 27）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

AFUTP 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 FCC の規定値を満たしている（参照 28）。また、製造原料は食品用酵素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ことは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

AFUTP は、生産菌の培養物を粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の精製工程を経て製造されるため安全性に問題のある物質が混入することは考えにくい。

なお、AFUTP は宿主由来のセルラーゼ（既存添加物）を含有する（参照 12、29）。

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

AFUTP 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であり、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

「JPTR001 株を利用して生産されたヘミセルラーゼ」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. DSM Portofolio for Organic Labelling
2. 厚生労働省, 国民健康・栄養調査 (平成 27 年)
3. Nevalainen, H. Suominen, P. & Taimisto, K., On the safety of *Trichoderma reesei*, Journal of Biotechnology ,37 , 193-2008 (1994)
4. Peterson, R.& Nevalainen, H., *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement., Microbiology 158, 58–68, (2012)
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 B S L 分類等」 平成22年6月
6. Veen, P. et al., Induction, purification and characterisation of arabinases produced by *Aspergillus niger*., Archives in Microbiology, 157, 23-28 (1991)
7. Flippi, M.J.A. et al., Cloning and characterization of the *abfB* gene coding for the major α -L-arabinofuranosidase (ABF B) of *Aspergillus niger*., Current Genetics, 24, 525-532 (1993)
8. Kubicek C. P. et. al., Facts and Challenges in the Understanding of the Biosynthesis of Peptaibols by *Trichoderma*., Chemistry & Biodiversity 4, 1068-1082 (2007)
9. Komon-Zelazowska, M., et al., Formation of Atroviridin by *Hypocrea atroviridis* Is Conidiation Associated and Positively Regulated by Blue Light and the G Protein GNA3., Eukaryotic Cell 6, 2332–2342 (2007)
10. Federal Register 77, 54499-54511 (2012).
11. Li, C., et al., Genome sequencing and analysis of *Talaromyces pinophilus* provide insights into biotechnological applications., Scientific Reports 7:490 (2017)
12. Digestibility and Purity of AFUTP protein in a test batch for GLP toxicology study (社内文書)
13. Temperature and pH activity profiles and temperature stability of arabinofuranosidase from *Talaromyces pinophilus*, strain NZYM-*** (社内文書)
14. Assessment of sequence homology of hemicellulase expressed by JPTR001 to allergens (社内文書)
15. Outline of pJPV007 construction (社内文書)
16. pJPV007 whole sequence (社内文書)
17. Characterization of the *** locus in NZYM-*** (社内文書)
18. Confirmation of *afuTP* copy number in GM production strain NZYM-*** (社内文書)
19. Genome sequence analysis on genes of concern (社内文書)
20. Zhou C. E. 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)
21. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPTR001 to proteins from MvirDB and allergens (社内文書)
 22. Welch R.A. et al., Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 17020-17024 (2002)
 23. Tan, K.S. et al., Suppression of Host Innate Immune Response by *Burkholderia pseudomallei* through the Virulence Factor TssM., The Journal of Immunology, 184, 5160-5171 (2010)
 24. Ling, P.D., Ryon, J.J., Hayward, S.D., EBNA-2 of Herpesvirus Papio Diverges Significantly from the Type A and Type B EBNA-2 Proteins of Epstein-Barr Virus but Retains an Efficient Transactivation Domain with a Conserved Hydrophobic Motif, Journal of Virology 67, 2990-3003 (1993)
 25. Food and Drug Administration Agency Response Letter GRAS Notice No.GRN000680 (社内文書)
 26. Demande d'autorisation d'une enzyme par reconnaissance mutuelle. (仏国承認通知書) (社内文書)
 27. The analysis of residual DNA in PPH40331 by means of dot blot hybridization (社内文書)
 28. 社 Characterization of GMM arabinofuranosidase toxbatch PPH40331 from *Trichoderma reesei* strain Gv-1 (社内文書)
 29. Product Data Sheet Celluclast BG (社内文書)