

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPBL001 株を利用して生産された
アルカリ性プロテアーゼ

2018年2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	5
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 of 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	7
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 ...	7
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	8
1. 挿入 DNA の供与体に関する事項	8
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	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ー遺伝子の安全性に関する事項	11
第5. 組換え体に関する事項	11
1. 宿主との差異に関する事項	11
2. 遺伝子導入に関する事項	11

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	12
3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項	12
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>

2017年12月19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1219第2号）、関係書類の接受

2017年12月26日 第679回食品安全委員会（要請事項説明）

2018年1月25日 第170回遺伝子組換え食品等専門調査会

2018年2月27日 第686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）

吉田 緑

山本 茂貴

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>

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

「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、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、*Bacillus licheniformis* Si3 株を宿主として、*Nocardiopsis prasina* NRRL 18262 株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子を導入して作製した JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼである。本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解してペプチドやアミノ酸を生成する酵素であり、畜肉及び魚類エキスの製造においてエキスの抽出効率の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、「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：JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ
用 途：畜肉及び魚類エキス製造時の抽出効率の向上
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、*Bacillus licheniformis* Si3 株を宿主として、*Nocardiopsis prasina* NRRL 18262 株由来のアルカリ性プロテアーゼ遺伝子を導入して作製した JPBL001 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼである。本添加物は、タンパク質のペプチド結合をエンド型で加水分解してペプチドやアミノ酸を生成させる酵素であり、畜肉及び魚類エキスの製造においてエキスの抽出効率の向上を目的として使用される。

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：アルカリ性プロテアーゼ（Protease L）

基 原：*Bacillus licheniformis* Ca63 株

有効成分：アルカリ性プロテアーゼ

IUB No. : EC 3. 4. 21. 62

CAS No. : 9014-01-1

(2) 製造方法

Protease L は、培養工程、抽出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

Protease L は、畜肉及び魚類エキスの製造において、蒸煮汁の粘度を低下させることにより、エキスの抽出効率を向上させることを目的として使用される。

(4) 摂取量

Protease L が全ての畜肉及び魚類エキスの製造に使用され、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 1.8 mg TOS (Total Organic Solids)/ kg 体重/日である（参照 1～3）。

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* Si3 株である。*B. licheniformis* Si3 株は、自然界から分離された *B. licheniformis* Ca63 株に突然変異誘導を行い、胞子形成能を欠損させた株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

アルカリ性プロテアーゼ (*pep10R*) 遺伝子の供与体は、*Nocardioopsis prasina* NRRL 18262 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

pep10R 遺伝子は、セリンプロテアーゼである 10R をコードする。

pep10R 遺伝子を挿入した発現カセットを、相同組換えにより宿主ゲノムの複数の遺伝子座に導入した。その際、*pep10R* 遺伝子発現カセットが挿入された遺伝子座のうち、1つの遺伝子欠失が確認された（参照 4）。

なお、10R の生産性を高めるために、*aprL* 遺伝子を含む 3 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た（参照 5）。

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用酵素の製造に安全に使用されている。また、*B. licheniformis* Ca63 株は α -アミラーゼの生産菌として使用されている。

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及び栄養阻害物質を生産するという報告はなく、国立感染症研究所の病原体等安全管理規程（参照 6）においてバイオセーフティレベル（BSL）1 に相当する（参照 7）。

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：10R

有効成分：アルカリ性プロテアーゼ

IUB No. : EC 3. 4. 21. 1

CAS No. : 37259-58-8

(2) 製造方法

10R は、JPBL001 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

10R は、畜肉及び魚類エキスの製造において、蒸煮汁の粘度を低下させることでエキスの抽出効率を向上させる。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

10R は、従来の Protease L と同じくタンパク質をエンド型で加水分解するセリンプロテアーゼであるが、10R は Protease L と比較して特定の基質に対する反応性が高い（参照 8）。

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

10R と従来の Protease L 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ことにより、ProteaseL は疎水性アミノ酸残基の C 末端側のペプチド結合を優先的に切断するのに対し、10R は特定のアミノ酸残基の C 末端側のペプチド結合を優先的に切断する点である。

(2) 組換え体と宿主

JPBL001 株と宿主との相違点は、JPBL001 株には *pep10R* 遺伝子が導入され 10R 生産性を獲得している点、*pep10R* 遺伝子導入に伴い一部遺伝子が欠失している点、及び 10R の生産性を高めるため *aprL* 遺伝子を含む 3 種類の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 *B. licheniformis* Si3 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

B. licheniformis が病原性及び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（参照 6）における BSL1 に相当する（参照 7）。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis 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

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 の近縁種には、*Bacillus subtilis* 及び *Bacillus pumilus* が知られているが、毒性物質を産生する *Bacillus cereus* 等とは明確に区別されている（参照 9）。

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 pJPV002 及び pJPV003 の作製には、*Staphylococcus aureus* 由来のプラスミド 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 10）。

(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。

(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（参照 11）。

(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

pep10R 遺伝子の供与体は、*N. prasina* NRRL 18262 株である。

(2) 安全性に関する事項

N. prasina は、病原性及び有害生理活性を有する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（参照 6）における BSL1 に相当する（参照 7）。

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

pep10R 遺伝子は、*N. prasina* NRRL 18262 株のゲノムから PCR により得られた（参照 12）。

(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

pep10R 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

pep10R 遺伝子が発現する 10R は、基質タンパク質において Tyr、Trp、Phe 又は Leu 残基の C 末端側のペプチド結合を優先的に加水分解するセリンプロテアーゼである。

① 挿入遺伝子の供与体のアレルギー誘発性に関する知見

N. prasina 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。

② 遺伝子産物のアレルギー誘発性に関する知見

10R 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。*N. prasina* のプロテアーゼにおける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。

③ 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

10R 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 13）。

b. 人工腸液に対する感受性

10R 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 13）。

④ 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

10R 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

^a PubMed、2016 年 6 月

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 アミノ酸配列で 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）。

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

pep10R 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 プロモーター配列である（参照 4）。*amyL4199* プロモーター及び *amyQsc* プロモーターは、それぞれ *B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* プロモーター及び *B. amyloliquefaciens* 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（参照 15）。*cry3A* プロモーターは、*B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株に由来する *cry3A* 遺伝子の野生型プロモーター配列である。

(2) ターミネーターに関する事項

pep10R 遺伝子のターミネーターは、*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

挿入遺伝子の翻訳に必要な *B. clausii* PP159 株由来の *aprH* 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（参照 16）。*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るが（参照 17）、タンパク質をコードする領域は含まれない。

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 pE194 に、宿主ゲノム上の異なる挿入遺伝子座への相同組換えに必要な一部配列及び *pep10R* 遺伝子等を挿入することにより、遺伝子導入用ベクター pJPV002 及び pJPV003 を作製した（参照 12）。

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 pJPV002 及び pJPV003 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 18）。

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース（The Food Allergy Research and Resource Program (FARRP) version 15)

(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pJPV002 及び pJPV003 上の意図する挿入領域は、*pep10R* 遺伝子発現カセットの *cry3A* mRNA 安定化配列から *amyL* ターミナーターまでの領域である。挿入領域の DNA 配列は、全ゲノム解析により確認している (参照 19)。

(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pJPV002 及び pJPV003 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 P3 プロモーターを導入し、さらに相同組換えにより pJPV002 又は pJPV003 の目的とする領域を挿入した。挿入領域の塩基配列は、全ゲノム解析により確認されている。

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pJPV002 及び pJPV003 はエリスロマイシン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムには導入されない。生産菌の全ゲノム解析により、抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在していないことが確認されている。

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

JPBL001 株は、*pep10R* 遺伝子発現カセットが導入され、複数遺伝子を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

JPBL001 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、シーケンス解析により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

挿入 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、挿入 DNA の 5' 近傍配列を含む領域及び 3'

近傍配列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 174 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 アミノ酸残基で 35%以上及び連続する 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（参照 20、21）。

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 22）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、5 個の ORF に対してそれぞれ複数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毒性を有するとの報告はなかった。

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

10R 製剤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

10R 製剤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

10R は、オーストラリア・ニュージーランド食品基準機関が策定した食品基準コードの基準 1.3.3 (加工助剤) のキモトリプシンとして記載されている（参照 23）。フランスでは食品用加工助剤のポジティブリストのセリンプロテアーゼとして収載され（参照 24）、米国では 2015 年に GRAS として認証されている（参照 25）。

2. 組換え体の残存に関する事項

ドットプロット分析により、10R 製剤中には組換え体の DNA が残存しないことが確認された（参照 26）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

10R の製剤前の酵素サンプルは、JECFA の食品用酵素の規格値（参照 27）及び FCC の規定値（参照 28）を満たしている。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

れるとは考えにくい。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

10R 製剤は、生産菌の培養物を粗ろ過、除菌ろ過、限外ろ過等の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。

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

10R 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

「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 厚生労働省 平成 27 年国民健康・栄養調査報告
- 2 添付 1: Application Sheet: Liquefaction: Enzymatic hydrolysis of proteins using Novozymes proteases. (社内文書)
- 3 添付 2: Typical Composition: Alcalase. (社内文書)
- 4 添付 3: Insertion of *pep10R* gene expression cassette in *** (社内文書)
- 5 添付 4: Gene deletions in JPBL001. (社内文書)
- 6 国立感染症研究所 病原体等安全管理規定 (2010-06).
- 7 国立感染症研究所 病原体等安全管理規定 別冊 1「病原体等の BSL 分類等」(2010-06).
- 8 Tavano O L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013, 901-11
- 9 *Bacillus Licheniformis* TSCA Section 5(h)(4) Exemption: Final Decision Document.
- 10 Horinouchi S and Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J Bacteriol*. 1982, 150(2), p. 804-814
- 11 Examples of Host-Vector Systems and Access Factors.
- 12 添付 5: Outline of pJPV002 and pJPV003 construction. (社内文書)
- 13 添付 6: Degestibility of 10R protein in a product formulation. (社内文書)
- 14 添付 7: Assessment of sequence homology of 10R protease expressed by JPBL001 to allergens (List of allergens from allergenonline のページを省略) . (社内文書)
- 15 Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R and Sloma A. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(4), p. 204-212
- 16 Agaisse H and Lereclus D. Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIII_A toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol*. 1994, 13(1), p. 97-107
- 17 Federici B A. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J Invertebr Pathol*. 2005, 89(1), p. 30-38
- 18 添付 8: DNA sequences of pJPV002 and pJPV003. (社内文書)
- 19 添付 9: DNA sequences *** (社内文書)
- 20 添付 10: Sequence *** (社内文書)
- 21 添付 11: Sequence *** (社内文書)
- 22 Zhou C E, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer M D and Slezak T. MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res*. 2007, 35(Database issue), p. D391-394

- 23 FSANZ. "Standard 1.3.3 Processing aids. Australia New Zealand Food Standards Code 2015-08-06.
<https://www.legislation.gov.au/Details/F2015C00653>,
- 24 Légifrance. Légifrance.gouv.fr. 2016-01-22.
<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000020667468>, (cited 2016-06-21)
- 25 FDA U S. "Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000564". GRAS Notice Inventory. 2015-07-07.
<https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/NoticeInventory/ucm469794.htm>, (cited 2016-06-28)
- 26 添付 12: Analysis of residual DNA in 10R's product formulation. (社内文書)
- 27 JECFA. General Specifications and Considerations for Enzyme Preparations used in Food Processing
- 28 FCC. Monographs / Enzyme Preparations