

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

RFESC02 株を利用して生産された
リボフラビン

2017年11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 |
| 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..... | 10 |
| 7. 抗生物質耐性マーカ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..... | 11 |

| | |
|---|----|
| 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 | 11 |
| 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 | 12 |
| 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 | 12 |
| 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 | 12 |
| Ⅲ. 食品健康影響評価結果 | 12 |
| <参照> | 13 |

<審議の経緯>

2017年4月20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（厚生労働省発食安0420第2号）、関係書類の接受

2017年4月25日 第647回食品安全委員会（要請事項説明）

2017年5月18日 第160回遺伝子組換え食品等専門調査会

2017年10月27日 第166回遺伝子組換え食品等専門調査会

2017年11月14日 第673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>

2017年9月30日まで

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

2017年10月1日より

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

<専門参考人>

澤田 純一（独立行政法人医薬品医療機器総合機構テクニカルエキスパート）
（第166回遺伝子組換え食品等専門調査会）

要 約

「RFESC02 株を利用して生産されたリボフラビン」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行った。

本添加物は、リボフラビンの生産性を高めるために *Bacillus subtilis* 168 株の突然変異株である *B. subtilis* RB50 株を宿主として、変異型トランスケトラーゼ遺伝子の導入、改変リボフラビン生合成遺伝子群（改変 *rib* オペロン）の導入、自然変異型フラボキナーゼ遺伝子の再導入及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失を行って作製された RFESC02 株を利用して生産されたリボフラビンである。改変 *rib* オペロンは、*B. subtilis* のバクテリオファージ SP01 由来のプロモーター及び改変 5'リーダー配列並びにリボフラビン生合成遺伝子から構成される。本添加物は、栄養強化又は着色の目的で、菓子類及びスポーツ飲料等の食品に利用されている。

「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、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、「RFESC02 株を利用して生産されたリボフラビン」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：RFESC02 株を利用して生産されたりボフラビン
用 途：菓子類、スポーツ飲料等の栄養強化又は着色
申請者：DSM 株式会社
開発者：DSM（オランダ）

本添加物は、リボフラビンの生産性を高めるために *Bacillus subtilis* 168 株の突然変異株である *B. subtilis* RB50 株を宿主として、変異型トランスケトラーゼ遺伝子の導入、改変リボフラビン生合成遺伝子群（改変 *rib* オペロン）の導入、自然変異型フラボキナーゼ遺伝子の再導入及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失を行って作製された RFESC02 株を利用して生産されたりボフラビンである。改変 *rib* オペロンは、*B. subtilis* のバクテリオファージ SP01 由来のプロモーター及び改変 5'リーダー配列並びにリボフラビン生合成遺伝子から構成される。本添加物は、栄養強化又は着色の目的で、菓子類及びスポーツ飲料等の食品に利用されている。

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：リボフラビン（ビタミン B₂）

基 原：化学合成又は *Eremothecium ashbyii*、*Ashbya gossypii* 等の発酵

有効成分：リボフラビン

CAS No. : 83-88-5

(2) 製造方法

ブドウ糖から D リボースを合成し、3,4-キシリジンとの縮合により生成した 1-D-リビチルアミノ-3,4-ジメチルベンゼンをジアゾカップリングし、さらにバルビツール酸と縮合することにより製造される。また、*Eremothecium ashbyii* 及び *Ashbya gossypii* 等の微生物を培養し、精製することにより製造される。

(3) 用途及び使用形態

ビタミン B₂ として栄養強化又は着色の目的で、パン類、菓子類、スポーツ飲料、マヨネーズ等の食品に使用される。

(4) 摂取量

一日当たりの平均摂取量は 1.17 mg である（参照 1）。

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. subtilis* RB50 株である。*B. subtilis* RB50 株は、野生株 *B. subtilis* 168 株のリボフラビン及びプリン生産調節が解除された突然変異株である。

(2) DNA 供与体の種名、株名又は系統名等及び由来

変異型トランスケトラーゼ (*tkt*) 遺伝子及び自然変異型フラボキナーゼ (*ribC*) 遺伝子の供与体は、いずれも *B. subtilis* 168 株由来の株である。改変 *rib* オペロンのプロモーター P_{spo15} 及び 5'リーダ配列 (P_{spo15} -改変リーダ配列) の供与体は、それぞれバクテリオファージ SP01 及び *B. subtilis* 168 株由来の株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

変異型 *tkt* 遺伝子は、アミノ酸残基 1 つが置換された低活性型トランスケトラーゼを発現する。自然変異型 *ribC* 遺伝子は、自然変異により宿主中に存在し、野生型フラボキナーゼのアミノ酸残基が 1 つ置換された変異型フラボキナーゼを発現する。 P_{spo15} -改変リーダ配列 は、バクテリオファージ SP01 由来のプロモーター P_{spo15} に改変 5'リーダ配列を連結させ、下流のリボフラビン生合成遺伝子 (*rib G*、*rib B*、*rib A*、*rib H* 及び *rib T*) を恒常的に発現させる。

中間株である *B. subtilis* BS5596 株 (2001 年に遺伝子組換え添加物として安全性審査が終了しているリボフラビンの生産菌) の *rib* オペロン領域及びバチロペプチターゼ F (*bpr*) 遺伝子領域に導入されていた、プロモーター P_{spo15} を野生型プロモーターと置換又は追加挿入した *rib* オペロン (修飾型 *rib* オペロン) を含むプラスミド pRF69 及び pRF93 由来の挿入 DNA 断片は、相同組換えにより宿主ゲノムから除去し、同領域を野生型に回復した。目的 DNA 配列は、形質転換法及び PBS1 ファージによる形質導入法により、宿主ゲノムに導入した (参照 2、3、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. subtilis は、長期にわたり食品や食品添加物の製造に安全に使用されてきた経験がある。

4. 宿主の構成成分等に関する資料

B. subtilis 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：リボフラビンユニバーサル

有効成分：リボフラビン

CAS No. : 83-88-5

(2) 製造方法

リボフラビンユニバーサルは、RFESC02 株を生産菌として、培養、滅菌、結晶化、ろ過等の工程を経て製造される。生産菌は熱処理による滅菌後、分離・除去される。なお、最終製品の純度は、98.0%以上 101.0%以下である(参照 6)。

(3) 用途及び使用形態

リボフラビンユニバーサルの用途及び使用形態は、従来のリボフラビンと同様である。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

リボフラビンユニバーサルは、従来のリボフラビンと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

リボフラビンユニバーサルと従来のリボフラビンとの相違点はない。

(2) 組換え体と宿主

RFESC02 株と宿主との相違点は、リボフラビン生合成遺伝子の 5'リーダー配列が、プロモーターP_{spo15}により恒常的に発現するように改変されている点、野生型 *tkt* 遺伝子が変異型 *tkt* 遺伝子に置換され、リボフラビン生合成の中間体の代謝が抑制されている点及びポリグルタミン酸生合成遺伝子群が不活化され、発酵中における粘度削減が図られている点である。

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. subtilis* RB50 株である。*B. subtilis* は、自然界に広く存在している。

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. subtilis 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において BSL1 に相当する。

3. 寄生性及び定着性に関する事項

B. subtilis には、ヒトに対する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. subtilis 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. subtilis は、毒性物質を生産することが知られている *B. cereus* 及び *B. anthracis* 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

中間株である BS5596 株へ導入された pRF69 及び pRF93 の構築には、*E. coli* 由来のプラスミド pUC19 が、BS5596 株の作製過程で一時的に用いられたプラスミド pKT2-tet 及び pRF82 の構築には、*E. coli* 由来のプラスミド pUC18 がそれぞれ用いられた(参照 7)。なお、いずれのプラスミドの配列も生産菌中には残存していない。

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 及び pUC18 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 及び pUC18 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 及び pUC18 の構造及び性質は明らかであり、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 及び pUC18 には、*E. coli* 由来の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 及び pUC18 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 及び pUC18 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

変異型 *tkl* 遺伝子及び自然変異型 *ribC* 遺伝子の供与体は、いずれも *B. subtilis* 168 株由来の株である。改変 *rib* オペロンのプロモーター及び 5'リーダー配列の供与体は、それぞれバクテリオファージ SP01 及び *B. subtilis* 168 株由来の株である。

(2) 安全性に関する事項

B. subtilis は国立感染症研究所病原体等安全管理規程において BSL1 に相当する。*B. subtilis* バクテリオファージ SP01 のファージ DNA は、*B. subtilis* の内在性 DNA と考えられている（参照 8）。

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

変異型 *tkl* 遺伝子は、*B. subtilis* 168 株由来の株の染色体 DNA を鋳型として変異導入 PCR 法により得た。P_{spo15}-改変リーダー配列は、改変 *rib* リーダー配列及び野生型 *rib* オペロンを有する *B. subtilis* 168 株由来の株を鋳型として PCR にて合成した。自然変異型 *ribC* 遺伝子は、*B. subtilis* 168 株由来の株が有するバクテリオファージ PBS1 を感染させることで得た。

(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

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

① 変異型 *tkl* 遺伝子

アミノ酸残基が 1 つ置換した低活性型トランスケトラーゼが発現することにより、リボフラビン生合成の中間体の代謝が抑制され、その結果、リボフラビン生合成を増加させる。

② P_{spo15}-改変リーダー配列

バクテリオファージ SP01 由来の強力なプロモーター P_{spo15} に改変 5'リーダー配列が連結され、下流のリボフラビン生合成遺伝子の恒常的発現を誘導する。

③ 自然変異型 *ribC* 遺伝子

アミノ酸残基が 1 つ置換した変異型フラボキナーゼが発現することにより、リボフラビン生合成の抑制機構が解除され、リボフラビンの生合成が増加する。生産菌の構築過程で野生型に回復した *ribC* 遺伝子を再置換する。

これらの挿入遺伝子の産物が有害作用を持つという報告はない。また、これらはリボフラビンの生合成又は代謝経路で働くものであり、それらの産物がそのまま添加物として使用されるものではない。

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

改変 *rib* オペロンのプロモーターは、バクテリオファージ SP01 の P_{spo15} 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

新たなターミネーターは挿入されていない。

(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

リボフラビン生合成遺伝子の発現を増強するため、改変 5'リーダー配列が挿入されている。

4. ベクターへの挿入 DNA の組込方法に関する事項

中間株である BS5596 株の構築過程で、プラスミド pRF69 及び pRF93 を用いたが、生産菌からは pRF69 及び pRF93 由来の挿入 DNA 断片は除去されている。BS5596 株以降の構築過程においては、PCR により合成された挿入 DNA 配列を、形質転換法及び PBS1 ファージによる形質導入法により宿主に導入した。

5. 構築された発現ベクターに関する事項

発現用ベクターは使用されていない。

6. DNA の宿主への導入方法に関する事項

宿主の *rib* オペロン領域及び *bpr* 遺伝子領域に、修飾型 *rib* オペロンを含むプラスミド pRF69 及び pRF93 をそれぞれ複数コピー導入し、中間株である BS5596 株を得た。BS5596 株をランダム変異処理し、黄色を呈するコロニーを選択することにより、リボフラビン高生産株を得た後、抗生物質耐性マーカー遺伝子カセットを用いた形質転換法及び PBS1 ファージによる形質導入法により、野生型 *tkl* 遺伝子の変異型 *tkl* 遺伝子への置換、プラスミド pRF69 及び pRF93 に由来する挿入 DNA 断片の除去 (*rib* オペロン領域及び *bpr* 遺伝子領域の野生型への回復)、リボフラビン生合成遺伝子上流への P_{spo15}-改変リーダー配列の導入、ポリグルタミン酸生合成遺伝子群の一部欠失、野生型 *ribC* 遺伝子の自然変異型 *ribC* 遺伝子への再置換及び抗生物質耐性マーカー遺伝子の除去を行い、RFESC02 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

生産株構築の過程で、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ネオマイシン及びエリスロマイシン耐性遺伝子が使用されたが、全て生産菌からは除去されている。サザンブロット分析により、生産菌中にこれら抗生物質耐性マーカー遺伝子が存在していないことを確認している（参照 9）。

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

RFESC02 株は、*rib* オペロン領域への P_{spo15}-改変リーダー配列の導入、*tkt* 遺伝子の変異導入及びポリグルタミン酸合成遺伝子群の一部欠失により、リボフラビンの高生産能を有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

挿入 DNA の制限酵素による切断地図は明らかになっている（参照 10）。また、サザンブロット分析及びゲノムシーケンズ解析の結果、宿主ゲノム上で意図した変化が生じていることを確認している（参照 11、12）。

(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 と宿主ゲノムとの接合部位に新た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 は、変異型 *tkt* 遺伝子及び自然変異型 *ribC* 遺伝子のアミノ酸変異を導入した部位を跨ぐ領域で、それぞれ 4 個及び 3 個、P_{spo15}-改変リーダー配列の挿入領域で 7 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認められなかった。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タンパク質データベース^bを用いて相同性検索を行った結果、相同性を示す既知の毒性タンパク質は認められなかった(参照 13、14)。

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

リボフラビンユニバーサルの製造原料及び製造器材は、食品及び食品添加物規

^a Allergen Online, Version 16

^b SWISS-PROT Release 2016_01

格に適合したものであり、長期間にわたり安全に使用されてきた実績を有する。

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

リボフラビンユニバーサル[®]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

リボフラビンユニバーサルは、2010年に米国において GRAS として認証されているほか、EU、カナダ、オーストラリア及びニュージーランドにおいて使用が認められている。

2. 組換え体の残存に関する事項

リボフラビンユニバーサル中の組換え DNA の残存を定量 PCR により分析した結果、検出限界（1 ppb）以下であった（参照 15）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

リボフラビンユニバーサルは、欧州薬局方で規定されている不純物（リボフラビンの類縁物質 4 種、類縁物質以外の不特定の不純物及び類縁物質を含む総不純物）の規格値に適合することを確認している（参照 6）。

4. 精製方法及びその効果に関する事項

リボフラビンユニバーサルは、培養液中に分泌され、粗ろ過、結晶化、除菌ろ過、濃縮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。

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

リボフラビンユニバーサルにおいて、含有量の変動により有害性が示唆される常成分は知られていない。

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

「RFESC02 株を利用して生産されたリボフラビン」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. 平成 27 年国民健康・栄養調査の概要, 厚生労働省
2. 添付12 : Transformation of *B. subtilis* (社内資料) Kunst F and Rapoport G, Salt Stress Is an Environmental Signal Affecting Degradative Enzyme Synthesis in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol*, 1995
3. 添付13 : Transduction of *B. subtilis* (社内資料) Harwood CR and Cutting SM, *Molecular Biological Methods for Bacillus*, 1990
4. 添付31 : 瀬戸裕之, 宮崎 功, 遺伝子工学実験講座 II.細胞へのDNA導入と形質転換, *RADIOISOTOPES*, 1987
5. 添付15 : 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」平成22年6月 国立感染症研究所
6. 添付24 : Certificate of Analysis (社内資料)
7. 添付6 : BS5596株の構築に用いられたベクターおよびプラスミド (社内資料)
8. 添付11 : Search nucleotide sequence using Blastn (nucleotide BLAST) (社内資料)
9. 添付20 : リボフラビン生産菌RFESC02 株中に抗生物質耐性遺伝子が含まれないことの確認 (社内資料)
10. 添付34 : DNA sequences extracted from RFE.SC02 whole-genome sequence and their restriction maps (社内資料)
11. 添付17 : Absence of the plasmids pRF69 and pRF93 in the *Bacillus subtilis* riboflavin producing strain RFESC02, 2013 (社内資料) Reference 1 - Sequences of the *rib* region in RFESC02. References 2 - Alignment of the *rib* region of RFESC02 and *B. subtilis* 168. References 3 - Sequences of the *bpr* gene of RFESC02
12. 添付33 : Confirmation of the engineered mutations in the Riboflavin production strain RFESC02 (BS5939) (社内資料)
13. 添付21 : オープンリーディングフレーム、アレルゲンおよび毒性タンパク質の検索結果 (変異型 *tkt*, 自然変異型 *ribC*) (社内資料)
14. 添付22 : オープンリーディングフレーム、アレルゲンおよび毒性タンパク質の検索結果 (P_{spo15} -改変リーダー配列) (社内資料)
15. 添付16 : Memo: PCR analysis of the recombinant DNA content in the Riboflavin products produced by the self clone RFESC02 strain, 2013 (社内資料)