

(案)

遺伝子組換え食品等評価書

JPBL010 株を利用して生産された
 α -アミラーゼ

令和3年（2021年）12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	3
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	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	7
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遺伝子を含む。）及びその遺伝 子産物の性質に関する事項	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	9
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>

2021年7月14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0714第7号）、関係書類の接受

2021年7月27日第826回食品安全委員会（要請事項説明）

2021年8月25日第214回遺伝子組換え食品等専門調査会

2021年12月14日第842回食品安全委員会（報告）

<食品安全委員会委員名簿>

山本 茂貴（委員長）
浅野 哲（委員長代理 第一順位）
川西 徹（委員長代理 第二順位）
脇 昌子（委員長代理 第三順位）
香西 みどり
松永 和紀
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>

2021年9月30日まで

中島 春紫（座長）
児玉 浩明（座長代理）
安達 玲子 近藤 一成
飯島 陽子 手島 玲子
岡田 由美子 樋口 恭子
小関 良宏 山川 隆
小野 竜一 吉川 信幸
橘田和美

2021年10月1日から

中島 春紫（座長）
山川 隆（座長代理）
安達 玲子 小野 竜一
岡田 由美子 近藤 一成
小関 良宏 樋口 恭子
小野 道之 藤原 すみれ

要 約

「JPBL010 株を利用して生産された α -アミラーゼ」について、食品健康影響評価を実施した。

本添加物は、*Bacillus licheniformis* Ca63 株を宿主とし、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子を導入することで作製した JPBL010 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4 結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素であり、パンの老化防止に使用される。

「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、「JPBL010 株を利用して生産された α -アミラーゼ」については、人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

(申請内容)

品 目：JPBL010 株を利用して生産された α -アミラーゼ

用 途：パンやケーキ類の老化防止

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* Ca63 株を宿主とし、*Geobacillus stearothermophilus* C599 株由来の改変 α -アミラーゼ遺伝子を導入することで作製した JPBL010 株を利用して生産された α -アミラーゼである。本添加物は、グルコース重合体の α -1,4 結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素であり、パンの老化防止に使用される。

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： α -アミラーゼ (NM447)^a

生 産 菌：*Bacillus subtilis* NZYM-SO 株

有効成分： α -アミラーゼ

IUB No. : EC 3.2.1.1

CAS No. : 9000-90-2

(2) 製造方法

NM447 は、培養、ろ過、精製等の工程を経て製造される。生産菌は、除菌ろ過により除去される。

(3) 用途及び使用形態

NM447 は、耐熱性を有しパンやケーキ類の老化防止の目的で用いられる。

NM447 は、パンやケーキ類焼成の最終段階で高温により失活する。

(4) 摂取量

NM447 が全てのパン類・菓子パン類の製造に使用され、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、5.6 μ g TOS (Total Organic Solids) / 日 / kg 体重である (参照 1)。

^a 安全性審査が終了した α -アミラーゼ (2015 年 5 月 11 日官報掲載)

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

α -アミラーゼ (*amyM447*) 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* C599 株である。*prsA* 遺伝子の供与体は *B. licheniformis* Ca63 株である。

(3) 挿入 DNA の性質及び導入方法

amyM447 遺伝子は、*G. stearothermophilus* C599 株由来の α -アミラーゼ (TS-25) のアミノ酸配列中複数のアミノ酸置換した NM447 をコードする。TS-25 と比較して耐熱性が向上している。*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。

amyM447 遺伝子発現カセット及をインテグラーゼにより宿主ゲノムの標的遺伝子座に導入した。その際、一部の標的遺伝子座において遺伝子欠失が確認された。*prsA* 遺伝子発現カセットは相同組換えにより標的伝子座に導入した。なお、標的遺伝子座の複数種類の遺伝子をあらかじめ欠失させている（参照 2）。

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。*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（以下「BSL」という。）1 に相当する（参照 3）。

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：NM447

有効成分： α -アミラーゼ

IUB No.：EC 3.2.1.1

CAS No.：9000-90-2

(2) 製造方法

NM447 は、JPBL010 株を生産菌として、従来の α -アミラーゼと同様に、培養、ろ過、製剤化等の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

NM447 は、従来の α -アミラーゼと同様である。

(4) 有効成分の性質及び従来の添加物との比較

NM447 は、従来の α -アミラーゼと同一である。

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

JPBL010 株の産生する NM447 と従来の *B. subtilis* NZYM-SO 株が産生する NM447 との相違点は、生産菌が異なる点である。

(2) 組換え体と宿主

JPBL010 株と宿主との相違点は、JPBL010 株には *amyM447* 遺伝子及び *prsA* 遺伝子が挿入されている点並びに複数遺伝子を欠失している点である。

以上 1 から 6 までから、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、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。

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における BSL1 に相当する（参照 3）。

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 の近縁種である *Bacillus subtilis* 及び *Bacillus pumilus* が知られているが、毒性物質を生産する *Bacillus cereus* 等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pJPV042 及び pJPV035 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 4）。

(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。

(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

amyM447 遺伝子の供与体は、*G. stearothermophilus* C599 株である。*prsA* 遺伝子の供与体は *B. licheniformis* Ca63 株である。

(2) 安全性に関する事項

G. stearothermophilus は、ヒトに対する病原性及び毒素産生性は知られていない。*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。これらは、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 3）。

2. 挿入 DNA 又は遺伝子（抗生物質耐性マーカー遺伝子を含む。）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又は合成方法に関する事項

amyM447 遺伝子は、*G. stearothermophilus* C599 株より PCR 法により取得した *amyM* 遺伝子に位置特異的変異導入法を用いて複数のアミノ酸が置換する変異を導入した。また、*B. licheniformis* Ca63 株由来の α -アミラーゼ遺伝子及び *B. amyloliquefaciens* DSM7 株由来の α -アミラーゼ遺伝子のシグナル配列を組み合わせた配列が分泌シグナルとして付加されている。

prsA 遺伝子は *B. licheniformis* Ca63 株より PCR 法により取得した。

(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 の塩基数及び塩基配列と制限酵素による切断地図は明らかになっている (参照 6)。

(3) 挿入遺伝子の機能に関する事項

amyM447 遺伝子がコードする NM447 は、グルコース重合体の α -1,4 結合を加水分解し、デキストリン及びオリゴ糖を生成させる酵素である (参照 5)。

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し、NM447 の菌対外分泌量を増加させる (参照 6)。

NM447 を有効成分とする酵素製剤は、食品用酵素として 5 年程前から使用されており、アレルギー誘発性を示唆する報告はない。

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、既に安全性審査の終了した「NZYM-AV 株を利用して生産された α -アミラーゼ」の生産菌にも導入されている。

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

amyM447 遺伝子及び *prsA* 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。*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 *Bacillus 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。*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

amyM447 遺伝子のターミネーターは、*B. licheniformis* Ca63 株由来の *amyL* ターミネーター配列及び *B. clausii* DSM8716 株由来の *aprH* ターミネーター配列である。*prsA* 遺伝子のターミネーターは、*B. clausii* DSM8716 株由来の *aprH* 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

amyM447 遺伝子の発現制御に、*B. clausii* DSM8716 株由来の *amyL* RBS 配列及び *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* DSM 5525 株由来の *cry3A* mRNA 安定化配列を用いている。*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、タンパク質をコードする領域は含まれない。そのほか、インテグラーゼ認識配列を用いている。

prsA 遺伝子の発現制御に、*cry3A* mRNA 安定化配列を用いている。

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断片、*cry3A* mRNA 安定化配列、*amyL RBS/amyM447* 遺伝子断片等を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV042 を作製した。同様に、プラスミド pE194 に *prsA* 遺伝子断片、*cry3A* mRNA 安定化配列等を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV035 を作製した。

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 pJPV042 及び pJPV035 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 7、8）。

(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 pJPV042 及び pJPV035 上の意図する挿入領域は、それぞれ *amyM447* 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットの領域である。

(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 pJPV042 及び pJPV035 は、全長塩基配列を解析した結果、その配列は構築したとおりであることが確認され、精製されたものが用いられていることから、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

宿主ゲノムの各標的遺伝子座に、あらかじめマーカー遺伝子発現カセット（P3 プロモーター、*cry3A* mRNA 安定化配列、マーカー遺伝子及びインテグラーゼ認識配列を含む。）を相同組換えにより導入し、各マーカーにより選抜した。その後、遺伝子導入用ベクター pJPV042 を導入し、インテグラーゼの作用によって

amyM447 遺伝子発現カセットを挿入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜した。各標的遺伝子座においては、*cry3A* mRNA 安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子、インテグラーゼ遺伝子、インテグラーゼ認識配列及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落した。

宿主ゲノムの標的遺伝子座にあらかじめマーカー遺伝子発現カセット (P3 プロモーター、*cry3A* mRNA 安定化配列及びマーカー遺伝子を含む。) を相同組換えにより導入し、マーカーにより選抜した。次に、遺伝子導入用ベクター pJPV035 を相同組換えにより導入し、エリスロマイシン耐性を示す形質転換体を選抜した。その後、*cry3A* mRNA 安定化配列間でループアウトが生じ、マーカー遺伝子及びエリスロマイシン耐性遺伝子が宿主ゲノムから脱落した。

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 pJPV042 及び pJPV035 はエリスロマイシン耐性遺伝子を持つが、宿主のゲノムからループアウトにより脱落している。生産菌株には抗生物質耐性マーカー遺伝子は存在しないことをシーケンス解析により確認している。

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

JPBL010 株は、*amyM447* 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットが導入され、複数の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

amyM447 遺伝子発現カセット及び *prsA* 遺伝子発現カセットの標的遺伝子座の導入位置を確認するためにシーケンス解析を行った結果、*amyM447* 遺伝子が複数コピー及び *prsA* 遺伝子が挿入されていることが確認された。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シーケンス解析により明らかになっている (参照 9)。

(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 (以下「ORF」という。) 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。なお、マーカー遺伝子発現カセットのみを挿入した遺伝子座において、マーカー遺伝子を除去した結果、*amyL* ターミネーター、インテグラーゼ認識配列等が残存したため、この領域においても 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までで終結する連続する 30 アミノ酸以上の ORF が合計 335 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した 8 アミノ酸配列が一致する既知のアレルゲンはなかった（参照 10～14）。

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^c（参照 15）を用いて E-value<0.02 を指標として検索を行った。その結果、毒性タンパク質と相同性を有する ORF は検出されなかった（参照 10～14）。

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

NM447 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

NM447 製剤の製造原料及び製造器材は、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。また、本製品の原料は Food Chemicals Codex (FCC) 等の規格に適合している。

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

NM447 製剤は、日本を含む世界各国で 5 年以上使用されている。JPBL010 株を利用して生産された NM447 製剤は、デンマークにおいては 2020 年に、フランスにおいては 2021 年に、それぞれ食品用加工助剤として承認されている。

2. 組換え体の残存に関する事項

PCR 法により、NM447 製剤には、組換え DNA が検出されないことが確認された（参照 16）。

3. 製造に由来する非有効成分の安全性に関する事項

NM447 製剤は、食品衛生法の規格基準を満たしている（参照 17）。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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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。

^b ネブラスカ大学アレルゲンデータベース（FARRP version 20）

^c 検索日：2020 年 7 月

4. 精製方法及びその効果に関する事項

NM447 製剤は、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ることで得られる。適切な製造管理の下で製造が行われるならば、これらの工程において安全性に問題のある物質が混入することはないと考えられる。

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

NM447 製剤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、適切な製造管理の下で製造が行われるならば、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が得られている。

Ⅲ. 食品健康影響評価結果

「JPBL010 株を利用して生産された α -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、人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. 2020. 平成 30 年国民健康・栄養調査報告
2. *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 (社内文書)
3. 国立感染症研究所病原体等安全管理規程
4. Horinouchi S, Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *Journal of Bacteriology*, Article 1982;150(2):804-814.
5. 食品用酵素データ集－取り扱い手法と実践－: 株式会社シーエムシー出版; 2013 年 7 月 31 日
6. Kontinen VP, Sarvas M. The PrsA lipoprotein is essential for protein secretion in *Bacillus subtilis* and sets a limit for high - level secretion. *Molecular Microbiology*, Article 1993;8(4):727-737.
7. 遺伝子導入ベクター pJPV042 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
8. 遺伝子導入ベクター pJPV035 の DNA 塩基配列並びに構成 (社内文書)
9. JPBL010 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社内文書)
10. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL010 to allergens and toxins (社内文書)
11. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL010 to allergens and toxins (社内文書)
12. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL010 to allergens and toxins (社内文書)
13. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL010 to allergens and toxins (社内文書)
14. Sequence homology of ORFs in the *** locus on the genome of JPBL010 to allergens and toxins (社内文書)
15. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD et al. MvirDB--a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. *Nucleic Acids Res* 2007;35(Database issue):D391-394.
16. Absence of recombinant DNA from the production strain (社内文書)
17. Characterization of Representative Batches from JPBL010 (社内文書)