

**組換え DNA 技術応用飼料添加物の
安全性確認**

**LYS-No.2F 株を利用して生産された
塩酸 L-リジン**

**平成 24 年 7 月 5 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

	I	はじめに	2
	II	確認対象飼料添加物の概要	2
5	III	審議内容	3
	1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項	3
	2	組換え体等に関する事項	3
	(1)	GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリ-1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項	3
10	(2)	組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項	3
	(3)	宿主に関する事項	3
	(4)	ベクターに関する事項	5
	(5)	挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	7
15	(6)	組換え体に関する事項	9
	3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	9
	(1)	飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項	9
	(2)	飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項	10
	4	生産物に関する事項	10
20	(1)	組換え体の混入を否定する事項	10
	(2)	製造に由来する不純物の安全性に関する事項	10
	(3)	精製方法及びその効果に関する事項	10
	(4)	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	10
25	(5)	組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項	11
	5	2から4までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項	11
	IV	審議結果	11
30	V	参考文献及び参考資料	11

「LYS-No.2F 株を利用して生産された塩酸 L-リジン」に係る安全性確認

I はじめに

35 「LYS-No.2F 株を利用して生産された塩酸 L-リジン」について、平成 24 年 4 月 9 日付けで遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

40 II 確認対象飼料添加物の概要

添加物：LYS-No.2F 株を利用して生産された塩酸 L-リジン

有効成分概要

一般名	分子式(分子量)	化学名(IUPAC)	CAS 番号
塩酸 L-リジン L-Lysine Hydrochloride	$C_6H_{14}N_2O_2 \cdot HCl$ (182.65)	(2S)-2,6-Diaminohexanoic acid monohydrochloride	657-27-2

用途：飼料の栄養成分その他の有効成分の補給

申請者：味の素株式会社

45 開発者：味の素株式会社

「LYS-No.2F 株を利用して生産された塩酸 L-リジン」(以下、「本添加物」という。)は、「組換え体利用飼料添加物の安全性評価指針の制定について」(平成 8 年 5 月 17 日付け 8 畜 A 第 1147 号農林水産事務次官通達)に基づき、平成 13 年に安全性が確認されている塩酸 L-リジン(以下、「既存の添加物」という。)の生産菌の生産効率を高めるため、腸内細菌(*Escherichia coli* K-12 株)、コリネ型細菌(*Corynebacterium glutamicum*)及び枯草菌(*Bacillus subtilis*)由来の L-リジン生合成に関与する遺伝子を、既存の添加物の生産菌と同じ宿主菌である *E.coli* K-12 株の染色体に組み込むことにより作成された LYS-No.2F 株から生産された塩酸 L-リジンである。

宿主菌及び組み込んだ遺伝子の安全性は明らかとなっている。なお、本添加物の生産菌には、プラスミド及び抗生物質耐性マーカー遺伝子は含まれていない。また、生産菌は精製の過程で除去されているため本添加物には含まれていない。

60 本添加物と既存の添加物の成分等を比較した結果、含有成分が飼料添加物の成分規格を満たすこと、98.5%以上の純度に精製されており、有害性が示唆される非有効成分は含有している可能性は極めて低いことが確認された。

なお、本添加物は、既存の添加物と同様に、海外で製造され日本に輸入することを予定している。

65 審議の結果、「LYS-No.2F 株を利用して生産された塩酸 L-リジン」については、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき、安全性を確認して問題ないと考えられた。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

本添加物及び既存の飼料添加物の成分、品質及び使用方法について確認した結果、不純物を含めた成分組成は同等であり、使用方法も変わらないことから、本添加物及び既存の飼料添加物は同等であると考えられた（参考資料 2,13）。

また、宿主菌についても、本添加物は既存の添加物と同じ *E.coli* K-12 株を宿主としており同等である。

2 組換え体等に関する事項

(1) GILSP (Good Industrial Large-Scale Practice) 組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項

LYS-No.2F株の宿主菌である *E.coli* K-12株は、非病原性であり、ウイルス等の病原性に関係のある外来因子により汚染されておらず、長期にわたり工業的利用が安全になされているものであり、OECDではGILSP (Good Industrial Large-Scale Practice : 優良工業製造規範) が適用できる微生物、すなわち「特殊な培養条件下以外では増殖が制限されること、病原性がないこと等のため最小限の拡散防止措置をとることにより使用等を行うことができるもの。」に該当するとされている。

挿入遺伝子及びベクターは、DNAの分子量及び制限酵素による切断地図等が明らかとなっており、既知の有害な配列を含んでおらず、組換え体の外界での安定性を増大させるものでなく、遺伝子の伝達性を有さない。

組換え体のLYS-No.2F株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主と同程度に安全である。

以上のことから、LYS-No.2F株はGILSP組換え体に該当すると考えられる。なお、これらの事項に関する詳細は(3) 宿主に関する事項～(6) 組換え体に関する事項に記載した。

(2) 組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

LYS-No.2F株は、飼料添加物塩酸L-リジンの生産効率を向上させる目的で作成され、既存の添加物の生産菌と同様の方法で製造に利用される。なお、当該生産菌は添加物製造工程において、加熱により死滅し、精製により分離・除去されている（参考資料12,14）。

(3) 宿主に関する事項

ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

宿主菌はEnterobacteriaceae科 *Escherichia*属の *E.coli* K-12 株である。

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項（非病原性であること。）

115 一般に、家畜は*E.coli* を含む腸内細菌群を保持していることが知られている。また、宿主として用いられた*E.coli* K-12株は、有害生理活性物質を生産することは知られておらず、国立感染症研究所の病原体等安全管理規定によるバイオセーフティレベル分類では、レベル1 (BSL1) の微生物、すなわち「ヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みのないもの」と規定され、OECDではGILSPが適用できる宿主微生物に該当するとされている (参考文献1)。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

120 *E.coli* K-12株が腸管寄生性及び定着性を持つことは知られていない (参考文献2)。

エ ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

125 BSL1微生物のみを扱う実験室において管理されており、病原性の外来因子には汚染されていない。

オ 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

130 温度、pH、栄養素等の条件が適切に揃うことにより生存及び増殖が可能となる。これらの条件が揃わなければ増殖は制限される (参考文献3)。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

135 本宿主は、F因子 (性決定因子) 及び伝達性プラスミドを保有しておらず、有性生殖での遺伝子供与体とはならない (参考文献4)。したがって、他の微生物に組換え遺伝子を拡散するものではない。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

140 *E.coli* K-12株は、既存の添加物の生産菌株の宿主菌であり、これまでも飼料添加物生産に利用されている。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

145 *E.coli* K-12株は、通常の細菌同様、細胞分裂により増殖するが、増殖可能最高温度は45°C付近であり、50°C付近で死滅する。増殖速度が最大となる温度は40°C付近である。温度低下と共に増殖速度は低下し、10°C付近で実質的に増殖しなくなる (参考文献5)。

ケ 類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

150 *E.coli* の一部に*diarrheagenic E.coli* (下痢原性大腸菌) など病原性を有す種が知られているが、LYS-No.2F株宿主株である*E.coli* K-12株は、2の(3)のイに記載のとおり、病原性はなく、有害物質を産生するという事実も認められていない。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

155 染色体への遺伝子組込み用には、*E.coli* を宿主とするバクテリオファージMu由来のmini-Muを遺伝子組込みベクターとして使用している。このmini-MuベクターをプラスミドpMW119に搭載したものを、ヘルパープラスミドとしている（参考文献6、参考資料3）。このヘルパープラスミドに、L-リジン生合成関与遺伝子を搭載したプラスミドをmini-Muによる発現ベクターとしている（参考資料4）。プラスミドpMW119は、厚生労働省及び

160 経済産業省のGILSPリストに記載されるベクターpSC101に由来し、ヒトや家畜に対する有害性等は知られていない（参考文献7,8）。

また、相同組換えを用いた遺伝子組込み用に、pMAN997を相同組換え用ベクターとして用いている（参考文献9,10,11、参考資料3）。このpMAN997にL-リジン生合成関与遺伝子を搭載したプラスミドを相同組換えに用いる発現ベクターとしている。プラスミドpMAN997もプラスミドpMW119と同様にpSC101に由来する（参考文献7,8,10,11）。

165

なお、上述したmini-Muベクター、相同組換え用ベクター及びこれらに由来する発現ベクターは、平成23年に安全性が確認された飼料添加物塩酸L-リジンの生産菌LYS-No.1F株の構築にも使用されている。

170

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量を示す事項

175 mini-Muベクターは、バクテリオファージMuゲノムの左端と右端からなり、塩基数はそれぞれ445bpと112bpとなっている。また、mini-Muベクターを搭載するヘルパープラスミドの塩基数は5.4kbあるいは6.0kbとなっている。相同組換え用ベクターpMAN997の塩基数は4.1kbとなっている（参考文献3）。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

180 mini-Muベクターを搭載するヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターの制限酵素地図は明らかとなっている（参考文献3,4）。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

185 mini-Muベクターを搭載するヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター及び発現ベクターは既知の有害配列を含まない（参考文献6,12、参考資料3,4,11）。

ウ 薬剤耐性に関する事項

190 宿主への遺伝子組込み時に利用されるヘルパープラスミドpMH10、pKD46及びpMWint-xis、mini-Muベクターを搭載するヘルパープラスミド、相同組換え用ベクター並びに発現ベクターは、表に示す抗生物質耐性マーカー

195

遺伝子を含む（参考資料3,4,5）。これらの抗生物質耐性マーカー遺伝子は、各挿入遺伝子が染色体に導入された菌株を選別するために使用されている。選抜後、プラスミドとともに抗生物質耐性マーカー遺伝子を除去しているため、LYS-No.2F株は、抗生物質耐性マーカー遺伝子を有さない。生産菌LYS-No.2Fがこれらの抗生物質耐性マーカー遺伝子を含まないことは、PCR法により確認されている（参考資料10）。

200

表 使用された抗生物質耐性マーカー遺伝子（生産菌には含まれない）

遺伝子の種類	由来	遺伝子産物
アンピシリン耐性遺伝子	トランスポゾン Tn3	β ラクタマーゼ
カナマイシン耐性遺伝子	トランスポゾン Tn903	ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ
クロラムフェニコール耐性遺伝子	トランスポゾン Tn9	クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

エ 伝達性に関する事項

205

ヘルパープラスミドに搭載されたmini-Muベクターは、自己転移に必要な領域が除去されているため、自己転移能や伝達性を有さない。相同組換え用ベクター及び発現ベクターも同様に、自己転移に必要な領域が除去されているため、自己転移能や伝達性を有さない（参考文献6、参考資料3,4）。

オ 宿主依存性に関する事項

210

ヘルパープラスミドに搭載されたmini-Muベクターは、*E.coli* K-12株及び*Escherichia* 属細菌等の近縁種を宿主とすることが知られている（参考文献14）。ヘルパープラスミドの基となったプラスミドpMW119及び相同組換え用ベクターpMAN997もまた、*E.coli* K-12株及び*Escherichia* 属細菌等の近縁種を宿主とすることが知られている（参考文献9,15,10,11）。

215

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

ヘルパープラスミドは、プラスミドpMW119にmini-Muベクター配列を挿入後、ターミネーター断片及びプロモーター断片を挿入することにより作成した（参考資料3）。

220

発現ベクターは、クローニングしたL-リジンの生合成に関与する遺伝子を目的に応じて接続することにより遺伝子組込みユニットを形成し、ヘルパープラスミドのmini-Muの位置する遺伝子組込み領域に挿入することにより作成した。相同組換えに用いた発現ベクターも同様に、遺伝子組込みユニットをpMAN997に挿入することにより作成した（参考資料4,8）。

225

キ 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

230

mini-Muを用いた発現ベクター及び相同組換え用発現ベクターは塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、あるいはP1ファージによる形質導入法により宿主へ導入している（参考資料5）。発現ベクターあるいは挿入遺伝子の導入位置は、mini-Mu末端領域の配列の決定、あるいは相同組換え領域のPCR法による増幅により明らかとなっている（参考資料6）。

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

235

L-リジンの生合成に関与する遺伝子は*E.coli* K-12株、*C.glutamicum* 及び*B.subtilis* に由来する。*E.coli* K-12株は、腸内細菌目、腸内細菌科、エシェリヒア属に、*C.glutamicum* は、放線菌目、コリネバクテリウム科、コリネバクテリウム属に、*B.subtilis* は、バチルス目、バチルス科、バチルス属に分類される（参考文献16）。

240

イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

(ア) ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

PCR法あるいは供与体DNA断片のクローニングにより取得した組換え遺伝子を、制限酵素処理によりベクターへと組込み、発現ベクターとしている（参考資料4,7）。

245

(イ) 挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

mini-Muベクターを用いた方法、相同組換え法及びλ Red法により、各挿入遺伝子を宿主菌の染色体に導入している（参考資料5）。発現ベクター及びヘルパープラスミド上に存在する抗生物質耐性マーカー遺伝子により、組換え遺伝子が導入された菌株を選抜している。なお、抗生物質耐性マーカー遺伝子は、プラスミドとともに除去される。LYS-No.2F株から抗生物質耐性マーカー遺伝子が除去されていることはPCR法により確認されている（参考資料10）。

250

255

ウ 構造に関する事項

(ア) プロモーターに関する事項

外来プロモーターとして、*E.coli* に感染するバクテリオファージλに由来するプロモーター配列を使用している。その他のプロモーターは*E.coli* あるいは*E.coli* プラスミドに由来する（参考文献3）。

260

(イ) ターミネーターに関する事項

原核生物においては、各遺伝子の下流にターミネーターを接続しなくても、遺伝子を発現させることができる。そのためLYS-No.2F株においては、遺伝子毎にターミネーター配列を接続していない。ただし、遺伝子組込みユニットの、組込み位置周辺領域への影響を避けるため、各組込み

265

ユニットの下流領域に*E.coli* ファージ由来のバクテリオファージfdに由来するターミネーター配列が使用されている（参考資料8）。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

- 270 宿主に挿入されるDNAの全塩基配列は明らかとなっている。挿入遺伝子の内、*E.coli* K-12株に由来する遺伝子に、有害と考えられる配列は含まれていない。また、*C.glutamicum* 及び*B.subtilis* は非病原性のBSL1に分類される微生物として長年工業的に使用されており、本微生物より分離された遺伝子は一般に安全であると考えられる。その他使用されている
- 275 配列は、*E.coli* に感染するバクテリオファージ、*E.coli* のプラスミド、マルチクロニングサイト及びリンカーに由来し、有害塩基配列を含まないものを利用している。

エ 性質に関する事項

280 **(ア) 挿入DNAの機能に関する事項**

挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるたん白質はすべてL-リジンの生合成に関与する酵素たん白質であり、それぞれのたん白質の機能は明らかとなっている（参考資料9）。

285 **(イ) DNAの分子量を示す事項**

挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている（参考資料8）。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

- 290 宿主菌に導入された組換え遺伝子の切断地図及び用いた制限酵素の名称、断片の数、サイズ及びサザンブロットィング解析パターンは明らかになっている（参考資料4,8）。

オ 純度に関する事項

- 295 各挿入遺伝子の塩基配列、分子量及び由来は上記のとおり明らかとなっている。また、各挿入遺伝子はPCR法等を用いて純化しており、目的配列以外の配列は含まない（参考文献7,8）。

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

- 300 各挿入遺伝子を染色体に導入する際、2の（4）のウに示す抗生物質耐性マーカー遺伝子を菌株の選別のため使用した。いずれも厚生労働省、あるいは経済産業省のGILSPリストにおいてマーカーとして記載されているものであり、安全上の問題はないと考えられる（参考文献7,8）。LYS-No.2F株は、各挿入遺伝子の導入確認後、抗生物質耐性マーカー遺伝子を除去されている。すべての抗生物質耐性マーカー遺伝子が生産菌LYS-No.2F株から除
- 305 去されていることは、PCR法により確認されている（参考資料10）。

キ オープンリーディングフレーム（ORF）の有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

310 各遺伝子組込みユニット内部及び各遺伝子組込みユニットの染色体への導入によって新たに生じる境界領域から30アミノ酸残基以上の長さを有するORF（終始コドンから終始コドン）を抽出した。各ORFについてデータベースを用いて相同性検索を実施した結果、有害と考えられる配列との間に相同性は認められなかった（参考資料11）。

315 **（6）組換え体に関する事項**

ア 組換えDNA操作により新たに獲得された性質に関する事項（非病原性であること。）

320 組換えDNA操作により組込んだ遺伝子は、いずれもL-リジン生合成に関与する酵素遺伝子であり、病原性等を付与するものでない。また、有害と考えられるORFは見つかっておらず、有害なたん白質が発現するおそれはない（参考資料11）。そのためLYS-No.2F株は非病原性であると考えられる。

イ 宿主との差異に関する事項

325 宿主との差異は、L-リジンの生合成に関与する遺伝子が組み込まれている点のみである。組換えDNA操作により組込んだ遺伝子には有害と考えられる配列は含まれない。そのため、これらの組換えDNAを宿主に導入することにより、宿主に有害物質の産生性が付与されることはないと考えられる（参考文献9,11）。

330 **ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項**

組換え体と宿主株における、生存及び増殖能力に相違はなく、生存及び増殖が可能となるのは温度、pH、栄養素等の条件が揃う場合に限られる。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

335 通常の細菌同様、細胞分裂により増殖するが、増殖可能最高温度は45℃付近であり、増殖速度が最大となる温度は40℃付近である。温度低下と共に増殖速度は低下し、10℃付近で実質的に増殖しなくなる。

オ 不活化法に関する事項

340 製造工程において、培養液を120℃で加熱殺菌することにより不活化している。本添加物中に組換え体が残存しないことは、PCR法により確認されている（参考資料12）。

3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

345 **（1）飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項**

平成13年における既存の添加物の評価申請時から変更はなく、既存の添加物の製造で長年の使用実績がある飼料添加物の製造原料を用い、製造される。

(2) 飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項

350 平成13年における既存の添加物の評価申請時から変更はなく、既存の添加物の製造で長年の使用実績がある飼料添加物の製造器材を用い、製造される。

4 生産物に関する事項

(1) 組換え体の混入を否定する事項

355 PCR法により、本添加物中に組換え体が混入していないことが確認されている(参考資料12)。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

360 原料および製造工程は平成13年の評価申請時から変更していない。また、導入したL-リジンの生合成に関与する遺伝子は長年の工業生産実績のある遺伝子であり、ORFについてデータベースに対する相同性検索を実施した結果においても有害物質を発現すると考えられる配列との間に相同性は認められなかった(参考資料11)。また、本添加物は、比旋光度、アンモニウム塩、重金属、ヒ素、強熱残分を含む飼料添加物成分規格収載書の規格値をすべて満たしており(参考資料2)、さらに、アミノ酸分析計及び2種の液体クロマトグラフィーにより、本添加物と既存の添加物との不純物を比較した結果、申請品目において著しく増加した不純物や新たに生じた不純物は認められず、新たな意図しない成分は生じていないと考えられることから(参考資料13)、有害性が示唆される新たな非有効成分を含有している可能性は極めて低いと考えられた。

365

370

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

375 精製方法及びその効果は明らかとなっており、製造工程において有害物質が混入する可能性は極めて低いと考えられる。精製工程を経た添加物の製品は飼料添加物成分規格収載書の規格値を満足するものであり、また、長年の製造実績においてこれまで安全上の問題があったとの報告はない(参考資料2,14)。

(4) 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

380 これまでの既存の添加物の製造実績において、含有する常成分に有害性が示唆された報告はなく、本添加物の製造に用いられる原料及び製造方法は、既存の添加物の製造に使用されているものと同じである。

385 本添加物及び既存の添加物各3ロットの飼料添加物成分規格値(含量、比旋光度、アンモニウム塩、重金属、ヒ素、乾燥減量及び強熱残分)を比較した結果、すべて飼料添加物成分規格収載書の規格値の範囲内であり、本添加物と既存の添加物で有意な差異は認められなかったことから、本添加物の常成分の変動の範囲も従来の添加物と同じであると考えられる(参考資料2)。

(5) 組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項

390 LYS-No.2F株により製造された塩酸L-リジンの用途は、飼料添加物のみであり、食品添加物としては利用されない。本生産菌株を用いた塩酸L-リジンはすでにタイ及び欧州にて飼料添加物として販売されている。

395 5 2から4までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項
該当しない。

IV 審議結果

400 LYS-No.2F株を利用して生産された塩酸L-リジンについて、「組換えDNA技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手續」に基づき審議した結果、同第3条第1項による確認を行って差し支えないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

参考文献

1. OECD. 1992. SAFETY CONSIDERATIONS FOR BIOTECHNOLOGY
(<http://www.oecd.org/dataoecd/8/3/23755496.pdf>)
2. Gorbach, S. L., 1978, Recombinant DNA: an infectious disease perspective. J. Infect. Dis. 137: 615-623
3. US EPA 1997, *Escherichia coli* K-12 Derivatives Final Risk Assessment.
(http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra004.htm)
4. Curtis, R. 3rd., 1978, Biological containment and cloning vector transmissibility. J. Infect. Dis. 137: 668-675
5. Ingraham, J. L. and F. C. Neidhardt. Marr, 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella*. ASM Press, Washington, D. C.
6. Castilho, B. A., P. Olfson and M. J. Casadaban. 1984, Plasmid insertion mutagenesis and lac gene fusion with mini-Mu bacteriophage transposons. J. Bacteriol. 158: 488-495
7. 厚生労働省 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号に基づき厚生労働大臣が定める GILSP 遺伝子組換え微生物(平成十六年 厚生労働省告示第27号)
(http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic_regulations/GILSP_list_mhlw.pdf)
8. 経済産業省 遺伝子組換え生物等の第二種使用等のうち産業上の使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令別表第一号の規定に基づき経済産業大臣が定める GILSP 遺伝子組換え微生物
(http://www.bch.biodic.go.jp/download/law/domestic_regulations/GILSP_list_meti_ver5.pdf)
9. 特許協力条約に基づいて公開された国際出願 国際公開番号：WO99/03988 国際公開：

1999年1月28日

10. Matsuyama S. and S. Mizushima. 1985. Construction and Characterization of a Deletion Mutant Lacking *micF*, a Proposed Regulatory Gene for *OmpF* Synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 162: 1196-1202
11. Armstrong K. A., R. Acosta, E. Lender, Y. Mahida, M. Pancotto, M. McCormick, H. Ohtsubo and E. Ohtsubo. 1985. A 37 X 108 Molecular Weight Plasmid-encoded Protein is Required for Replication and Copy Number Control in the Plasmid pSC101 and its Temperature-sensitive Derivative pHS1. *J. Mo. Biol.* 175: 331-347.
12. NCBI (2007) National Center for Biotechnology Information (NCBI) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/67968376>
13. Datsenko K. A. and B. L. Wanner. 2000. One-step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia coli* K-12 Using PCR Products. *Proc. Acad. Natl. Sci. U. S. A.* 97: 6640-6645
14. Symonds, N. A. Toussaint, P. van Putte and M. M. Howe. 1987. Phage Mu. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
15. Hasunuma K. and Sekiguchi. 1979. Effect of *dna* mutations on the replication of plasmid pSC101 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 137: 1095-1099
16. Garrity, G. M. 2005, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer

参考資料 (申請者提出 社外秘)

1. LYS-No.2F 株の概要
2. 塩酸 L-リジン製造用原体 (その 2) 飼料添加物成分規格値分析結果
3. mini-Mu ベクター搭載ヘルパープラスミド及び相同組換え用ベクターの制限酵素地図
4. 発現ベクターの構築方法
5. 挿入遺伝子の宿主への組込み方法
6. 発現ベクターの宿主への挿入位置の確認実験結果
7. 挿入遺伝子のクローニングの方法
8. 各遺伝子組込みユニット及び組込み遺伝子の制限酵素地図
9. 各挿入遺伝子から発現されるたん白質の機能
10. 抗生物質耐性遺伝子が存在しないことの確認
11. L-リジン生産菌 LYS-No.2F 株において生じる ORF (オープンリーディングフレーム) の相同性検索結果について
12. 塩酸 L-リジン製品中にリジン生産菌が存在しないことの確認
13. 飼料添加物塩酸 L-リジン製品の不純物プロファイル比較結果
14. 精製の方法及び効果