

## ナチュラルオカレンス申請書式(事例)

### 【表紙】

タイトル ○○株を利用して生産された△△」

○○:生産菌株名、△△:添加物名

企業名

### 【目次】

1. △△の使用・開発目的
2. 宿主
3. プラスミドについて
4. 発現プラスミドに関して
5. ○○株が生産する△△と遺伝子供与体××株が生産する△△の同一性について
6. △△の製造について
7. □□属に属する微生物が自然界において遺伝子交換を行うことについて
8. 諸外国の規制、認可について

参考文献一覧

資料

### 【記載事項】

1. △△の使用・開発目的
  - ・既存添加物に該当する酵素であること
  - ・使用用途
  - ・△△の有用性
2. 宿主
  - ・科、属、種、株、由来等
  - 2.1 非病原性
    - ・植物、動物に対する病原性、毒性が報告されていないこと
    - ・国立感染衛生研究所病原体安全管理規程のバイオセーフティレベルによる判断

## 2. 2 その他の有害生理活性物質

- ・以下の微生物に対する抗菌性（抗菌性が認められないことを示す）

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538

*Escherichia coli* ATCC 11229

*Bacillus cereus* ATCC 2

*Bacillus circulans* ATCC 4516

*Streptococcus pyrogenes* ATCC 12344

*Serratia marcescens* ATCC 14041

## 2. 3 食経験について

- ・一般的に食品工業で当該宿主を用いた製造実績があること
- ・食品添加物の基原として利用されていること

## 3. プラスミドについて

### 3. 1 名称

### 3. 2 由来

### 3. 3 塩基配列、非有害性について

- ・プラスミド DNA の塩基数、塩基配列、制限酵素による切断地図が明らかであること
- ・ヒトに対して有害ではない根拠

### 3. 4 薬剤耐性

- ・選択マーカーとして薬剤耐性遺伝子を含む場合、その生産物(タンパク質)のアミノ酸配列や構造が判明していること
- ・本タンパク質が分解(消化)されること

### 3. 5 伝達性

- ・伝達性がないこと(参考論文を挙げる)

### 3. 6 宿主依存性

- ・□□属以外の微生物では複製されないこと
- ・特殊な培養条件下以外での安定性が低いこと

## 4. 発現プラスミドについて

### 4. 1 挿入遺伝子の供与体

- ・プロモーター遺伝子、酵素遺伝子、ターミネーター遺伝子等の挿入遺伝子及びその供与体

#### 4. 1. 1 挿入遺伝子供与体の安全性について

- ・病原性や毒素産生がないこと
- ・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1に該当すること

4. 1. 2 挿入遺伝子供与体の安全な摂取経験について
    - ・安全な微生物として一般的に認識され、広く利用されていること
    - ・食品添加物の基原として利用されていること
  4. 2 発現プラスミドの性質
    - ・該プラスミドの構成を図に示す。
  4. 3 プロモーターについて
    - ・該プラスミドに選定した理由について、実験結果を示しながら説明すること
  4. 4 発現プラスミドの構築
    - ・遺伝子のクローン化方法から発現プラスミドの作成方法
    - ・構築方法の過程を図に示すこと
  4. 5 発現プラスミドの宿主への導入方法
    - ・方法を記載する。一般的な方法であることを言及する。
  5. ○○株が生産する△△と遺伝子供与体××株が生産する△△の同一性について
    - ・○○株が生産する△△の構造遺伝子の塩基配列と遺伝子供与体××株の該構造遺伝子の塩基配列が同じであること
    - ・○○株が生産する△△が遺伝子供与体××株が生産する△△とアミノ酸配列が同等であること
  6. △△の製造について
    - ・食品添加物製造業の認可企業で製造されること
    - ・製造に用いられる原料および器材は、すべて食品衛生法に準じた添加物製造に合致したものであること
  7. 宿主、遺伝子供与体(プラスミド、挿入遺伝子の基原)微生物が自然界において遺伝子交換を行うことの証拠(注)
    - ・16S rRNA が高い相同性(96%以上)をもつこと
    - ・菌と菌との接合(自然界で起こりうる)による遺伝子交換を行うこと
    - ・接合性のプラスミドが存在すること
    - ・実験用培地及び土壌環境中で□□属間で遺伝子(プラスミド等)が転移する証拠
    - ・自然環境(土壌など)中の一定条件下での生活環を追跡し、プラスミド転移、ファージ感染及び細胞の接合が行われている証明
- (注)これらの証拠は、以下のいずれかに該当するものであること
- ①査読のある論文に公表されている
  - ②学会のポジションペーパー等、複数の専門家により根拠のあるものとして紙面にまとめられている
  - ③関連する国の審議会、検討会等において、複数の専門家によりコンセンサスが

得られている

8. 諸外国の規制、認可について

- ・□□属生産株由来の酵素についての諸外国の意見書、文献等、当該育種がナチュラルオカレンスと判断できることをサポートする情報を示す。

結語として、ナチュラルオカレンスに該当すると判断する根拠を記載する。

- ・自然界で遺伝子交換が行われることが明らかである
  - ・科学的な知見がある
- ⇒組換え体と同等の遺伝子構成を持つ生細胞が自然界に存在する場合(いわゆるナチュラルオカレンス)に該当する

以上